

**Regulation der Signalübertragung von  
Zytokinrezeptoren in der AML**

**Dissertation**

Technische Universität München  
Fakultät für Chemie

vorgelegt von

Sabine Mack (geb. Franzrahe)

München, im April 2002

# **Technische Universität München**

GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Hämatologikum  
München-Großhadern, KKG-Leukämie

## **Regulation der Signalübertragung von Zytokinrezeptoren in der AML**

Sabine Mack

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ. Prof. Dr. J. Buchner

Prüfer der Dissertation:

1. Hon.-Prof. Dr. R. Balling  
Technische Universität Braunschweig
2. Univ. Prof. Dr. H. Kessler

Die Dissertation wurde am 17.04.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Chemie am 06.06.2002 angenommen.

---

Die vorliegende Doktorarbeit wurde in der Zeit von Mai 1999 bis April 2002 an der GSF München, in der KKG-Leukämie/Ag Dr. med. Karsten Spiekermann angefertigt.

Ich möchte mich bei Herrn Dr. med. Karsten Spiekermann für die Themenstellung, die Betreuung bei der Durchführung der Arbeit und die Korrektur des Manuskriptes bedanken.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Rudi Balling danke ich für die Betreuung und Beurteilung der Arbeit.

Danken möchte ich auch allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, vor allem *Karin Schmieja*, für ihre stete Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ein besonders herzliches Dankeschön möchte ich meiner Familie aussprechen, die mich während meines Studiums und im Verlauf dieser Arbeit uneingeschränkt unterstützt hat.

### Liste der verwendeten Abkürzungen

$\alpha$	Anti
aa	Aminosäure
Abb.	Abbildung
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APL	Akute promyelozytische Leukämie
BES	N,N-bis-[2-Hydroxyethyl]-2-aminoethansulfonsäure
bzw.	beziehungsweise
CaP	Calciumphosphat
CML	Chronisch myeloische Leukämie
Cys	Cystein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS/DNA	Desoxyribonukleinsäure/-acid
FCS	fötale Kälberserum
FISH	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung
Flag	Flag-Tag
GFP	Green Fluorescence Protein
HA	HA-Tag
IL	Interleukin
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
ITD	interne Tandemduplikation
JAK	Januskinase
JH	JAK-Homologiedomäne
JM	juxtamembranös
Da	Dalton
Lg	Ligand
LTR	Long terminal repeat
MIY	MSCV-IRES-EYFP

## Abkürzungen

---

Oligom	Oligomerisierung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PML	Promyelozyten-Leukämie-Gen
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTK	Phosphotyrosinkinase
PY	Phosphotyrosin
RAR $\alpha$	Retinoinsäure-Rezeptor $\alpha$ (Gen)
RLU	relative light units
RNS/RNA	Ribonukleinsäure/-acid
rpm	Umdrehungen pro Minute
RTK	Rezeptortyrosinkinase
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
Tet	Tetracyclin
TM	transmembranös
tTA	tet-kontrollierter Transaktivator
Wt	Wildtyp
YFP	Yellow Fluorescence Protein
z. B.	zum Beispiel
Z/ml	Zellen pro Milliliter

Abkürzungen für Aminosäuren und Nukleotide sind nach dem IUPAC-Standard angegeben.  
Alle weiteren Maßeinheiten und deren Vorsätze entsprechen dem SI-System.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Akute myeloische Leukämie.....	1
1.1.1	Leukämiespezifische Mutationen von Rezeptor- und zytoplasmatischen Proteintyrosinkinasen.....	3
1.2	Der JAK/STAT-Signalweg.....	4
1.2.1	Janus Kinasen (JAK).....	6
1.2.2	Signal transducers and activators of transcription (STAT).....	8
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b> .....	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>14</b>
3.1	Zellkulturmethoden.....	14
3.1.1	Einfrieren und Auftauen von Zellvorräten.....	14
3.1.2	Verwendung von primären AML-Blasten.....	14
3.1.3	Kultivierung verschiedener Zelllinien.....	15
3.1.4	Bestimmung von Zelldichten.....	16
3.1.5	Herstellung von WEHI-Überständen.....	16
3.1.6	Etablierung einer U937-Transaktivatorzelllinie.....	16
3.1.7	Etablierung einer induzierbaren U937tTA-pTRE2-STAT3D-Zelllinie.....	17
3.1.8	Klonierung in semisolidem Medium.....	18
3.1.9	Herstellung ecotroper Virusüberstände.....	18
3.1.10	Infektionen von stabilen Ba/F3-Tyrosinkinase- Zelllinien mit MIY-STAT3-Konstrukten.....	19
3.1.11	Infektionen von Ba/F3 Wt Zellen mit MIY C-KIT WT und MIY-C-KIT D816V.....	19
3.1.12	Proliferationsassays.....	20
3.1.13	CaCl <sub>2</sub> -Transfektion.....	20
3.1.14	Transfektion mit Effektene.....	20
3.1.15	FACS-Durchflußzytometrie.....	21

## Inhaltsverzeichnis

---

3.2	Biochemische Methoden.....	21
3.2.1	Lösungen und Puffer.....	21
3.2.2	Gewinnung von Zell-Lysaten.....	22
3.2.3	Proteinbestimmung nach Bradford.....	22
3.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	23
3.2.5	Luciferase Reporter Assay.....	24
3.3	Immunologische Methoden.....	25
3.3.1	Lösungen und Puffer.....	25
3.3.2	Immunoblot.....	26
3.3.3	Immunopräzipitation.....	27
3.4	Molekularbiologische Methoden.....	28
3.4.1	Lösungen und Puffer.....	28
3.4.2	Restriktionsenzymatischer Verdau von Plasmid-DNA.....	29
3.4.3	Auftrennung von DNA im Agarosegel.....	30
3.4.4	Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	30
3.4.5	Vervielfältigung von DNA mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion...	30
3.4.6	Ligation von DNA-Fragmenten.....	31
3.4.6.1	Auffüllen von 5'-Überhängen (Klenow-Reaktion).....	32
3.4.6.2	Dephosphorylierung des Vektors.....	32
3.4.6.3	Sticky-end-Ligation.....	33
3.4.6.4	Blunt-end-Ligation.....	33
3.4.7	Herstellung kompetenter Bakterien.....	33
3.4.8	Transformation von kompetenten Bakterien.....	34
3.4.9	Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen.....	34
3.4.9.1	Minipräparation.....	35
3.4.9.2	Maxipräparation.....	35
3.4.10	Präparation von RNA aus Zelllinien.....	35
3.4.11	RNA-Quantifizierung .....	36
3.4.12	Umschreibung von RNA in cDNA.....	37
3.4.13	Northernblot.....	37
3.4.14	Real-time-PCR.....	38
3.5	Liste der Oligonukleotide.....	39
3.6	Plasmide.....	40

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>42</b>
4.1.	Stabile Expression einer dominant-negativen STAT3-Mutante in AML-Zelllinien mit Hilfe eines Tet-off Systems.....	42
4.1.1	Generierung von U937tTA-Klonen.....	45
4.1.2	Subklonierung der dominant-negativen STAT3-Mutante (STAT3D) und Austestung des pTRE2-STAT3D-Konstrukts.....	47
4.1.3	Generierung einer stabilen U937tTA-STAT3D-Zelllinie.....	49
4.2	Etablierung von stabilen Ba/F3-Zelllinien mit konstitutiv aktivem STAT3 und STAT5.....	51
4.2.1	Etablierung und Charakterisierung der stabil mit STAT3C und STAT5A1*6 transfizierten Ba/F3-Zelllinien.....	51
4.2.2	Regulation bekannter Zielgene von STAT3 und STAT5 in stabilen Ba/F3-Zelllinien.....	65
4.3	Untersuchung der Mechanismen der STAT3/5-Aktivierung in <i>in vitro</i> Modellsystemen.....	70
4.4	Untersuchung der Mechanismen der STAT3/5-Aktivierung in primären AML-Blasten <i>ex vivo</i> .....	76
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>82</b>
5.1	Stabile Expression einer dominant-negativen STAT3-Mutante in AML-Zelllinien mit Hilfe eines Tet-off-Systems.....	82
5.2	Etablierung von stabilen Ba/F3-Zelllinien mit konstitutiv aktivem STAT3 und STAT5.....	84
5.3	Mechanismen der STAT-Aktivierung.....	87
5.4	STAT-Aktivierung in primären AML-Blasten in Abhängigkeit von PTK-Mutationen.....	89
5.5	Therapeutische Optionen durch das „targeting“ des STAT3/5- Signalweges.....	91
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>94</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>96</b>

# **1 Einleitung**

Die Leukämien stellen eine heterogene Gruppe von malignen, klonalen hämatologischen Krankheiten dar, die eine signifikante Mortalität und Morbidität verursachen. In den USA werden jährlich etwa 26 000 Patienten mit einer Leukämie diagnostiziert und über 20 000 Erwachsene und Kinder sterben jährlich an dieser Krankheit (Holland, 1997). Die Leukämien wurden in akute und chronische Formen eingeteilt, ausgehend von der klinischen Entwicklung und dem Progress der Krankheit. Außerdem wurden sie in lymphoide und myeloische Leukämien unterteilt, abhängig von der Differenzierung und Linienzugehörigkeit der Blasten. Die akuten Leukämien sind durch ein schnelles Voranschreiten und einen tödlichen Verlauf, wenn sie unbehandelt bleiben, charakterisiert. Aber diese Form der Leukämie spricht oft, vor allem bei Kindern und jungen Erwachsenen, auf aggressive, zytotoxische Chemotherapien an (Lin, 2000).

## **1.1 Akute myeloische Leukämie**

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist durch eine Akkumulation von unreifen Knochenmarkszellen, auch Blasten genannt, gekennzeichnet. Aufgrund dieser Akkumulation von Blasten ist die Produktion von blutbildenden Zellen der normalen Hämatopoese vermindert. Das klinische Erscheinungsbild äußert sich meistens in einer Anämie, Thrombozytopenie und Leukopenie. Daraus ergeben sich klinischen Symptome wie Blutungen, aufgrund der Thrombozytopenie, und erhöhte Infektneigung, da auch das Immunsystem geschwächt wird. Die malignen Zellen sind z. B. durch unkontrollierte Proliferation, Apoptoseresistenz und eine Blockade in der Differenzierung charakterisiert.

Nach Vorschlägen der French-American-British (FAB) cooperative group wurde die AML 1976 in die Gruppen M1-M6 eingeteilt. Dieser Klassifikation lagen morphologische und zytochemische Kriterien zugrunde (Bennett, 1976). Sie wurde später um die Gruppen M0 und M7 erweitert. Inzwischen stützt sich die Einteilung der AML vor allem auf zytogenetische Untersuchungen und auf die Verteilung von Oberflächenmarkern. So wird vor allem die

Technik der Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) und die G-Banding-Technik für zytogenetische Untersuchungen verwendet. Die FISH kann schnell bekannte Translokationen identifizieren und hilft bei der Charakterisierung von verborgenen Translokationen.

Die in der AML auftretenden genetischen Alterationen umfassen aktivierende Mutationen von Proteintyrosinkinasen, Ras sowie leukämische Fusionsproteine, die myeloische Transkriptionsfaktoren involvieren. Typische genetische Alterationen von Rezeptor- und Proteintyrosinkinasen stellen Flt3-ITD bzw. Flt3-D835 Mutationen (Kiyoi, 1998; Yamamoto, 2001; Griffin, 2001), sowie die C-Kit-D816V-Mutation (Ning, 2001; Ashman, 1999; Beghini, 2000) und Fusionen von TEL und JAK2 (Schwaller, 2000; Nguyen, 2001), TEL und ABL (Hannemann, 1998; Janssen, 1995), BCR und ABL (Warmuth, 1997; de Groot, 1999) dar.

Die Flt3-ITD-Mutation tritt bei 20% der AML Patienten auf (Yokota, 1997; Hayakawa, 2000). Ebenso treten Flt3-D835 Mutationen in 7% der AMLs auf. Diese Mutationen sind Punktmutationen und kommen unabhängig von der Flt3-ITD Mutation vor (Abu-Duhier, 2001; Yamamoto, 2001). C-Kit D816V dagegen ist bei ca. 10% der AML Patienten zu finden (Gari, 1999). Die Fusionsproteine TEL-ABL (3 Patienten; Hannemann, 1998), TEL-JAK2 (3 Patienten; Nguyen, 2001) und BCR-ABL (Warmuth, 1997; de Groot, 1999), welches die chronische myeloische Leukämie (CML) verursacht, sind seltenere Alterationen.

Die am häufigsten auftretende Ras-Mutation stellt die N/K ras-Mutante dar, die in 20-30% der AML Patienten gefunden wird (Reuter, 2000). Bei den Fusionsproteinen mit Translokationen sind die Translokationen t(8;21), t(15;17) und die inv(16) zu finden. Diese resultieren in den Fusionsproteinen AML1-ETO, PML-RAR $\alpha$  bzw. PLZF-RAR $\alpha$  und CBF $\beta$  - MYH 11, welche mit einer Häufigkeit von 5-10% zu finden sind (Grimwade, 2000; Grisolano, 1997).

Bei der AML gibt es wie in soliden Tumoren Hinweise darauf, daß mehr als eine Mutation für die Entstehung und den Progress der Krankheit nötig ist (Kelly, 2002). Diese Erkenntnis führt zu der Hypothese, daß konstitutiv aktivierte Tyrosinkinasen oder Ras mit Mutationen in hämatopoetischen Transkriptionsfaktoren das proproliferative und anti-apoptotische Signal in den Zellen verursachen. Eine zweite Mutation, wie AML1-ETO oder PML-RAR $\alpha$  beeinflusst in erster Linie die Differenzierungskapazität und induziert eine Differenzierungsblockade. Diese Hypothese konnte durch Versuche mit murinen Knochenmarkstransplantationsmodellen, durch Expression von BCR/ABL und aktiviertem N-Ras unterstützt werden, da dadurch ein myeloproliferatives Syndrom aber keine AML verursacht wurde (Daley, 1990;

Mc Kenzie, 1999; Kelly, 2002). Außerdem zeigen PML-RAR $\alpha$  transgene Mausmodelle eine lange Latenzzeit, meist mehr als ein Jahr, bis der APL-Phänotyp (akute promyelozytische Leukämie) nachweisbar ist. In diesem Zeitraum treten weitere genetische Ereignisse auf, die zu dem Phänotypen beitragen (Grisolano, 1997).

### **1.1.1 Leukämiespezifische Mutationen von Rezeptor- und zytoplasmatischen Proteintyrosinkinasen**

Es gibt verschiedene leukämiespezifische Mutationen von Rezeptor- und Proteintyrosinkinasen, die schon in Abschnitt 1.1 erwähnt wurden. Hierzu gehören Mutationen in den Rezeptortyrosinkinasen Flt3 und C-Kit ebenso wie Fusionen von Proteintyrosinkinasen wie BCR-ABL, TEL-ABL und TEL-JAK2.

Die Rezeptortyrosinkinase Flt3 spielt eine wichtige Rolle im Überleben und der Selbsterneuerung von frühen hämatopoetischen Vorläufern, von monozytischen Vorläufern und in der frühen lymphoiden Entwicklung (Lyman, 1994; Gotze, 1998; Mackarechtschian, 1995). Die ITD-Mutation ist eine interne Tandemduplikation am Ende des Exon 11 des Flt3-Gens. Diese Mutation tritt in 20% der AML auf (Yokota, 1997). In IL-3 abhängigen Ba/F3-Zellen induziert diese Mutation ein faktorunabhängiges Wachstum und eine konstitutive Aktivierung von verschiedenen Zielproteinen, z. B. STAT5 und MAP-Kinasen (Mizuki, 2000; Hayakawa, 2000; Spiekermann, unveröffentlicht). Eine weitere Alteration von Flt3 stellt die Gruppe der Flt3-D835 Mutationen dar, eine Gruppe, die sehr heterogen ist. In dieser ist vor allem die Flt3-D835Y Mutation zu beachten. Diese Punktmutation liegt in der Tyrosinkinase-Domäne 2, welche zum A-loop (activation loop) der Rezeptortyrosinkinase gehört (Yamamoto, 2001; Abu-Duhier, 2001). Beide Mutanten sind aktivierende Mutationen, wodurch eine konstitutive Autophosphorylierung des Rezeptors auftritt (Fenski, 2000; Yamamoto, 2001; Abu-Duhier, 2001). Es konnte auch gezeigt werden, daß Flt3-D835Y STAT5 aktiviert (Spiekermann, unveröffentlicht).

Die aktivierende Mutante D816V von C-Kit, ein Proto-Onkogen, welches für eine Rezeptortyrosinkinase kodiert (Yarden, 1987; Qiu, 1988), ist bei verschiedenen malignen Tumoren, einschließlich der AML, gefunden worden (Ashman, 1999; Beghini, 2000). Diese

Punktmutation liegt in der intrazellulären Tyrosinkinase Domäne 2 von C-Kit (Nagata, 1995). Die Veränderungen im Signalweg, die durch diese Mutation hervorgerufen werden, sind noch unbekannt. Es konnte aber eine Aktivierung von STAT3 und seiner Zielgene Bcl-x<sub>L</sub> und C-MYC durch C-Kit-D816V gezeigt werden. Funktionelle Studien haben gezeigt, daß die STAT3-Aktivierung nötig, aber nicht ausreichend ist für das zytokinunabhängige Überleben und die Proliferation von Zellen (Ning, 2001).

Die Fusionsgene BCR-ABL, TEL-JAK2 und TEL-ABL kodieren für aktivierte Proteintyrosinkinasen, die ebenfalls ein transformierendes Potential besitzen. BCR-ABL ist eine konstitutiv aktivierte Tyrosinkinase, die aus der Translokation t(9;22) entsteht und die chronisch myeloische Leukämie (CML) verursacht. TEL-ABL und TEL-JAK2 sind seltene Fusionen, die aus Blasten von Patienten mit AML kloniert und funktionell charakterisiert werden konnten (Golub, 1995; Andreasson, 1997; Lacronique, 2000). Es konnte gezeigt werden, daß auch TEL-JAK2 und TEL-ABL durch die Kinaseaktivität ein transformierendes Potential besitzen (Hannemann, 1998; Lacronique, 2000). Sowohl BCR-ABL, als auch TEL-ABL und TEL-JAK2 induzieren eine Aktivierung von STAT3 und STAT5. Es konnte aber lediglich für TEL-JAK2 gezeigt werden, daß die STAT5-Aktivierung essentiell für das transformierende Potential ist (Schwaller, 2000).

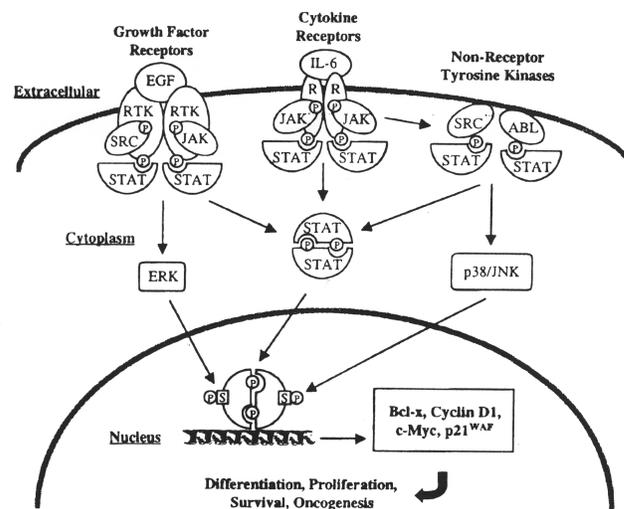
## 1.2 Der JAK/STAT-Signalweg

Das Wachstum von hämatopoetischen Zellen wird durch einen oder mehrere verschiedene hämatopoetische Wachstumsfaktoren kontrolliert. Einige dieser Wachstumsfaktoren verwenden Rezeptoren der Proteintyrosinkinase Familie, um Signale in die Zellen weiterzuleiten (Ihle, 1995; Reddy, 2000). Die Signalweiterleitung durch diese Rezeptoren wird durch ligandenabhängige Aktivierung der katalytischen Aktivität des Rezeptors und anschließender Aktivierung des Signalweges durch Proteintyrosin-Phosphorylierung vermittelt (Reddy, 2000; Bromberg, 2001). Die meisten der hämatopoetischen Wachstumsfaktoren binden an Rezeptoren der Zytokin-Rezeptor-Superfamilie, welche durch verschiedene Struktur motive in der extrazellulären und in der Ligandenbindedomäne, einschließlich vier konservierter Cysteine und einem WSXWS-Motiv, charakterisiert ist

(Silvennoinen, 1997; Kotenko, 2000). Zytokinrezeptoren besitzen keine eigene Proteintyrosinkinase-Aktivität und benötigen deshalb zytoplasmatische Proteintyrosinkinasen wie z. B. die Janus-Kinasen (JAK) (Silvennoinen, 1997; Rane, 2000). Diese werden nach Ligandenbindung durch Oligomerisierung des Rezeptors aktiviert.

Die Familie der „Signal transducers and activators of transcription“ (STAT) stellt direkte Zielproteine der JAK-Kinasen dar (Rane, 2000). STAT-Proteine werden durch verschiedene Liganden tyrosinphosphoryliert oder aktiviert. Diese Aktivierung findet durch Tyrosinkinasen und durch Nichtrezeptor-Tyrosinkinasen statt, wobei dies bei letzteren entweder direkt oder über assoziierte Tyrosinkinasen geht (Bromberg, 2001). Zytokinrezeptoren sind konstitutiv mit JAKs assoziiert. Ligandenbindung führt zu einer Dimerisierung des Rezeptors und zu einer Aktivierung der JAKs, welche Tyrosinreste innerhalb der intrazytoplasmatischen Domäne des Rezeptors transphosphorylieren (Rane, 2000). Der phosphorylierte Rezeptor erlaubt jetzt ein Binden von STAT-Proteinen durch deren SH2-Domäne. Die gebundenen STATs werden sofort von den JAKs tyrosinphosphoryliert. Dann bilden die STAT-Proteine Homo- oder Heterodimere, translozieren in den Zellkern, binden an die DNA und aktivieren die Transkription (Darnell Jr, 1997; Liu, 1998; Shuai, 2000).

### TK-STAT Signaling



**Abb. 1: Der Tyrosinkinase-STAT-Signalweg.**

Es sind Beispiele für verschiedene Tyrosinkinase-Signalwege, die eine Aktivierung von STAT-Proteinen induzieren können, gezeigt. R: Rezeptor; P: Phosphat. (nach Bowman et al., 2000).

### 1.2.1 Janus-Kinasen (JAK)

Die JAK-Familie besteht aus vier Mitgliedern: JAK1, JAK 2, JAK 3 und Tyk 2. JAK 3 wird hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert, wogegen die anderen drei JAKs ubiquitär exprimiert werden. Die JAK Kinasen sind 120 – 140 kDa große, zytoplasmatische Proteine, die eine Zwei-Kinasen-Domäne-Struktur besitzen. Dies ist eine C-terminale Kinasedomäne, der eine kinaseähnliche Domäne folgt. Diese zweite Domäne enthält keine katalytische Aktivität, könnte aber einige wichtige regulatorische Funktionen besitzen. Dem N-Terminus fehlen die charakterisierten Proteinstrukturen, aber er enthält fünf homologe Regionen. Diese JAK-Homologie Domänen (JH 3-7) scheinen die Interaktion mit den Zytokinrezeptoren zu vermitteln (Silvennoinen, 1997; Rane, 2000). Die JH1- und JH2-Domäne dagegen, welche zu den Tyrosinkinase Domänen homolog sind, liegen im C-terminalen Ende des Proteins. Von diesen beiden Domänen ist nur die „dual“ Kinase Domäne JH1 aktiv. Der Pseudo-Kinase Domäne JH2 fehlen einige wichtige Aminosäuren, die für eine aktive Kinase nötig sind. Sie scheint auch nicht mit einer Kinaseaktivität assoziiert zu sein (Rane, 2000; Reddy, 2000), aber eine regulatorische Rolle zu spielen (Luo, 1997; Saharinen, 2000). Die Assoziation der JAKs mit den Rezeptoren ist unabhängig von einer Tyrosinphosphorylierung. Die Kinasen existieren in einem latenten, inaktiven Zustand und werden durch Ligandenbindung aktiviert (Silvennoinen, 1997; Ihle, 1995; Rane, 2000).

Es gibt drei JAK-Aktivierungsmuster durch Zytokinrezeptoren. Einkettige Rezeptoren, wie z. B. der Erythropoetin-Rezeptor, aktivieren JAK 2. Ligandenbindung an den Rezeptor induziert Rezeptordimerisierung und Aggregation der rezeptorassoziierten JAK 2-Proteine. Dies führt zu einer Transphosphorylierung von JAK 2 in der Autophosphorylierungsstelle und einer erhöhten katalytischen Aktivität. Das so aktivierte Protein phosphoryliert anschließend den Rezeptor und/oder zelluläre Substrate wie STAT-Proteine, die an den Rezeptor rekrutiert wurden (Smithgall, 2000; Rane, 2000). Die anderen Zytokinrezeptoren sind durch die Aktivierung von zwei bestimmten JAK-Kinasen typisiert. Der IFN- $\gamma$  Rezeptor aktiviert JAK 1 und JAK 2, und die ligandeninduzierte Rezeptoraggregation führt die beiden JAK-Kinasen in einen heterodimeren Komplex, was eine Transphosphorylierung erlaubt (Rane, 2000). Ein drittes Muster ist im gp-130 Signalweg vorhanden. In der IL-6 Signalweiterleitung scheint eine JAK-Aktivierungskaskade vorhanden zu sein, in der JAK 1

als eine „triggering“ Kinase agiert und seine Aktivierung der von JAK 2 und Tyk 2 vorangeht (Silvennoinen, 1997; Smithgall, 2000; Rane, 2000).

STAT-Proteine gehören zu den am besten charakterisierten JAK-Substraten. Die Substratspezifität der JAK-Kinasen wird, bis zu einem gewissen Grad, nicht durch die Kinasen selber bestimmt, sondern durch die Rezeptorkomponente, an die die Kinase assoziiert

ist. So gibt es eine vergleichbare Fähigkeit von JAK 1, JAK 2 und Tyk 2 STAT1 zu phosphorylieren. Werden JAK-Kinasen in Säugetierzellen überexprimiert und hyperphosphoryliert, so aktivieren sie STATs in einer ligandenunabhängigen Art, wahrscheinlich durch eine direkte Interaktion. Durch Proteintyrosin-Phosphatasen wie SHP-1 werden die JAK Kinasen durch Dephosphorylierung inaktiviert (Pellegrini , 1997).

Die biologische Funktion von JAK-Kinasen wurde in knock-out Experimenten der Maus untersucht. Eine Deletion von JAK 2 führt zu embryonaler Letalität, die durch die ausgeschaltete Erythropoetin-Rezeptor Funktion, und somit einer fehlenden Erythropoese, verursacht wird (Bromberg, 2001). Die myeloischen Vorläuferzellen dieser Tiere können weder auf Erythropoetin, noch auf Thrombopoetin, IL-3 oder den Granulozyten/Makrophagen-Kolonie- stimulierenden Faktor (GM-CSF) reagieren (Parganas,1998). Dies zeigt die Wichtigkeit dieser Kinase für Zytokinrezeptoren, welche in der frühen Entwicklung wichtig sind. Die Deletion von JAK 1 führt auch zu einem perinatal letalen Phänotyp, da keine biologischen Reaktionen auf Zytokine, welche an Zytokinrezeptoren binden, die sowohl die  $\gamma$ c-Untereinheit des IL-2-Rezeptors als auch die gp 130 Kette des IL-6-Rezeptors benutzen, möglich sind (Bromberg, 2001; Liu, 1998; Rodig, 1998). Diese Tiere zeigen außerdem eine abnormale Thymusentwicklung und eine signifikante Reduktion von reifen B-Zellen (Pellegrini, 1997). Der Phänotyp von JAK3-defizienten Mäusen mit immunologischen Defizienzen ähnelt dem von Mäusen, denen die Zytokin-Rezeptorkette  $\gamma$ c des IL-2 Rezeptors fehlt (keine Proliferation der lymphoiden Population) (Liu ,1998; Pellegrini , 1997).

### 1.2.2 Signal transducers and activators of transcription (STAT)

Die STAT-Proteinfamilie wurde bei Untersuchungen der Interferon-Signaltransduktion entdeckt (Darnell, 1994). Sie spielen aber auch eine zentrale Rolle bei der Signalweiterleitung durch Zytokine, Wachstumsfaktoren, G-Proteine und onkogene Tyrosin-Kinasen. Hierbei wurden zuerst STAT1 und STAT2 entdeckt. Inzwischen sind sieben STAT-Proteine bei den Säugern bekannt, welche genetisch in drei chromosomalen Regionen (Chromosom 2, 12 und 17; Ihle, 2001) lokalisiert sind. Dies sind STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6 (Schindler, 1995; Azam, 1995; Ihle, 2001; Alister, 2000).

Jedes dieser Proteine liegt in latenter Form im Zytoplasma einer Zelle vor. Sie werden durch Phosphorylierung an einem Tyrosinrest aktiviert, worauf eine Homo- bzw. Heterodimerisierung folgt und eine DNA-Bindung im Zellkern ermöglicht wird (Bromberg, 2001; Reddy, 2000; Decker, 2000). Für eine vollständige Aktivierung, d. h. eine transkriptionelle Aktivität der STAT-Proteine, ist zusätzlich eine Phosphorylierung an einem Serinrest notwendig (Decker, 2000). Eine Inaktivierung findet durch Tyrosin-Dephosphorylierung statt. Die Tyrosinphosphorylierung ist für die Dimerisierung und die anschließende Translokation in den Zellkern notwendig.

Die STAT-Proteine sind einzigartig unter den Transkriptionsfaktoren, da sie eine SH2-Domäne (src-homology 2) und eine Phosphotyrosin-Bindedomäne besitzen. Nach Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von STAT1 und STAT3 lassen sich vier Domänen erkennen (Chen, 1998; Becker, 1998). Ab etwa dem Aminosäurerest 130 finden sich vier lange helikale Coils, durch die Interaktionen mit anderen Proteinen möglich sind. Die Region von Aminosäure 300-500 enthält die DNA-Bindedomäne, welches eine Region von Beta-Faltblatt-Strukturen, die durch Loops verbunden sind, darstellt. Darauf folgt eine Linkerdomäne, die mehrere Alphahelices enthält, worauf sich eine SH2-Domäne anschließt. Die COOH-terminale Region ist ebenso wie der N-Terminus für die transkriptionale Aktivierung der STATs wichtig (Bromberg, 2000; Bromberg, 2001). Um die Transkription aktivieren zu können, müssen die STAT-Proteine dimerisieren und in den Zellkern translozieren (Sekimoto, 1997). Dort binden sie an ein spezifisches DNA-Bindeelement (TTNNNNNAA) und aktivieren die Transkription verschiedener Gene (Bromberg, 2001).

Zielgene, die durch STAT-Proteine aktiviert/reguliert werden sind z. B. Bcl-x<sub>L</sub>, C-MYC und Cyclin D1 (Coffer, 2000; Bowman, 2000). Bcl-x<sub>L</sub> gehört zu der Bcl-2-Familie, welche eine Familie aus anti-apoptischen Proteinen darstellt. Dieses Gen wird hauptsächlich durch STAT3 reguliert, was mit Hilfe von konstitutiv aktiven Mutanten und Reporterassays untersucht wurde. Es konnte gezeigt werden, daß bei Expression der Mutante STAT3C die Transkription eines Reporterkonstruktes, das eine Promotersequenz vom Bcl-x<sub>L</sub>-Gen enthält, induziert wurde (Bromberg, 1999). STAT3C ist eine konstitutive aktive Mutante von STAT3, die durch den Austausch zweier Cysteinreste erhalten wurde (siehe auch 1.2.2, Seite 11). Außerdem konnte in einer IL-6 abhängigen Zelllinie, bei konstitutiver Aktivierung von STAT3, eine direkte Induktion der Bcl-x<sub>L</sub> Genexpression nachgewiesen werden (Catlett-Falcone, 1999 a, b).

Das C-MYC Gen ist ebenfalls häufig in malignen Tumoren überexprimiert und stellt auch ein Zielgen von STAT3 dar (Dang, 1999). Das Protein, ein Transkriptionsfaktor, ist ein wichtiger Regulator von Zellproliferation und Survival. So kann MYC die Zellproliferation stimulieren und die Zellen gleichzeitig daran hindern in einen Ruhezustand zu gehen bzw. die terminale Differenzierung zu beginnen (Lüscher, 2001). Außerdem kann MYC Apoptose induzieren, was eine Art Selbstschutz für die Zelle darstellt (Prendergast, 1999).

Da das C-MYC Gen auch ein Zielgen von STAT3 darstellt, konnte gezeigt werden, daß das endogene C-MYC mRNA-Level in Fibroblasten, die konstitutiv aktives STAT3C exprimieren, erhöht ist, was auf eine Rolle von STAT3 in der Regulation der C-MYC Expression hindeutet (Bromberg, 1999). Neuere Studien zeigten außerdem eine STAT3 vermittelte transkriptionelle Regulation des C-MYC Gens als Antwort auf IL-6 (Kiuchi, 1999).

Ein weiteres Zielgen von STAT3 und STAT5 ist Cyclin D1. Dieses spielt eine wichtige Rolle in der Zellzyklusregulation. Cyclin D1 assoziiert mit CDK 4 oder CDK 6 und kontrolliert die Zellzyklusprogression von der G1- zur S-Phase durch Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins, welches dann Transkriptionsfaktoren aktiviert, die für die Initiierung der DNA-Replikation wichtig sind (Sinibaldi, 2000; Dyson, 1998; Nevins, 1998). In der G1-Phase wird die Expression von Cyclin D1 schnell durch Wachstumsfaktoren induziert. Um die Regulation von Cyclin D1 durch STAT3 zu untersuchen, wurden STAT3C exprimierende Zellen verwendet (Bromberg, 1999), ebenso wie v-Src transformierte Fibroblastenzellen (Sinibaldi, 2000). Es konnten erhöhte Cyclin D1 mRNA-Level in v-Src/STAT3C transformierten Zellen nachgewiesen werden und ein Cyclin D1-Promoter basiertes

Reporterkonstrukt wurde durch STAT3 aktiviert. Außerdem konnte auch eine Regulation des Cyclin D1 Gens durch STAT5 beobachtet werden, da der Cyclin D1 Promoter ein Bindeelement für STAT5 enthält. In den dazu durchgeführten Experimenten wurden sowohl dominant-negative als auch konstitutiv aktive STAT5 Mutanten verwendet (de Groot, 2000; Matsumara, 1999; Wen, 1999).

Um die biologische Funktion der STATs zu untersuchen, wurden knockout Mäuse generiert. STAT1-knockout Mäuse sind viabel und zeigen keine Entwicklungsdefekte, aber alle physiologischen Funktionen, die durch Interferon (IFN)  $\alpha$ ,  $\beta$  oder  $\gamma$  vermittelt werden, fehlen. Dies führt zu einer Hypersensitivität gegenüber viralen und bakteriellen Infektionen. Weiterhin entwickeln die Mäuse spontan Tumoren, was auf eine Tumorsupressorfunktion hinweist. Eine weitere wichtige Rolle spielt STAT1 im ligandenvermittelten (IFN  $\alpha$ , IFN  $\gamma$ ) Wachstumsstopp und in der Apoptose (Bromberg, 2001; Ihle 2001).

STAT2 wird fast nur durch IFN $\alpha/\beta$  tyrosinphosphoryliert und aktiviert. Fehlt STAT2, dann sind die Mäuse zwar lebensfähig und entwickeln sich normal, aber sie sind anfällig für virale Infektionen und die Zellen reagieren nicht auf IFN $\alpha/\beta$  (Ihle, 2001).

STAT4 und STAT6 besitzen spezifische physiologische Funktionen. So wird STAT4 hauptsächlich nach Stimulation mit IL-12, welches in der Kontrolle von T-Helferzellendifferenzierung über den Th1-Weg wichtig ist, aktiviert. Der Phänotyp von Mäusen, denen STAT4 fehlt ist ähnlich zu dem von Mäusen, die IL-12 defizient sind. So können die B-Zellen dieser Mäuse kein „Class switching“ durchführen und auch kein IgE produzieren. STAT6 knockout Mäusen fehlen die meisten physiologischen Funktionen, die mit IL-4 assoziiert sind, wie die Differenzierung von Th2-Zellen, da STAT6 hauptsächlich durch IL-4 und IL-13 aktiviert wird (Ihle, 2001).

Wird STAT5a/b deletiert, welches Basisfunktionen in der Zellwachstumsregulation hat, so treten spezifische Veränderungen auf. Fehlt STAT5a, resultiert daraus ein Verlust der Prolaktinabhängigen Brustdrüsenedwicklung, was für die Laktation nötig ist. Ist dagegen nur STAT5b deletiert, so findet man reduzierte Level an Insulin-like Wachstumsfaktor (IGF-1) und ein reduziertes Wachstum von männlichen und weiblichen Tieren. Eine gleichzeitige Deletion von STAT5a und STAT5b resultiert im Verlust der Corpus luteum Entwicklung und verminderter Fertilität. Zusätzlich entsteht ein schwerer T-Zell-Proliferationsdefekt (Bromberg, 2001; Ihle, 2001).

Die Funktion von STAT3 in adultem Gewebe ist schwerer zu definieren, da die knockout Mäuse früh in der Embryonalentwicklung, vor der Gastrulation, sterben (Takeda, 1997; Ihle, 2001). Der Zeitpunkt der Sterblichkeit und das hohe Expressionslevel von STAT3 im extraembryonalen visceralen Endoderm lassen vermuten, daß extraembryonale Zellen unfähig sind, die Einnistung zu initiieren oder die Ernährung von lebensfähigen Mäusen zu gewährleisten (Akira, 2000). STAT3 scheint also eine wichtige Rolle in der frühen Entwicklung zu spielen. Aus weiteren Versuchen *in vitro* ließ sich schließen, daß STAT3 eine wichtige Rolle in der anti-inflammatorischen Antwort durch IL-10 spielt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß konstitutiv aktive Mutanten von STAT3 ein transformierendes Potential in epithelialen Zellen haben (Bromberg, 2001; Ihle, 2001).

Eine natürliche dominant-negative Spliceform von STAT3 stellt STAT3 $\beta$  dar. STAT3 $\alpha$  und STAT3 $\beta$  werden von vielen Geweben koexprimiert, wobei STAT3 $\beta$  als ein starker Inhibitor der Transkription wirkt (Caldenhoven, 1996). Dominant-negative Mutanten von STAT3, welche durch Einführen von Punktmutationen entweder in die DNA-Bindedomäne (STAT3D) oder in die Transaktivierungsdomäne (STAT3F) generiert wurden (Nakajima, 1996) und konstitutiv aktive Mutanten von STAT3 und STAT5 (STAT3C, STAT5A1\*6) wurden in dieser Arbeit verwendet, um die funktionelle Bedeutung von STAT3/5 in der Pathogenese der AML zu untersuchen.

Um die konstitutiv aktive Mutante von STAT3C zu erhalten, wurden zwei Cysteinreste ausgetauscht (Bromberg, 1999). Dadurch können die Proteine, ohne vorherige Tyrosinphosphorylierung, spontan dimerisieren und sind transkriptionell aktiv. Dies konnte aufgrund der Kristallstruktur von STAT3 vorhergesagt werden, da, wegen der Nähe der beiden Aminosäuren, eine mögliche Schwefelbrückenbindung zwischen zwei STAT3 Monomeren vermutet wurde (Bromberg, 1999). In *in vitro* Reporter Assays konnte gezeigt werden, daß STAT3C, ohne Tyrosinphosphorylierung, die Transkription des Reportergens aktiviert, während Wildtyp STAT3 keinen Effekt auf die Transkription hat. Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß STAT3C transfizierte epitheliale Zellen, die Nacktmäusen subkutan injiziert wurden, bei diesen Tieren innerhalb von zwei bis vier Wochen Tumore an den Injektionsstellen induzieren (Bromberg, 1999).

Eine ähnliche konstitutiv aktive Mutante existiert für STAT5A. Dies ist STAT5A1\*6, welche zwei Punktmutationen enthält. Die Mutation 1 liegt in der Aktivierungsdomäne (S<sup>710</sup>  $\rightarrow$  F<sup>710</sup>),

wegen die Mutation 6 in der DNA-Bindungsdomäne liegt ( $H^{298} \rightarrow R^{298}$ ). Diese Mutationen führen zu einer konstitutiven Tyrosinphosphorylierung, Zellkernlokalisierung und DNA-Bindeaktivität (Nosaka, 1999).

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Die Grundlage zu der vorliegenden Arbeit lieferten Ergebnisse früherer Untersuchungen zum JAK/STAT-Signalweg an Patientenzellen und Zelllinien. Da die normale Proliferation und Differenzierung von myeloischen Zellen durch Zytokine wie dem „granulocyte colony-stimulating factor“ (G-CSF) oder dem „granulocyte-macrophage colony-stimulating factor“ (GM-CSF) reguliert werden, wurde vermutet, daß eine gestörte Signalweiterleitung von Zytokinrezeptoren über die Januskinasen und die STAT-Proteine an der Pathogenese der AML beteiligt sein könnte. Es konnte gezeigt werden, daß in leukämischen Blasten von Patienten und auch in leukämischen Zelllinien sowohl STAT1 als auch STAT3 und STAT5 stark exprimiert und konstitutiv aktiviert sind (Biethahn, 1999). Außerdem ist bekannt, daß STAT-Proteine in vielen malignen Tumoren, einschließlich der AML, und in transformierten Zelllinien konstitutiv aktiviert sind. Es wird postuliert, daß konstitutiv aktives STAT3 ein transformierendes Potential besitzt (Bromberg, 1999), und daß STAT5 an der zellulären Transformation durch BCR-ABL und TEL-JAK2 beteiligt ist (de Groot, 1999; Schwaller, 2000). Aus diesen Erkenntnissen ist folgende Hypothese entstanden:

*Die konstitutive STAT-Aktivierung ist an der Pathogenese von Leukämien und soliden Tumoren beteiligt.*

Die Aufgabe dieser Arbeit bestand in der Beantwortung der folgenden, dieser Arbeit zugrunde liegenden, Hauptfrage:

**Was für eine Bedeutung haben STAT3 und STAT5 in der malignen Transformation hämatopoetischer Zellen und welche Mechanismen sind für die konstitutive STAT-Aktivierung in der AML verantwortlich?**

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Zellkulturmethoden

Alle Zellen wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> Partialdruck und 95% relativer Luftfeuchtigkeit in einem Zellkultur Inkubator (Heraeus, Deutschland) kultiviert.

#### 3.1.1 Einfrieren und Auftauen von Zellvorräten

Zellvorräte wurden durch Einfrieren von Zellen in 90% FCS (Sigma, Deutschland) und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma, Deutschland) hergestellt. Zum langsamen Herunterkühlen auf –80°C wurden Cryo 1°C Freezing Container (Nalgene, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Anschließend wurden die Zellen bei –180°C in flüssigem Stickstoff gelagert.

Durch Auftauen konnten die Zellen wieder in Kultur genommen werden. Das Auftauen erfolgte durch Schwenken der Röhrcchen im 37°C warmen Wasserbad und Resuspendieren mit 10 ml Medium. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in entsprechendem Medium in Kultur genommen.

#### 3.1.2 Verwendung von primären AML-Blasten

Primäre AML-Blasten wurden wie unter 3.1.1 beschreiben eingefroren. Ein Teil der Proben wurde zusätzlich als RIPA-Lysate eingefroren, wobei  $1,4 - 1,6 \times 10^7$  Zellen/200 µl RIPA-Puffer (siehe 3.2.1) verwendet wurden. Nach der Lyse folgte eine Zentrifugation, um Zelltrümmer zu pelletieren. Der Überstand wurde dann bei –80°C gelagert. Eine Proteinbestimmung (siehe 3.2.3) erfolgte bei Verwendung der Proben im Western-Blot (siehe 3.2.4 und 3.3.2).

Die viabel eingefrorenen AML-Blasten wurden, für die Analyse im Western-Blot, durch Schwenken im 37°C-Wasserbad aufgetaut. Die Zellen wurden in 5 ml einer BSA-Lösung (10 mg/ml BSA in 0,9% NaCl; Sigma, Deutschland) resuspendiert und abzentrifugiert. Der

Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5 ml PBS (PAN, Deutschland) gewaschen. Dann folgte die Lyse der Zellen in 100 – 200 µl RIPA-Puffer. Nach einer weiteren Zentrifugation, um Zelltrümmer zu pelletieren, wurde eine Proteinbestimmung (siehe 3.2.3) anhand des Überstandes durchgeführt und das Lysat für die Analyse im Western-Blot verwendet.

### **3.1.3 Kultivierung verschiedener Zelllinien**

Es wurden verschiedene humane Zelllinien sowie Mauszelllinien in Kultur gehalten. Zu den humanen Zelllinien gehörten U937, U937 tTA, U937 PML-RAR $\alpha$  (Zn-induzierbar), HL60, NB4, K562, 293, 293T, PA317inf tTA, GPE86, wovon die ersten fünf Linien in Suspension und die restlichen Linien adhärent wuchsen. Bei den Mauszelllinien handelte es sich um Ba/F3-Zellen, welches pro-B-Zellen sind und in Suspension wachsen, stabile Ba/F3-TEL-ABL, -BCR-ABL, -TEL-JAK2-Zelllinien, sowie um die adhärenenten WEHI-, NIH3T3- und BOSC 23 -Zellen. Die Suspensionszelllinien sowie die WEHI-Zellen wurden alle in RPMI-1640 bzw. RPMI-1640-Glutamax (PAN, Deutschland; bzw. Gibco BRL, Deutschland), welches mit 10% FCS (Sigma-Aldrich, Deutschland) und 50 U/ml Penicillin/50 µg/ml Streptomycin (Gibco BRL, Deutschland) supplementiert wurde, kultiviert. Die Kultivierung von U937tTA-Zellen erfolgte in RPMI-1640 (PAN, Deutschland) mit 20% FCS. Für die Ba/F3-Zellen wurde dem Medium noch 10% sterilfiltrierter WEHI-Überstand, als murine IL-3 Quelle, zugesetzt. Die adhärenenten Zelllinien wurden in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM; PAN, Deutschland bzw. Gibco BRL, Deutschland), versetzt mit 10% FCS und 50 U/ml Penicillin/50 µg/ml Streptomycin, kultiviert.

Ein Splitting der Zellen, im Verhältnis von 1:2 bis 1:12 - je nach Zelllinie und Zelldichte - fand alle zwei bis drei Tage statt. Hierfür wurden die Zellen bei 980 rpm, Raumtemperatur, für sechs Minuten abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Kultivierungsmedium resuspendiert und in das entsprechende Kulturvolumen gegeben. Adhärenente Zellen mußten vor dem Zentrifugieren mit 0,5 g/l Trypsin (Gibco BRL, Deutschland)/0,2 g/l EDTA (Gibco BRL, Deutschland) abgelöst werden. Die Trypsinreaktion wurde mit Medium abgestoppt. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet gut resuspendiert, um ein Zusammenklumpen der Zellen zu vermeiden, und die entsprechende Menge an Zellsuspension wurde in das

gewünschte Kulturvolumen verdünnt. Kultivierungen fanden in Volumina von 200 µl bis zu 50 ml statt.

Die verwendeten Zelllinien wurden, soweit nicht anders angegeben von DSMZ, Braunschweig bezogen. Stabile Ba/F3-TEL-ABL/ -BCR-ABL/ -TEL-JAK2-Zelllinien wurden in dieser Arbeitsgruppe generiert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Zellkulturverbrauchsmaterial wurde von Sarstedt (Deutschland), die Zellkulturplatten von Greiner (Deutschland) und die Plastikpipetten von Costar (Deutschland) verwendet.

### **3.1.4 Bestimmung von Zelldichten**

Zelldichten wurden mit der Neubauer Zählkammer, nach Trypanblaufärbung zum Ausschluß von toten Zellen, in einem Durchlichtmikroskop (Leitz, Deutschland) bestimmt.

### **3.1.5 Herstellung von WEHI-Überständen**

Für die Gewinnung von WEHI-Überständen wurde das konditionierte Medium von den kultivierten WEHI-Zellen abgenommen und abzentrifugiert. Nach dem Sterilfiltrieren der Überstände (Filtropur S02, Ø 0,2 µm; Sarstedt, Deutschland) wurden Aliquots zu je 50 ml bei -20°C eingefroren. Diese konnten dann als murine IL-3 Quelle verwendet werden.

### **3.1.6 Etablierung einer U937-Transaktivierungszelllinie**

Für die Etablierung einer U937-Transaktivierungszelllinie wurden 100 ml RPMI 1640 Medium für 24 Stunden durch die Producerzelllinie PA317infTA(Timm Schroeder, GSF München) konditioniert. Um die Producerzelllinie PA317infTA zu erhalten wurde zuerst das Gen für den Transaktivator des Tet-off Systems in ein rtTaneo-Plasmid kloniert, welches zwei long terminal repeats (LTR) und eine Neomycin-Resistenz besitzt (Timm Schroeder, GSF München; siehe Abschnitt 4.1.1, Abb. 4). Mit diesem Konstrukt wurde die ecotrope Virus-Verpackungszelllinie GPE86 transfiziert, die das Plasmid in einem Virus verpackt an ihr Medium abgibt. Dieser virale Überstand wurde für die Infektion von amphotropen PA317-

Verpackungszellen verwendet. Die so generierten PA317infTA-Zellen entlassen die Transaktivator-RNA, durch Strukturproteinen des Virus-Partikels eingepackt, ins Medium. Das von diesen Zellen konditionierte Medium, je 50 ml, wurde zentrifugiert und sterilfiltriert (Filtropur S02, Ø 0,2 µm; Sarstedt, Deutschland). U937-Zellen ( $1 \times 10^7$ ) wurden pelletiert und in 50 ml filtriertem, konditioniertem Medium resuspendiert. Dieser Ansatz wurde für 40 Minuten bei 200 g zentrifugiert (spin infection). Danach wurde das Pellet in weiteren 50 ml filtriertem, konditioniertem Medium resuspendiert und für sechs bis acht Stunden kultiviert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen in Dichten von  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  Zellen in 3 ml Softagar (siehe 3.1.8), mit 1 mg/ml G418 (Sigma-Aldrich, Deutschland), für die Selektion auskloniert (siehe auch 3.1.8). Hierfür wurden pro Loch einer 6-Loch-Platte 0,3 ml einer 10-fach konzentrierten Agarstammlösung - bestehend aus 3,3 g Bacto-Agar (Difco, Deutschland) und 100 ml Aqua dest. – mit 2,7 ml Zellsuspension einschließlich G418 (Sigma-Aldrich, Deutschland) gemischt und ins Loch gegeben. Die Selektion dauerte circa zwei Wochen, bis Kolonien im Softagar wuchsen. Die Kolonien wurden gepickt und in Selektionsmedium, mit 1 mg/ml G418 (Sigma-Aldrich, Deutschland), expandiert. Eine Austestung der Klone wurde mit Hilfe des Luciferase Reporterassays (siehe auch 3.2.5) durchgeführt.

### **3.1.7 Etablierung einer induzierbaren U937tTA-pTRE2-STAT3D-Zelllinie**

Für die Etablierung von tet-induzierbaren U937tTA-pTRE2-STAT3D-Zelllinien wurde der beste Klon der U937tTA-Zellen, welcher im Luciferase-Reporter Assay (3.2.5) die stärkste Induktion und die geringste „Leakiness“ zeigte, als Ausgangszelllinie gewählt. Das pTRE2-STAT3D-Konstrukt (Klonierung siehe 3.4.2 bis 3.4.6.4) wurde zusammen mit einem Puromycin-Resistenzvektor (pPur; Clontech, Deutschland) mit Hilfe der Effectene-Transfektion (Qiagen, Deutschland; siehe 3.1.14) in die U937tTA-Zellen kotransfiziert. Das Verhältnis von Konstrukt zu Resistenzvektor wurde dabei so gewählt, daß das Konstrukt in einem 10-fachen Überschuß vorhanden war. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 48 Stunden kultiviert. Dann begann die Selektion mit 0,5 µg/ml Puromycin (Sigma-Aldrich, Deutschland). Zwei bis drei Tage nach Selektionsbeginn wurden die Zellen zentrifugiert, um den großen Überschuß an toten Zellen zu entfernen. Nach drei Wochen Selektion konnten resistente Poolzellen in semisolidem Medium auskloniert werden (siehe 3.1.7), um

Einzelklone zu erhalten. Die Poolzellen wurden auf ihre Induktion und die Expression des pTRE2-STAT3D-Konstrukts getestet.

Einzelklone konnten zwei Wochen nach Ausklonierung gepickt und expandiert werden. Hier erfolgte ebenfalls ein Test auf die Expression des pTRE2-STAT3D-Konstrukts und die Induktion des Systems.

### **3.1.8 Klonierung in semisolidem Medium**

Zur Herstellung stabil transfizierter, G418-resistenter Zellklone wurden U937tTA-Zellen in semisolidem Proliferationsmedium mit 1 mg/ml G418 (Sigma-Aldrich, Deutschland) und 0,33% Baktoagar (Difco, Deutschland) in 3 ml in 6-Loch Platten ausgesät. Nach ca. 14 Tagen wurden resistente Kolonien mit einer 200 µl Gilson-Pipette aus dem Agar in Flüssigkultur übertragen und unter Selektionsbedingungen weiter expandiert.

Zur Herstellung stabil transfizierter, Puromycin-resistenter Zellklone wurden U937tTA-STAT3D-Zellen, mit 0,5 µg/ml Puromycin (Sigma-Aldrich, Deutschland), wie oben beschrieben, in Softagar ausgesät. Nach ca. 10 Tagen wurden Kolonien in Flüssigkultur übertragen und weiter expandiert.

### **3.1.9 Herstellung ecotroper Virusüberstände**

Für die Gewinnung ecotroper Virusüberstände wurden BOSC 23-Zellen, ein 293-Derivat, oder 293T-Zellen, eine humane Nierenzelllinie, verwendet. Die Zellen wurden in einer Dichte von  $1,2 \cdot 10^5$  Zellen/ml ausgesät. Am nächsten Tag wurden die entsprechenden Konstrukte (MIY-STAT3WT/D/C) durch eine  $\text{CaCl}_2$ -Transfektion (siehe 3.1.13) transfiziert. Nach 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, und nach weiteren 24 Stunden wurde der Überstand geerntet. Der Überstand wurde zentrifugiert, filtriert (Millipore low protein filter, Ø 0,45 µm; Millipore, Deutschland) und in Aliquots bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Die Zellen wurden im FACS-Durchflußzytometer (siehe 3.1.15) auf die Transfektionseffizienz überprüft.

### **3.1.10 Infektionen von stabilen Ba/F3-Tyrosinkinase-Zelllinien mit MIY-STAT3-Konstrukten**

Für die Transfektionen mit MIY-STAT3WT/STAT3D-Konstrukten wurden stabile Ba/F3-BCR/ABL, Ba/F3-TEL/ABL, Ba/F3-TEL-JAK2, Ba/F3-STAT3C (konstitutiv aktives STAT3), sowie Ba/F3-Mock Zellen verwendet. Diese Zelllinien waren in unserer Arbeitsgruppe durch Elektroporation von nativen Ba/F3-Zellen mit pCDNA6A-BCR-ABL, -TEL-ABL, -TEL-JAK2, -STAT3C-Konstrukten und anschließender Blasticidin-Selektion [8 µg/ml] generiert worden. Die Zellen wurden in einer Dichte von  $1,5 \times 10^5$  Zellen/200µl in 48-Loch-Platten ausgesät. Die Infektionen wurden mit je 200 µl ecotropen Virusüberständen durchgeführt, indem diese, unter Zugabe von 8 µg/ml Polybrene (Abbott Laboratories, USA), direkt auf die Zellen gegeben wurden. Nach 48 Stunden Inkubation erfolgte eine Sortierung in Poolzellen im FACS-Sorter. Die Zellen wurden expandiert und dann in Proliferationsassays (siehe 3.1.12) eingesetzt (siehe 4.2.1, Abb. 9).

Die Abbildung 9 b, Kapitel 4.2.1 zeigt schematisch die allgemeine Vorgehensweise bei der Infektion von Zellen mit MIY-Konstrukten und deren anschließenden Sortierung durch die Fluoreszenz am Beispiel von Ba/F3-Zellen. In Abbildung 9 a ist der MIY-Vektor mit der Einklonierungsstelle für das zu untersuchende Gen vereinfacht dargestellt. Zusätzlich ist in Abbildung 9 c das Prinzip des Ba/F3-Systems gezeigt. Native Ba/F3-Zellen benötigen IL-3 für die Proliferation. Ist kein IL-3 vorhanden, kommt es zur Wachstums hemmung und Apoptose. Infiziert man Ba/F3-Zellen mit Konstrukten wie TEL-ABL oder TEL-JAK2, findet eine Transformation der Zellen statt. Diese sind dadurch faktorunabhängig geworden und benötigen kein IL-3 mehr für die Proliferation.

### **3.1.11 Infektionen von Ba/F3 WT Zellen mit MIY-C-Kit WT und MIY-C-Kit D816V**

Die stabilen Infektionen von Ba/F3 WT Zellen mit MIY-C-Kit WT/D816V-Konstrukten wurden wie unter 3.1.10 beschrieben durchgeführt. Nach 48 Stunden erfolgte ebenfalls eine Sortierung in Poolzellen im FACS-Sorter. Die Zellen wurden expandiert und anschließend weiter charakterisiert.

### 3.1.12 Proliferationsassays

Diese Assays wurden mit nativen Ba/F3-Zellen, die stabil mit MIY-STAT3WT/STAT3D-Konstrukten infiziert wurden, durchgeführt.

Für Proliferationsassays wurden die Zellen in einer Dichte von  $5 \times 10^3$  Zellen/200  $\mu$ l in 96-Loch-Platten (Flachboden) ausgesät. Es wurden je Zeitpunkt und Konstrukt drei Löcher einer 96-Loch-Platte ausgesät. Desweiteren wurden die Zellen in diesem Assay mit und ohne rekombinantem Interleukin-3 (IL-3; 10ng/ml) (Biosource International, USA) angesetzt. Das Wachstum der Zellen wurde nach 24/48/72 Stunden durch Trypanblau-Färbung und Auszählung der vitalen Zellen bestimmt.

Proliferationsassays für die unter 3.1.10 beschriebenen infizierten Ba/F3-Zelllinien wurden in Abwesenheit von IL-3 angesetzt, um Spontanproliferationen bestimmen zu können.

### 3.1.13 CaCl<sub>2</sub>-Transfektion

CaCl<sub>2</sub>-Transfektionen wurden bei 293-/293T-/BOSC23-Zellen angewandt. Die Zellen wurden in einer Dichte von  $1,2 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät. Am nächsten Tag fand die Transfektion statt. Der Transfektionsansatz bestand aus: 2  $\mu$ g DNA mit 88  $\mu$ l sterilem Aqua dest. gemischt, 10  $\mu$ l

2,5M CaCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ l 2xBBS (280 mM NaCl; 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; 50 mM BES; Aqua dest. ad 500 ml; Chemikalien von Sigma, Deutschland). Der Ansatz inkubierte für 20 Minuten bei Raumtemperatur und wurde anschließend auf die Zellen gegeben. Am nächsten Morgen erfolgte ein Mediumwechsel und nach insgesamt 48 Stunden wurden die Zellen entweder für Westernblots lysiert oder die Zellen für Messungen im FACS-Durchflußzytometer vorbereitet. Im Fall der Produktion von viralen Überständen wurde auch das Medium gesammelt und eingefroren.

### 3.1.14 Transfektionen mit Effektene (Qiagen, Deutschland)

Transfektionen mit Effektene wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 3.1.15 FACS-Durchflußzytometrie

Die FACS-Durchflußzytometrie wurde hauptsächlich für die Überprüfung von Transfektionseffizienzen, zur Titerbestimmung und zum Sortieren von viral infizierten Zellen (MIY-Konstrukte) verwendet. Hierfür wurden die Zellen, mindestens  $1 \times 10^5$  Zellen/ml, in FACS-Röhrchen (Falcon, Deutschland) abzentrifugiert. Das Pellet wurde in PBS/2%FCS resuspendiert und wieder abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt. Dann wurden die Zellen in 1ml PBS aufgenommen und im FACS-Durchflußzytometer (Beckman Coulter; Coulter, Deutschland) auf Grünfluoreszenz (510 nm; Kanal 1) gemessen. Für die Zellsortierung wurden die Zellen, nach den Waschschriften, mit Propidiumjodid (PJ) gefärbt, um die toten Zellen abzugrenzen. Hierfür wurde das Pellet in PBS/2%FCS/1 $\mu$ g/ml PJ aufgenommen und abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann wieder in PBS/2%FCS resuspendiert und die grün fluoreszierenden Zellen wurden im FACS-Sorter (FACS Ventage SE; Beckton Dickenson, Deutschland) sortiert und anschließend weiterkultiviert (siehe 4.2.1, Abb. 9). Hier wurde über die Grünfluoreszenz (FITC-Kanal) sortiert, wobei eine Anregungswellenlänge von 488 nm und ein Absorptionsfilter von 530 nm verwendet wurden.

## 3.2 Biochemische Methoden

### 3.2.1 Lösungen und Puffer

<i>RIPA-Puffer:</i>	0,5 M Tris-HCl pH 7,4; 2,5% Deoxycholat; 1,5 M NaCl, 10 mM EGTA pH 7; 1 ml NP-40 (Fluka, Deutschland); 100 mM PMSF; 100 mM Orthovanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ); 1 mg/ml Aprotinin; 1 mg/ml Leupeptin; 0,1 mg/ml Pepstatin; 100mM NaF; Aqua dest.
<i>Tris-HCl pH 8,8 :</i>	1,5 M Tris ; mit HCl auf pH 8,8 eingestellt
<i>Tris-HCl pH 6,8:</i>	1,5 M Tris; mit HCl auf pH 6,8 eingestellt
<i>Lämmli-Puffer:</i>	187,5 mM Tris; 6% SDS; 30% Glycerin; Bromphenolblau
<i>Lämmli-DTT-Puffer:</i>	2,5 ml Lämmli-Puffer; 0,6 g DTT (Dithiothreitol)
<i>10x Elektrophoresepuffer:</i>	30 g Tris; 144 g Glycin; 800 ml Aqua dest.; 10 g SDS (Natriumdodecylsulfat)

<i>1x BioRad-Dye:</i>	BioRad-Dye-Reagenz (BioRad, Deutschland) 1:5 mit Aqua dest. verdünnen
<i>PBS:</i>	Phosphat-gepufferte Salzlösung (PAN, Deutschland)

Falls nicht anders erwähnt, wurden alle Chemikalien von den Firmen Sigma (Deutschland) oder Merck (Deutschland) bezogen.

### 3.2.2 Gewinnung von Zell-Lysaten

Für die Gewinnung von Zell-Lysaten wurden bei Beendigung des jeweiligen Experiments das Medium abgenommen (bei adhären Zellen) bzw. die Zellen abzentrifugiert (bei Suspensionszellen). Das Pellet/die adhären Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend in 100 µl bis 1 ml kaltem RIPA-Puffer lysiert. Die Zell-Lysate wurden in die jeweiligen Eppendorfgefäße überführt und bei 4°C, 7 rpm für 30-60 Minuten gemischt. Es folgte eine Zentrifugation bei 13200 rpm, 4°C für 20 Minuten, um Zelltrümmer zu pelletieren. Der Überstand wurde abgenommen und in frische Eppendorfgefäße überführt. Die so erhaltenen Zell-Lysate wurden bei -20°C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

### 3.2.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Proteinbestimmung von Zell-Lysaten, die auf einer Blaufärbung und Absorption bei einer Längswelle von 595 nm beruht, wurde BioRad-Dye-Reagenz (BioRad, Deutschland), welches 1:5 mit Aqua dest. verdünnt und filtriert wurde, verwendet. Die Lysate wurden 1:10 mit Aqua dest. verdünnt, wovon für die Messung 20 µl verwendet wurden. Es wurden jeweils 1 ml BioRad-Dye-Reagenz und 20 µl Probenverdünnungen gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung erfolgte in Halbmikroküvetten (Sarstedt, Deutschland). Das BioRad-Dye-Reagenz diente als Referenz.

Um die Proteinmenge aus der Absorption bestimmen zu können, musste zusätzlich noch eine Standardkurve gemessen werden. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe einer 1 mg/ml BSA-Stammlösung (Sigma, Deutschland) hergestellt (100/200/300/400/500/600/800 µg/ml), von welcher je 20 µl für die Messung verwendet wurden.

Für die Auswertung wurde die Absorption gegen die Proteinmenge [ $\mu\text{g}$ ] auf Millimeterpapier aufgetragen, wodurch die Proteinmenge, nach Einrechnung des Verdünnungsfaktors, anhand der Standardkurve bestimmt werden konnte.

### **3.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung von Zell-Lysaten wurde in 12%igen Polyacrylamidgelen und 7,5-12,5%igen Polyacrylamid-Gradientengelen durchgeführt. Die dafür benötigten Geräte waren ein Gradientenmischer, eine vertikale Elektrophorese-Kammer (Protean II xi; Biorad, Deutschland) und ein Netzgerät (Consort E333, Deutschland).

Das Trenngel wurde hergestellt, indem eine 12,5%ige Gellösung (3ml Saccharose; 2,9 ml Aqua dest.; 5,65 ml Tris pH 8,8 ohne SDS; 6,25 ml Acrylamid (Roth, Deutschland); 75  $\mu\text{l}$  20% SDS (Sigma, Deutschland)) in die Mischkammer und eine 7,5%ige Gellösung (5,4 ml Aqua dest.; 5,65 ml Tris pH 8,8 ohne SDS; 3,75 ml Acrylamid (Roth, Deutschland); 75  $\mu\text{l}$  20% SDS (Sigma, Deutschland)) in die Reservoirkammer des Gradientenmischers pipettiert wurden. Durch Zugabe von je 50  $\mu\text{l}$  10%igem APS (Ammoniumpersulfat; Sigma, Deutschland) und je 3  $\mu\text{l}$  TEMED (N',N',N',N'-Tetramethyldiamin; Sigma, Deutschland) wurde die Polymerisationsreaktion gestartet. Für die 12%igen Gele wurde eine entsprechende Gellösung nur in die Mischkammer pipettiert.

Durch Höherstellen des Gradientenmischers (Schwerkraft) konnte das Gel bis zur gewünschten Höhe gegossen werden. Dann wurde das Gel mit Aqua dest. überschichtet, um ein Austrocknen des Gels während der Polymerisation und Bildung des Gradienten zu verhindern. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Trenngel mit einem 4%igen Sammelgel – bestehend aus 6,1 ml Aqua dest.; 2,5 ml 0,5M Tris-HCl pH 6,8 ohne SDS; 1,3 ml Acrylamid; 100  $\mu\text{l}$  10% SDS; 50  $\mu\text{l}$  APS; 10  $\mu\text{l}$  TEMED - überschichtet und der benötigte Gelkamm wurde eingesetzt.

Nach der Polymerisierung wurden die Proben für die Elektrophorese vorbereitet. Hierfür wurden je 50-80 $\mu\text{g}$  Protein/Probe mit dem gleichen Volumen Lämmli-DTT-Puffer versetzt und für 5 Minuten bei 95°C im Heizblock gekocht. Die denaturierten Proben wurden für 1 Minute bei 9000 rpm abzentrifugiert und, nach Auffüllen der Geltaschen mit Elektrophoresepuffer, auf die Gele aufgetragen.

Um die Molekulargewichte der aufgetrennten Proteine bestimmen zu können, wurde ein Gemisch von Molekulargewichtsmarken (*LMW*, low molecular weight calibration kit, Amersham, England; *HMW*, SDS-Page molecular weight standards broad range, BioRad, Deutschland) als Referenz aufgetragen:

	HMW		LMW
Myosin	200,0 kDa		
β-Galactosidase	116,25 kDa		
Phosphorylase b	97 kDa	Phosphorylase b	97 kDa
Serum Albumin	66 kDa	Albumin	66 kDa
Ovalbumin	45,0 kDa	Ovalbumin	45,0 kDa
Carbonic anhydrase	30 kDa	Carbonic anhydrase	30 kDa
Trypsin Inhibitor	21,1 kDa	Trypsin Inhibitor	20,1 kDa
Lysozyme	14,4 kDa	α-Lactalbumin	14,4 kDa
Aprotinin	6,5 kDa		

Alle Proben wurden mit Elektrophoresepuffer beschichtet und über Nacht bei 28-30 mA aufgetrennt. Am nächsten Tag wurde die Elektrophorese solange fortgeführt, bis die Lauffront des Bromphenolblau-Markers (im Lämmli-DTT-Puffer enthalten) das Ende des Trenngels erreicht hatte.

### 3.2.5 Luciferase Reporter Assay

Der Luciferase Reporter Assay (Dual luciferase reporter assay system kit, Promega, Mannheim, Deutschland) basiert auf einer Lichtfreisetzung (Lumineszenz), die durch die Umwandlung von Luciferin in Oxyluciferin stattfindet. Diese Reaktion wird durch die Firefly Luciferase, ein 62 kDa Protein, katalysiert. Mit dieser Messmethode kann die Induktion eines Gens bestimmt werden. Die Luciferasemessung wurde für die Überprüfung der Expression des Transaktivatorproteins (tTA) und für die Induzierbarkeit des Tet-off-Systems verwendet, wodurch eine Aussage über das Funktionieren des Systems möglich war.

Es wurden  $1 \times 10^6$  Zellen, mit Hilfe des Effectene Transfektionskit (Qiagen; siehe 3.1.14), mit pUHC13-3 (Gossen, 1992), pRL0 (Promega, USA) und pCMV5 (Pharmacia, Deutschland)

transfiziert. Der pUHC13-3 Vektor enthält ein tTA-Bindeelement, dem das Gen für die Firefly-Luciferase folgt, so daß bei Bindung des tTA das Gen für die Luciferase abgelesen werden kann und eine Lichtfreisetzung in Form von Lumineszenz stattfindet. Durch den pRL0 Vektor wird eine zweite Luciferase (Renilla) exprimiert, deren Lumineszenzfreesetzung durch eine pH-Verschiebung ins Saure bei 616 nm anstatt bei 562 nm detektiert wird (Behre, 1999). Es wird ein Verhältnis zwischen den beiden Reaktionen gebildet, wodurch die Aktivität ausgedrückt wird. pCMV5 diente als Füll-DNA, um gleiche DNA-Mengen für die Transfektion zu benutzen.

In dem Assay wurden die Zellen mit 0,8µg pUHC13-3, 0,05 µg pRL0 und pCMV5 ad 1µg Gesamt-DNA-Menge transfiziert. Es folgte eine Kultivierung über 24 Stunden, mit (off) und ohne (on) Doxycyclin [1 mg/ml]. Dann wurden die Zellen mit 1x Luciferase-Lysis-Puffer lysiert und laut Protokoll im TD-20/20-Luminometer (Promega, Mannheim, Deutschland) gemessen (562 nm/ 616 nm). Für die „relativen Lichteinheiten (relative light units, RLU)“ wurde ein Verhältnis von Firefly- und Renilla-Luciferase gebildet. Um die Induktion zu bestimmen, wurden die Daten der „on-Situation“ mit den Daten der „off-Situation“ ins Verhältnis gesetzt.

### 3.3 Immunologische Methoden

#### 3.3.1 Lösungen und Puffer

<i>10x Transblot (1l):</i>	72,75 g Tris; 36,63 g Glycin; 0,475 g SDS; für <i>1x Transblot</i> wurde noch 20% Methanol zugefügt.
<i>2% Trichloressigsäure:</i>	10 ml Trichloressigsäure auf 500 ml Aqua dest.
<i>Ponceau-Rot:</i>	1 g Ponceau S in 500 ml 2% Trichloressigsäure lösen; dunkel aufbewahren
<i>10x NET:</i>	1,5 M NaCl; 0,05 M EDTA pH 8; 0,5 M Tris pH 7,5; 0,5% Triton X-100
<i>1x G-NET:</i>	2,5 g Gelatine wurden in 100 ml 10x NET gelöst, aufgeköcht und gerührt, bis eine klare Lösung vorhanden war. Diese wurde mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt.

<i>10x TBS:</i>	10 mM Tris pH 8; 150 mM NaCl
<i>1x TBS-T:</i>	100 ml 10x TBS; 0,2% Tween 20; Aqua dest. ad 1 l
<i>3x TBS-T:</i>	300 ml 10x TBS; 15 ml Tween 20; Aqua dest. ad 1 l
<i>Strippinglösung:</i>	800 ml 3x TBS-T; 20 ml Mercapthoethanol; 200 ml 10% SDS
<i>4x HNTG-Puffer:</i>	200 mM HEPES pH 7,5; 600 mM NaCl; 0,4% Triton X-100; 40% Glycerol

Falls nicht anders erwähnt, wurden alle Chemikalien von den Firmen Sigma (Deutschland), Merck (Deutschland) und Roth (Deutschland) bezogen.

### **3.3.2 Immunoblot**

Die nach Towbin et al. (1979) modifiziert durchgeführte Methode des Immuno- oder Western-Blottings basiert auf einem Elektrotransfer der Proteine vom SDS-Polyacrylamidgel (s. 3.2.3) auf eine Nitrozellulosemembran (Protran, Porengröße 0,45µm, Schleicher & Schüll, Deutschland).

Die Nitrozellulosemembran (15x16 cm) wurde zusammen mit sechs gleich großen Stücken Filterpapier (Blottingpapier, Schleicher & Schüll, Deutschland) in Transblotpuffer äquilibriert. Dann wurde das Transfersandwich in der Semi-Dry-Elektrophorese Transferkammer (Trans-Blot SD, BioRad, Deutschland) wie folgt zusammengebaut: 3 Filterpapiere; Membran; SDS-Gel; 3 Filterpapiere.

Die Kathodenplatte und der Deckel wurden aufgesetzt und das Gerät wurde an ein Netzgerät (PowerPac 200, BioRad, Deutschland) angeschlossen. Der Transfer erfolgte bei 250 mA für drei Stunden.

Danach wurde die Membran kurz mit Aqua dest. gespült und mit Ponceau-Rot-Lösung angefärbt. Der Hintergrund wurde durch vorsichtiges Spülen mit Aqua dest wieder entfärbt. Die Proteinbanden auf dem Blot waren nun gut zu erkennen und konnten nach Fotokopieren zur Quantifizierung herangezogen werden.

Für die Immunfärbung musste der Blot erst eine Stunde in G-NET (Blockierungslösung), unter Schütteln, blockiert werden. Danach wurde der Blot mit dem entsprechend verdünnten primären Antikörper in G-NET über Nacht bei 4°C, unter Schütteln, inkubiert.

Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurde der Blot dreimal für je 15 Minuten in TBS-T gewaschen. Danach folgte eine einstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper (1:20000 in G-NET verdünntes HRPO (horse radish peroxidase) -gekoppeltes anti-Kaninchen- oder anti-Maus- Immunglobulin, Santa Cruz bzw. BioRad, Deutschland) bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Blot dreimal für je 15 Minuten in TBS-T und 10 Minuten in PBS gewaschen. Für die Detektion wurde ein ECL (enhanced chemiluminescence)-Kit von Amersham verwendet. Der Blot wurde für eine Minute in Substratlösung inkubiert und in eine Klarsichtfolie verpackt. Auf den Blot wurde ein Röntgenfilm (Hyperfilm<sup>TM</sup>ECL<sup>TM</sup>, Amersham, England) in einer Filmkassette (Hypercassette<sup>TM</sup>, Amersham, England) bis zu einer Stunde exponiert.

### **3.3.3 Immunopräzipitation**

Für die Immunopräzipitation wurden Zell-Lysate, wie unter 2.2 beschrieben, gewonnen und die Proteinmenge durch Proteinmessung nach Bradford (siehe 3.2.3) bestimmt. Es wurde, je nach Antikörper (monoklonal = Protein G-Sepharose (Amersham, Schweden); polyklonal = Protein A-Sepharose (Upstate, USA)), 30 µl gewaschene, gut gemischte Protein G-/A-Sepharose in Eppendorfgläsern vorgelegt und der entsprechende Antikörper (4-10 µl) zugegeben. Es folgte eine Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zell-Lysate, eingestellt auf 300 µg bis 1 mg, zugegeben und für vier Stunden bzw. über Nacht, auf dem Drehrad, bei 4°C inkubiert. Danach folgten drei Waschschriffe. Hierfür wurden die Proben abzentrifugiert (20 Sekunden bei 13200 rpm) und die Pellets in je 500 µl 1x HNTG-Puffer resuspendiert. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Nach dem letzten Waschschriffe wurden die Pellets in je 20 µl Lämmli-DTT-Puffer aufgenommen und für acht Minuten bei 95°C im Heizblock denaturiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 13200 rpm, für 20 Sekunden wurde der Überstand entweder in neue Eppendorfgläser überführt und bei -20°C gelagert, oder sofort auf das Gel aufgetragen.

### 3.4 Molekularbiologische Methoden

#### 3.4.1 Lösungen und Puffer

<i>5x TBE:</i>	54g Tris; 27,5 g Borsäure; 20ml 0,5 M EDTA pH 8,0; auf 1 l mit Milliporewasser auffüllen
<i>1x TBE:</i>	100 ml 5x TBE + 400 ml Aqua dest.
<i>0,5 M EDTA:</i>	18,61 g EDTA + 50 ml Aqua dest., dann auf pH 8,0 mit 5N NaOH einstellen; auf 100 ml mit Aqua dest. auffüllen
<i>5x KCM:</i>	5 ml 3 M KCL; 4,5 ml 1 M CaCl <sub>2</sub> , 7,5 ml 1 M MgCl <sub>2</sub> , 13 ml Aqua dest.
<i>2x LB:</i>	2g Bactotryptone; 1 g Hefeextrakt; 2 g NaCl; Aqua dest. ad 100 ml; autoklavieren
<i>TBS-Medium:</i>	75 ml 2x LB; 7,5 ml DMSO; 1,5 ml 1 M MgCl <sub>2</sub> ; 1,5 ml 1 M MgSO <sub>4</sub> ; 15 g PEG 4000, Aqua dest. ad 150 ml; steril filtrieren
<i>LB-Medium:</i>	25 g Luria Broth Base für 1 l Aqua dest.
<i>LB-Platten:</i>	37 g Luria Agar für 1 l Aqua dest.; bei Ampicillin-Platten, + 50 µg/ml Ampicillin
<i>Ampicillin:</i>	50 mg/ml in Aqua dest., bei -20°C gelagert
<i>LB-/LB-Agar-Medium:</i>	fertiges Pulver von Gibco BRL; laut Vorschrift in Aqua dest. gelöst
<i>RNA-Ladepuffer:</i>	10 ml Formamid, 3 ml Formaldehyd, 2 ml 10x MOPS-Puffer, 2 ml Bromphenolblau (1%-ig), 3 ml steriles Aqua dest.; in 1 ml-Aliquots einfrieren
<i>10x MOPS-Puffer:</i>	0,2 M MOPS; 0,05 M Na-Acetat; 0,01 M EDTA; mit 10 N NaOH auf pH 7,5 einstellen
<i>1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:</i>	178g auf 1000 ml steriles Aqua dest.
<i>1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:</i>	69 g auf 500 ml steriles Aqua dest.
<i>20% SDS:</i>	100g SDS in 500 ml sterilem Aqua dest. lösen, leicht erwärmen
<i>Churchpuffer:</i>	400 ml 1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> mit 100 ml 1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mischen; pH muß

bei 7,1-7,2 sein; 350 ml 20% SDS zugeben; 2 ml 0,5 M EDTA zugeben; mit sterilem Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen und gut mischen

*Northern-Waschpuffer:* 1% SDS (100 ml), 0,1% SSC (5 ml), ad 1l steriles Aqua dest.

*SSC (20x):* 3M NaCl; 0,3 M Na-Citrat; auf pH7 einstellen; autoklovieren

Falls nicht anders erwähnt, wurden alle Chemikalien von den Firmen Sigma (Deutschland), Gibco BRL (Deutschland), Merck (Deutschland) und Difco (Deutschland) bezogen. Die verwendeten Enzyme wurden von der Firma NEB (Deutschland) bezogen.

### 3.4.2 Restriktionsenzymatischer Verdau von Plasmid-DNA

Zur Charakterisierung oder Isolierung von DNA-Fragmenten wurden die Plasmide mit Restriktionsenzymen (RE) verdaut. Für den Verdau wurde folgender Ansatz gemacht:

0,1 – 5 µg DNA (analytisch-präparativ)

(0,2 µl BSA (NEB, Deutschland))

2 µl 10x-RE-Puffer

0,5-1 µl RE (10-20 U/µl)

ad 20 µl Aqua dest.

Der Verdau erfolgte bei 37°C für zwei bis drei Stunden. Zur Kontrolle des Verdaus wurde die DNA auf ein Agarosegel aufgetragen.

### 3.4.3 Auftrennung von DNA im Agarosegel

DNA kann im Agarosegel ihrer Größe nach analytisch und präparativ aufgetrennt werden. Es wurden Agarose/1xTBE-Gele mit einem Anteil von einem Prozent Agarose (Gibco BRL, Deutschland) zur Auftrennung verwendet. Die DNA-Proben wurden mit 6x Probenpuffer (Promega) versetzt und in die Geltaschen eingefüllt.

Nach dem Gellauf wurde das Agarosegel in einer Ethidiumbromidlösung [0,5 µg/ml] (Roth, Deutschland) für zwanzig Minuten bei Raumtemperatur, unter leichtem Schütteln, gefärbt. Die DNA konnte, durch die Einlagerung des Ethidiumbromids, unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

### 3.4.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Isolation der im Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe des QIAEX II Gel Extraction Kit von Qiagen (Deutschland). Die gewünschten DNA-Banden wurden aus dem Agarosegel mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und dem Protokoll entsprechend aufgereinigt. Die gereinigte DNA wurde zur Kontrolle nochmals auf ein Agarosegel aufgetragen.

### 3.4.5 Vervielfältigung von DNA mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten kann die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) eingesetzt werden. Dieser Vorgang besteht aus drei Reaktionsschritten. Zuerst wird die Template-DNA zusammen mit den Primern denaturiert. In dem darauffolgenden Schritt können sich die Primer bei einer spezifischen Temperatur an das Template anlagern und werden im dritten Schritt durch die Taq-Polymerase (Temperatur unempfindliche Polymerase) zu einem, dem Template entsprechenden, Strang verlängert. Die Wiederholung dieser Dreischritt-Reaktion führt zur Anreicherung des zu amplifizierenden DNA-Bereiches. Zu Beginn der Zyklusperiode wurden die Ansätze für drei Minuten bei 94°C denaturiert. Anschließend wurde die Taq-Polymerase, während einer Temperaturabsenkung auf 80°C für eine Minute, zu den Ansätzen hinzugefügt (Hot Start). Danach erfolgte die eigentliche PCR-Reaktion.

PCR-Ansatz: 5  $\mu$ l 10x Taq-Puffer  
 5  $\mu$ l 25 mM MgCl<sub>2</sub>  
 1  $\mu$ l 100mM dNTP-Mix  
 10 ng DNA-Template  
 1  $\mu$ l Primer 1 (1:10 Verdünnung)  
 1  $\mu$ l Primer 2 (1:10 Verdünnung)  
 ad 50  $\mu$ l Aqua dest.

1  $\mu$ l Taq-Mix (7  $\mu$ l Aqua dest. ; 1  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> [25 mM] ; 1  $\mu$ l 10x Taq-Puffer ;  
 1  $\mu$ l Taq Polymerase [5U/ $\mu$ l], Takara, Japan)

PCR-Sequenz (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer, Deutschland bzw. Cyclone 25,  
 Peqlab Biotechnologie GmbH, Deutschland) :

94°C-3 Minuten → 80°C-1 Minute ⇒ 94°C-1 Minute → 61°C-1 Minute → 72°C-1 Minute ⇒

---

Hot Start

4 Zyklen

94°C-1 Minute → 72°C-1 Minute → 72°C-5 Minuten ⇒ 4°C - ∞

---

24 Zyklen

∞

Die PCR-Reaktion wurde dann zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen und zusätzlich noch durch Sequenzierung überprüft.

### 3.4.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation werden freie Enden des DNA-Vektors mit Hilfe der T4-DNA-Ligase mit freien Enden des DNA-Inserts verbunden. Freie Enden (überstehend oder kohesiv) entstehen durch den Verdau der DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen (siehe 3.4.2). Bei Bedarf können überhängende Enden aufgefüllt werden (siehe 3.4.6.3). Um die Ligation effizienter zu

machen, können die Enden des Vektors dephosphoryliert werden (siehe 3.4.6.2). Ein Teil des Ligationsansatzes wurde dazu verwendet kompetente Bakterien zu transformieren (siehe 3.4.8).

#### **3.4.6.1 Auffüllen von 5'-Überhängen (Klenow-Reaktion)**

Der DNA-Verdau (20  $\mu$ l) wurde mit 0,8  $\mu$ l 2,5 mM dNTP-Mix (TaKaRa, Japan) und 1-5 Units Klenow-PolymeraseI (NEB, Deutschland) gemischt und für 15 Minuten bei 30°C inkubiert. Es folgte eine Inaktivierung durch Inkubation bei 75°C für 10 Minuten (oder durch Zugabe von 1  $\mu$ l 0,5 M EDTA).

#### **3.4.6.2 Dephosphorylierung des Vektors**

Um eine Religation des Vektors zu verhindern und die Ligation so effektiver zu machen, kann der Vektor vor der Aufreinigung über das Gel dephosphoryliert werden. Es wurde, nach Beendigung des Verdau, 1  $\mu$ l AP-CIP (Calf intestine alkaline phosphatase; 10U/ $\mu$ l; NEB, Deutschland) zu 20  $\mu$ l Verdauansatz gegeben und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Für die Inaktivierung wurde 1  $\mu$ l 0,5 M EDTA zugefügt und für weitere 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Der so behandelte Vektor wurde über ein Agarosegel aufgereinigt und dann für die Ligation verwendet.

### 3.4.6.3 Sticky-end-Ligation

Für die Sticky-end-Ligation wurde folgender Ansatz verwendet:

0,5 µg Vektor-DNA  
5-10-fache Menge an Insert-DNA  
ad 17 µl Aqua dest.

Inkubation für 5 Minuten bei 45°C (für das Anlagern der DNA-Fragmente), danach Zugabe von

2 µl 10x T4-Ligase-Puffer (NEB, Deutschland)  
1 µl T4-DNA-Ligase (100U/µl ; NEB, Deutschland)

Die Ligation fand bei 16°C für vier Stunden oder über Nacht statt.

### 3.4.6.4 Blunt-end-Ligation

Die Blunt-end-Ligation wurde wie unter 4.5.3 beschrieben angesetzt, allerdings ohne die fünfminütige Inkubation bei 45°C. Ebenso wurde ein 5x Ligasepuffer mit PEG4000 (Boehringer Mannheim, Deutschland) (1 Volumen 10x T4-Ligase-Puffer + 1 Volumen 50% PEG4000) als 1x Puffer und 10 bis 100-fach mehr Ligase verwendet. Die Ligation fand bei Raumtemperatur, über Nacht statt.

### 3.4.7 Herstellung kompetenter Bakterien

Für die Herstellung der kompetenten Bakterien (*E. coli epicurian XLI-blue* (Stratagene, Deutschland)) wurde zunächst eine Kultur des Bakterienklons in 3 ml LB-Medium angesetzt und bei 37°C, über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden 1,5 ml dieser Übernachtskultur in 150 ml LB-Medium überführt und solange bei 37°C, unter Schütteln, kultiviert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,6 erreicht wurde. Dann wurden die Bakterien bei 4000-5000 rpm für 10 Minuten, bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde, auf Eis, mit

15 ml kaltem TSB-Medium resuspendiert. Die so behandelten Bakterien wurden für weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend zu je 100 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden für 60 Minuten auf Trockeneis schockgefroren. Danach konnten die kompetenten Bakterien bei -80°C gelagert werden.

### **3.4.8 Transformation von kompetenten Bakterien**

Bei der Transformation wird die Zellmembran von kompetenten Bakterien kurzzeitig durchlässig gemacht, so daß Plasmide aufgenommen werden können. Die Bakterien, die diese Plasmide aufgenommen haben, können in Selektionsmedium wachsen und vermehren so auch die Plasmid-DNA.

Für die Transformation wurden 100 µl kompetente Bakterien (1 Aliquot), wovon je Ansatz 25 µl verwendet wurden, ca. 15 Minuten vor der Transformation auf Eis aufgetaut. Es wurden 1-10 µl DNA (0,1-1 µg) mit 5 µl 5x KCM und Aqua dest. ad 50 µl vorgelegt. Dann wurden 25 µl kompetente Bakterien vorsichtig zugefügt. Der Ansatz wurde für 20 Minuten auf Eis und dann für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 250 µl LB-Medium zugegeben. Es folgte eine Inkubation, unter Schütteln, bei 37°C für eine Stunde (in dieser Zeit kann das Resistenzgen exprimiert werden). Von dem Transformationsansatz wurden 150 µl auf eine LBamp-Platte (Ampicillin [100 µg/ml]) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

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

Das Prinzip dieser Präparationsmethode beruht auf der alkalischen Lyse der Zellen und dem unterschiedlichen Verhalten von chromosomaler und Plasmid-DNA im basischen Milieu. Während die zirkuläre, superhelikale Plasmid-DNA im basischen Bereich intakt bleibt, wird die bakterielle chromosomale DNA dabei irreversibel denaturiert.

### **3.4.9.1 Minipräparationen**

Eine Bakterienkolonie wurde im Eppendorfggefäß in 1 ml LBamp-Medium über Nacht bei 37°C, unter Schütteln, inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Kultur bei 13200 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100µl Puffer P1 (Qiagen: 50 mM Tris/HCl; 10 mM EDTA; 400 µg RNase A /ml, pH 8) resuspendiert. Durch die Zugabe von 100 µl 0,2 N NaOH/1% SDS wurde die DNA, während einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur, denaturiert. Danach wurde das Gemisch für fünf Minuten, bei Raumtemperatur mit 80 µl 3M KAc pH 4,8 inkubiert, um die Reaktion zu neutralisieren. Es folgte eine Zentrifugation für fünf Minuten bei 13200 rpm. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfggefäß überführt, und zum Fällen der DNA wurden 170 µl reiner Isopropanol zugegeben. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde das Pellet einmal mit 70% Ethanol (rein) gewaschen. Das Pellet wurde für ca. fünf Minuten bei 37°C getrocknet und dann in 50 µl sterilem Aqua dest. gelöst. Zur Kontrolle der DNA und für Restriktionsanalysen wurden ca. 8 µl dieses Eluats eingesetzt. Wenn die DNA für Sequenzierungen oder Expressionstests in der Zellkultur verwendet werden sollte, wurde die Minipräparation mit Hilfe des QIAprep-spin Miniprep Kit (Qiagen, Deutschland) nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

### **3.4.9.2 Maxipräparation**

Die Präparation größerer DNA-Mengen wurde mit dem Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Deutschland) durchgeführt. Pro Ansatz wurden 200 ml LB-Übernachtskultur aufgereinigt. Von den Bakterienkulturen wurden je ein bis zwei Portionen (0,93 ml) mit DMSO (70 µl) versetzt und bei -80°C gelagert. Daraus konnten bei Bedarf, ohne erneute Transformation, Übernachtskulturen für weitere Maxipräparationen angesetzt werden.

### **3.4.10 Präparation von RNA aus Zelllinien**

Die Präparation der RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen, Deutschland) durchgeführt. Dafür wurden die Zellen ( $5 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$ ) bei 300 g für fünf Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde komplett verworfen. Das Zellpellet wurde durch

leichtes Klopfen gelockert. Um die Zellen zu lysieren, wurde 600 µl RLT-Puffer, der mit β-Mercapthoethanol versetzt worden war, zugegeben und durch Vortexen gemischt. Dann wurde das Lysat auf eine QIAshredder Säule gegeben und für zwei Minuten bei 13200 rpm zentrifugiert, wodurch die Zellen homogenisiert wurden. Zu dem Durchfluß (homogenisierte Zellysate) wurde ein Volumen 70% Ethanol gegeben und mit der Pipette gemischt. Danach wurden 700 µl Probe auf eine RNeasy Mini Spin Säule gegeben und für 15 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen. Dieser Schritt wurde wiederholt, bis kein Lysat mehr vorhanden war. Dann wurden 700 µl RW1-Puffer zugegeben und für 15 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule in ein neues Gefäß gesetzt und es wurden 500 µl RPE-Puffer zugegeben. Es folgte eine Zentrifugation bei 10000 rpm für 15 Sekunden. Der Schritt wurde wiederholt, wobei die Zentrifugation jetzt bei 13200 rpm für zwei Minuten stattfand, um die Membran zu trocknen. Danach wurde die Säule in ein Eppendorfgefäß gesetzt und die RNA wurde mit 50 µl RNasefreiem Wasser eluiert. Dies geschah durch eine weitere Zentrifugation bei 10000 rpm für eine Minute. Die so erhaltene RNA wurde bei -80°C gelagert.

#### **3.4.11 RNA-Quantifizierung**

Um RNA zu quantifizieren, wurde die Extinktion bei 260 nm gemessen, wobei eine  $A_{260} = 1$  einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml entspricht. Die Extinktion sollte außerdem mindestens 0,15 sein, um signifikante Messwerte zu erhalten.

Für die Messung wurde eine 1:50 Verdünnung der RNA-Probe gemacht, und die Extinktion wurde sowohl bei 260 nm als auch bei 280 nm gemessen, um auch die Qualität der RNA bestimmen zu können. Die Konzentration der RNA in µg/ml berechnete sich nach folgender Formel:  $40 \times A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}$

Die Qualität der RNA ließ sich durch die Bildung des Verhältnisses aus der Extinktion bei 260 nm und bei 280 nm bestimmen ( $A_{260}/A_{280}$ ). Bei guter Qualität sollte der Wert aus diesem Verhältnis bei 1,9 bis 2 liegen.

### **3.4.12 Umschreibung von RNA in cDNA**

Die Umschreibung von RNA in cDNA wurde mit Hilfe des Omniscript™ Reverse Transcriptase Kit (Qiagen, Deutschland) durchgeführt. Es wurde je 1 µg RNA verwendet. Vor Beginn der Umschreibung wurde der RNase-Inhibitor (RNAsin; Perkin-Elmer; Deutschland) auf eine Endkonzentration von 10 U/ml in 1x RT-Puffer verdünnt. Dann wurde ein frischer Mastermix, auf Eis, hergestellt. Für ein totales Volumen von 20 µl wurde der Ansatz wie folgt pipettiert:

2 µl 10xPuffer, 2 µl 5mM dNTP Mix, 2 µl Oligo-dT Primer [10 µM] (Perkin-Elmer, Deutschland), 1 µl RNasin (10U/µl), 1 µl Omniscript Reverse Transcriptase [4 U/µl], RNasefreies Wasser ad 20 µl.

Der Ansatz wurde für 60 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend bei -20°C gelagert. Die so erhaltene cDNA wurde für PCR- bzw. Real-time-PCR-Reaktionen verwendet.

### **3.4.13 Northern Blot**

Für die RNA-Analyse wurde neben einer Real-time-PCR auch eine Northern Blot Analyse durchgeführt. Hierfür wurde die aus den Zellen gewonnene RNA (siehe 3.4.10) verwendet. Es wurden je 10 µg RNA, nach Einengung, mit Ladebuffer und 5 µl 1% Ethidiumbromid versetzt und kurz aufgekocht. Anschließend wurden die Proben auf ein Formaldehydgel (1%) aufgetragen. Das Gel lief über Nacht bei 20 V. Nach Beendigung des Laufs wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert, um den Marker später zuordnen zu können.

Das Gel wurde über Nacht mit 10x SSC geblottet. Hierfür wurde zum ständigen Flüssigkeitstranfer mit Whatmanfiltern eine Brücke in 10x SSC gebaut und darauf zunächst das Gel gelegt. Danach wurde eine Hybond N+ Membran (Amersham, Deutschland) in der Größe des Gels geschnitten, kurz mit Wasser befeuchtet und glatt auf das Gel gelegt. Zur Markierung wurde eine Ecke abgeschnitten (bei der ersten Probe). Dann wurden zwei Lagen angefeuchteter Whatmanfilter, eine dicke Schicht Zellstoff und eine Glasplatte darauf gestapelt. Der Blot wurde mit einem Gewicht beschwert und erst am nächsten Tag wieder abgebaut. Nach Abbau des Blots wurde die Membran kurz in 5x SSC geschwenkt, angetrocknet und durch Bestrahlung mit UV-Strahlen (UV-Stratalinker 2400; Stratagene, Deutschland) gecrosslinkt. Dadurch wurde die RNA an die Nylonmembran gebunden.

Vor der Hybridisierung mußte die Sonde radioaktiv markiert werden. Hierfür wurde das Randomprime-System von Amersham ( $P^{32}$ -dCTP; Amersham, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Anschließend wurde die Sonde über eine Nick-Column (Amersham, Deutschland) aufgereinigt. Dafür erfolgten drei Elutionen mit je 400/400/100  $\mu$ l 1x TE. Für die Markierung wurden 20-30 Millionen DPM aus dem zweiten Eluat eingesetzt. Die Sonde wurde für 10 Minuten bei 95°C aufgeköcht, kurz abgekühlt und abzentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde die Membran in 65°C warmem Waschpuffer solange gewaschen, bis der Blaumarker abgewaschen war und anschließend mindestens eine Stunde bei 65°C in 20 ml Churchpuffer vorhybridisiert.

Für die Hybridisierung wurde die markierte Sonde in 20 ml Churchpuffer überführt und in die Röhre mit der Membran gegeben. Die Hybridisierung lief über Nacht bei 65°C.

Am nächsten Morgen wurde die Membran zweimal 15 Minuten mit Waschpuffer, bei 65°C gewaschen, in eine Folie eingepackt und ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Filmkassette wurde bei -80°C gelagert und der Film nach 24 Stunden entwickelt. Falls nötig wurde eine längere Exposition angeschlossen.

#### **3.4.14 Real-time-PCR**

Für die Real-time-PCR wurden Primerpaare für c-myc, bcl-x<sub>L</sub> aus der Literatur entnommen (Decallonne, 2000) und in einfachen PCR-Reaktionen optimiert (Temperatur; MgCl<sub>2</sub>-Konzentration), so daß nach der PCR nur das spezifische Produkt vorhanden war. Die Real-time-PCR wurde mit Hilfe des Light Cycler-Fast Start DNA Master SYBR Green I Kit (Roche, Deutschland) durchgeführt. Das benutzte Gerät war ein LightCycler<sup>TM</sup> von der Firma Roche (Deutschland).

Bei der Real-time-PCR wurde eine interne Kontrolle (Standard, hier G6PD) und ein Housekeeping-Gen benötigt, um abschätzen zu können, ob gleiche Mengen an RNA benutzt wurden, und um später die „Fold induction“ berechnen zu können. Als Housekeeping-Gen wurde GAPDH (LightCycler<sup>TM</sup>-Primer Set; search LC, Deutschland) verwendet. Für die Standardreihe wurden verschiedene Verdünnungen von Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (pGdBBX; Emig, 1999) angesetzt (100 pg; 10 pg; 1 pg; 100 fg), die immer mitgemessen wurden. Die Standards wurden immer doppelt angesetzt und gemessen. Um eine Real-time-

PCR anzusetzen wurde zuerst je ein Mastermix für die Standards sowie für die Proben wie folgt hergestellt:

	µl	Die cDNA bzw. der Standard wurde in PCR-Tubes, auf Eis, vorgelegt. Dann wurden je 18 µl Mastermix zugegeben und mit der Pipette vorsichtig gemischt. Die Kapillaren wurden in den Kühlblock gestellt und der cDNA-Mix luftblasenfrei hineingegeben.
dH <sub>2</sub> O	12,2	
MgCl <sub>2</sub> (4mM)	2,4	
5' Primer	0,7	
3' Primer	0,7	
10xPuffer(1a + 1b)	2	Die Schmelz-/Annealingtemperatur und die Zyklenzahl ist je nach verwendetem Primerpaar eingestellt worden (siehe 3.8). Je nach benötigtem Standard konnten die Messungen in einem oder in zwei getrennten Läufen durchgeführt werden. Die errechneten Messwerte wurden dann mit den
cDNA/Standard	2	

errechneten Standardwerten ins Verhältnis gesetzt. Von diesen Verhältnissen wurde die Negativkontrolle als eins gesetzt und dann konnte die „Fold induction“ berechnet werden. Als Kontrolle wurden die PCR-Produkte auf einem 2% igen Agarosegel aufgetrennt.

### 3.5 Liste der Oligonukleotide

#### *Primer für STAT3D, Klonierung in pTRE2*

STAT3 FW BamHI (m) 5'-CGG GAT CCG CCA CCA TGT ACC CAT ACG ACG-3'  
 STAT3 RV(m) HindIII 5'-CAC ACG ATG GAG GGG GTA CAC TCC CAA GCT T-3'

#### *Sequenzierprimer für pTRE2-STAT3-Konstrukte*

SeqPrimer pTRE2-Ligat 5'-CAT CCA CGC TGT TTT GAC C-3'

#### *Sequenzierprimer für STAT3C*

SeqPrimer STAT3C 0201 5'-TGG AAA AGG ACA TCA GTG G-3'

*Primer für Maus-GAPDH-Sonde, Northern-Blot (Isabel Schlosser, KMolbio, GSF-Hämatologikum, München, Deutschland)*

5'-rGAPDH-21      5'-CAT AGA CAA GAT GGT GAA GGT CGG-3'  
 3'-rGAPDH-746      5'-GAT ACA TTG GGG GTA GGA ACA CG-3'

*Primer für die Real-time-PCR*

m bcl-xl RT Prim FW      5'-CAC TGT GCG TGG AAA GCG TA-3'  
 m bcl-xl RT Prim Rev      5'-AAA GTG TCC CAG CCG CC-3'  
 m c-myc RT Prim FW      5'-TGA GCC CCT AGT GCT GCA T-3'  
 m c-myc RT Prim Rev      5'-ACG CCG ACT CCG ACC TCT T-3'  
 G6PD1      5'-CCG GAT CGA CCA CTA CCT GGG CAA G-3'  
 G6PD2      5'-GTT CCC CAC GTA CTG GCC CAG GAC CA-3'

### 3.6 Plasmide

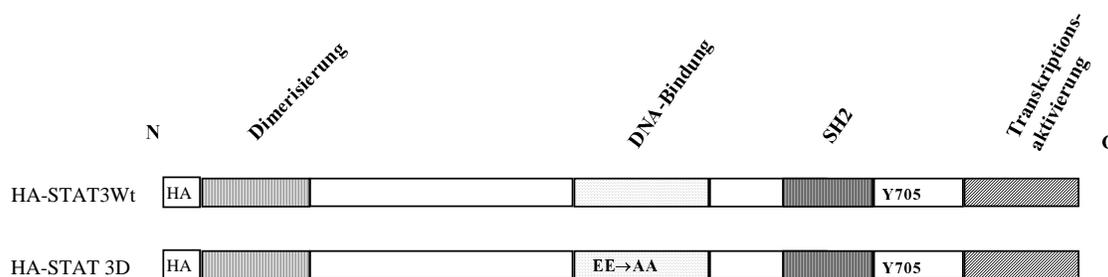
pEFBosHA-STAT3WT/3D/3F	Masahiko Hibi, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan
rtTaneo-tTA	Timm Schroeder, GSF München, Deutschland
pTRE2	Clontech, Deutschland
pPur	Karin Forster, KKG-Gentherapie, GSF-Hämatologikum, München, Deutschland; ursprünglich: Clontech, Deutschland
pCDNA6A	Michael Schäffer, KKG-Gentherapie, GSF-Hämatologikum, München, Deutschland; ursprünglich: Invitrogen, Deutschland
pCDNA6A-BCR/ABL	Karsten Spiekermann, KKG-Leukämie, GSF-Hämatologikum, München, Deutschland; BCR/ABL ursprünglich: Markus Warmuth KKG-Gentherapie, GSF-Hämatologikum, München, Deutschland
pCDNA6A-TEL/ABL	Karsten Spiekermann, KKG-Leukämie, GSF-Hämatologikum, München, Deutschland

pCDNA6A-TEL/JAK2	Karsten Spiekermann, KKG-Leukämie, GSF-Hämatologikum, München, Deutschland
pCDNA6A-STAT3C-Flag	Karsten Spiekermann, KKG-Leukämie, GSF-Hämatologikum, München, Deutschland
RCCMV-STAT3C-Flag	Jacqueline Bromberg, Rockefeller Universität, New York, USA
MIY	Christian Buske, KKG-Leukämie, GSF-Hämatologikum, München, Deutschland
MIY-STAT3WT/3D/3C	kloniert in der Ag Spiekermann, KKG-Leukämie, GSF-Hämatologikum, München, Deutschland
MIY-C-Kit WT/D816V	kloniert in der Ag Spiekermann, KKG-Leukämie, GSF-Hämatologikum, München, Deutschland
pGdBBX (G6PD)	Annika Elsässer, KKG-Leukämie, GSF-Hämatologikum, München, Deutschland; ursprünglich: Emig et al., 1999
pMyc54	Dirk Eick, KMolbio, GSF-Hämatologikum, München, Deutschland; ursprünglich: Stanton L. W., Nature 1984 (310)
pUHC13-3	Karin Forster, KKG-Gentherapie, GSF-Hämatologikum, München, Deutschland; ursprünglich: Gossen H., PNAS 1992
pRL0	Annika Elsässer, KKG-Leukämie, GSF-Hämatologikum, München, Deutschland; ursprünglich: Promega, USA
pCMV5	Annika Elsässer, KKG-Leukämie, GSF-Hämatologikum, München, Deutschland; ursprünglich: Pharmacia, Deutschland
pCDNA3-Ras-Mutanten	Doro Kühlmann, Universität Dortmund, Ag Wittinghofer, Dortmund, Deutschland

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Stabile Expression einer dominant-negativen STAT3-Mutante in AML-Zelllinien mit Hilfe eines Tet-off-Systems

Durch dominant-negative Mutanten von STAT3 (STAT3D), welche durch Einführen von Punktmutationen entweder in die DNA-Binde- oder in die Transaktivierungsdomäne erhalten wurden (Nakajima, 1996; Horvath, 1995) wurde die Rolle von STAT3 in der Pathogenese der AML untersucht. STAT3D hat eine Mutation in der DNA-Bindedomäne (EE  $\rightarrow$  AA), wodurch dieses Protein einen dominant-negativen Effekt erhält. Dieser äußert sich darin, daß eine Dimerisierung von STAT3WT- und STAT3D-Monomeren stattfindet, eine DNA-Bindung aber nicht möglich ist. Dadurch wird die Signalweiterleitung durch STAT3 unterbrochen. Dieser Effekt konnte von Nakajima et al. durch transiente Transfektionsexperimente mit STAT3D in Luciferase Reporter Assays für den IL-6 Signalweg gezeigt werden (Nakajima, 1996). Die in Abb. 2 schematisch dargestellte dominant-negative Mutante von STAT3 wurde in dieser Arbeit für die Etablierung des Tet-Off-Systems verwendet.



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der funktionellen Proteindomänen von STAT3 Wildtyp und der in dieser Arbeit verwendeten Mutante STAT3D.

Es wurde ein induzierbares Tet-off System gewählt, da dadurch die durch STAT3D auftretenden Effekte besser untersucht und eingeordnet werden können. Die antiproliferative

Wirkung des Proteins und eine toxische Konzentration von stark überexprimiertem STAT3 in der Zelle, die in einem stabilen Expressionssystem auftreten, machen eine Untersuchung der Rolle von STAT3 in der Pathogenese der AML schwer. In einem induzierbaren System dagegen läßt sich die Expression von STAT3 kontrollieren. Dadurch ist es möglich, den antiproliferativen und differenzierungsfördernden Effekt dieses Proteins näher zu charakterisieren und die Rolle von STAT3 zu untersuchen.

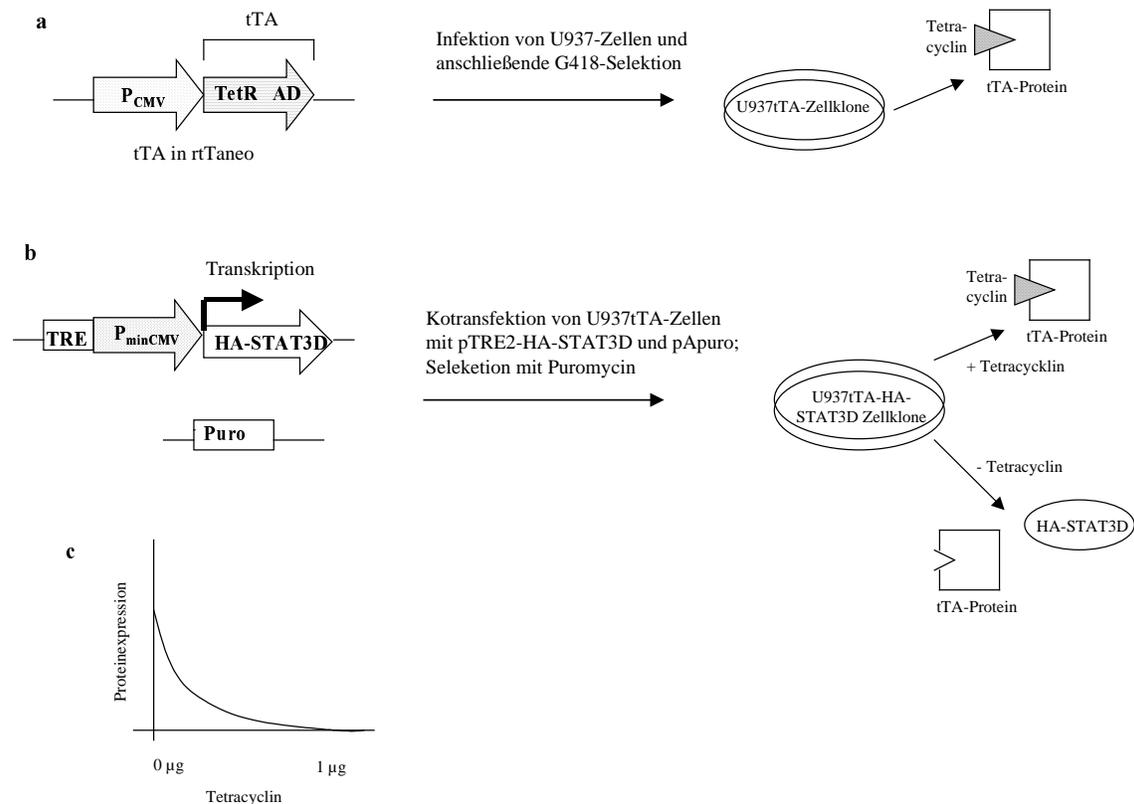
Als Zelllinie wurde in diesem System U937-Zellen verwendet, da dies eine humane AML-Zelllinie ist, die ihre Differenzierungsfähigkeit noch besitzt. Diese Zellen exprimieren konstitutiv STAT3 (Biethahn, 1999), so daß ein Effekt durch eine dominant-negative Mutante von STAT3 zu erwarten ist. Wir vermuten, daß sich dieser durch eine Wachstumsverlangsamung und Förderung der Differenzierung äußert.

Bei dem hier verwendeten Tet-off System handelt es sich um ein High-Level-Expressionssystem, welches von Bujard und Gossen (Gossen und Bujard, 1992) entwickelt worden ist. Es erlaubt eine hohe, regulierte Genexpression als Reaktion auf variierende Konzentrationen von Tetracyclin oder seinen Derivaten, wobei die Expression des Zielgens in Abwesenheit von Tetracyclin induziert und in Anwesenheit von Tetracyclin reprimiert wird (siehe Abb. 3). Das Tet-off System besitzt einige Vorteile, die die geringen Nachteile dieses Systems und die einer unregulierten Genexpression überwiegen. Eine genaue an/aus Regulation ist ebenso möglich wie eine geringe Hintergrundexpression ohne Induktion. Es gibt keine pleiotropen Effekte, da der Tet-Repressor spezifisch an seine Zielsequenzen bindet. Eine hohe Induzierbarkeit, sowie eine schnelle Reaktionszeit (Induktion innerhalb von 30 Minuten detektierbar) ist vorhanden. Zusätzlich sind die absoluten Expressionslevel hoch und auch der Inducer ist gut charakterisiert (Gossen, 1992; Clontech, Deutschland).

Das Tet-off-System wurde hier verwendet, da sich durch die Induzierbarkeit der Effekt der dominant-negativen Mutante von STAT3 genau einordnen läßt, sowie die biologische Funktion von STAT3 untersucht und charakterisiert werden kann. Dabei waren die folgenden drei Punkte von Interesse:

- a) Etablierung eines induzierbaren Expressionssystems.
- b) Proliferation und Apoptoseresistenz der stabilen Zelllinie.
- c) Morphologische Veränderungen der Zelle durch die Expression der dominant-negativen Mutante.

Für die stabile Expression der dominant-negativen STAT3-Mutante wurde das Tet-off System in U937-Zellen eingebracht. Das System besteht aus zwei Komponenten, dem Regulator- und dem Response-Plasmid, welche wichtig für die Regulation der Genexpression sind. Das Regulatorplasmid exprimiert einen tet-kontrollierten Transaktivator (tTA-Protein). Dieses Protein kann nur an das pTRE2-Response-Plasmid, das das „gene of interest“ (dominant-negatives STAT3) enthält, binden, wenn kein Tetracyclin (oder Derivate) vorhanden ist. Dieses System erlaubt eine induzierbare Expression des Zielgens, die durch die Konzentration von Tetracyclin im Medium reguliert werden kann. Eine schematische Darstellung des Systems ist in Abb. 3 gezeigt.



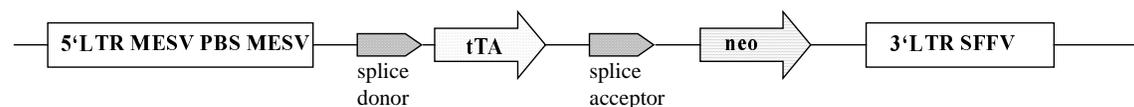
**Abb. 3: Schematische Darstellung des Tet-off Systems.**

Der tet-kontrollierte Transaktivator (tTA) ist ein Fusionsprotein aus dem Wildtyp Tet Repressor (TetR) und der Aktivierungsdomäne (AD) des Herpes simplex Virus, das in das retrovirale rtTaneo-Plasmid kloniert wurde, welches eine G418-Resistenz trägt. Das Zielgen ist in ein Plasmid mit einem Tet response element (TRE) kloniert. **a:** Etablierung von stabilen Transaktivator-Zellen durch Infektion und Selektion. Die erhaltenen Zellen produzieren das tTA-Protein. **b:** Etablierung stabiler tet-induzierbarer Zellen durch Kotransfektion des Zielgens und eines Resistenzplasmids (pPur). Eine Transkription des Zielgens findet nur in Abwesenheit von Tetracyclin statt, da dann das tTA an TRE binden kann. **c:** Regulation der Proteinexpression durch verschiedene Tetracyclin-Konzentrationen.

#### 4.1.1 Generierung von U937tTA-Klonen

Für die Generierung von U937tTA-Zellen wurde die Producerzelllinie PA317infTA (Timm Schroeder, GSF München) verwendet. Um diese Zelllinie zu erhalten wurde zuerst das Gen für den Transaktivator des Tet-off Systems in ein rtTaneo-Plasmid kloniert, welches zwei long terminal repeats (LTR) und eine Neomycin-Resistenz besitzt (Timm Schroeder, GSF München; siehe Abb. 4). Mit diesem Konstrukt wurde die ecotrope Virus-Verpackungszelllinie GPE86 transfiziert, die das Plasmid in einem Virus verpackt an ihr Medium abgibt. Dieser virale Überstand wurde für die Infektion von PA317-Zellen verwendet.

Die PA317-Zelllinie ist eine amphotrope Virus-Verpackungszelllinie, die für die Virushüllproteine wichtige Virus-DNA in ihr Genom integriert hat. Dadurch produziert sie wichtige Strukturproteine des Virus-Partikels. Für die Etablierung der PA317infTA-Zelllinie wurden die PA317-Zellen stabil mit viralem rtTaneo-tTA Überstand infiziert. Durch die Integration der Information für den Transaktivator in das Zellgenom wird von den Zellen Transaktivator-RNA gebildet. Diese RNA wird von Strukturproteinen des Virus-Partikels eingepackt und von den Zellen ins Medium entlassen. Das so konditionierte Medium konnte dann für die Generierung von stabilen U937tTA-Zellen verwendet werden.



**Abb. 4:** Schematische Darstellung des retroviralen tTA-Konstrukts.

Das tTA-Gen ist in ein rtTaneo-Plasmid kloniert. Es liegt vor einem Neomycin-Resistenzgen und zwischen zwei LTRs.

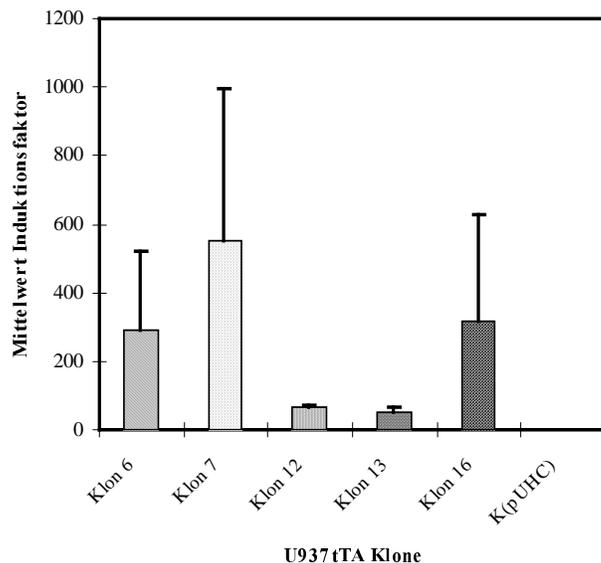
Für die Generierung von U937tTA-Zellen wurde das, von den PA317infTA-Zellen konditionierte Medium abzentrifugiert und filtriert, um vorhandene vitale Zellen zu entfernen. Dann wurden U937-Zellen mit diesem viralen Überstand durch Spininfektion infiziert. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel und nach weiteren 24 Stunden wurden die infizierten Zellen zur Selektion in Softagar mit 1 mg/ml G418 kloniert. Nach einer Selektion von circa

zwei Wochen konnten Zellklone gepickt werden, welche in Selektionsmedium expandiert wurden.

Zur Auswahl der Transaktivatorklone wurde die Expression des tTA-Proteins und die Induzierbarkeit des Systems durch einen Luciferase-Reporter-Assay überprüft. Hierfür wurden die Zellen transient mit einem pUHC13-3 Plasmid (Gossen, 1992) transfiziert. Dieses Plasmid ist ein Reporterplasmid, das einen humanen CMV-Minimalpromoter mit sieben Tet-Operatorsequenzen, an welche das tTA-Protein binden kann, enthält (Gossen, 1992). Daran anschließend liegt ein Luciferase-Gen (Wet, 1987), das abgelesen wird, wenn der Promoter durch Bindung des tTA-Proteins an die Operatorsequenzen aktiviert wurde.

Die transfizierten Zellen wurden über 24 Stunden mit und ohne Doxycyclin kultiviert und anschließend geerntet. Der Luciferase-Reporter-Assay wurde mit Hilfe des „Dual luciferase reporter assay kit“ (Promega, Deutschland) durchgeführt. Aus den erhaltenen Werten wurden die Relativen Lichteinheiten (RLU) und die Induktion berechnet, indem eine Ratio aus den Werten ohne und mit Doxycyclin gebildet wurde.

In Abb. 5 sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten zur Induktion des Systems bei fünf U937tTA-Klonen dargestellt. Aus diesen Experimenten ist zu sehen, daß das tTA-Protein in den U937-Zellen exprimiert wird, da eine Induktion des Systems vorhanden ist. Diese Induktion ist in den einzelnen Zellklonen unterschiedlich stark, denn eine mehr oder weniger starke „leakiness“ des Systems ist überall vorhanden. Für die weitere Verwendung bei der Generierung einer stabilen Tet-off-Zelllinie wurden die Klone mit einer guten Induktion und einer möglichst geringen „leakiness“ ausgesucht.



**Abb. 5:** *Nachweis der Induzierbarkeit des Tet-off Systems in U937tTA-Zellklonen.*

U937tTA-Zellen wurden für 24 Stunden mit und ohne Doxycyclin kultiviert. Dann wurde in einem Luciferase-Reporter-Assay die Induzierbarkeit der Zellen bestimmt. Dafür wurde eine Ratio zwischen +/- Doxycyclin gebildet. Es sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

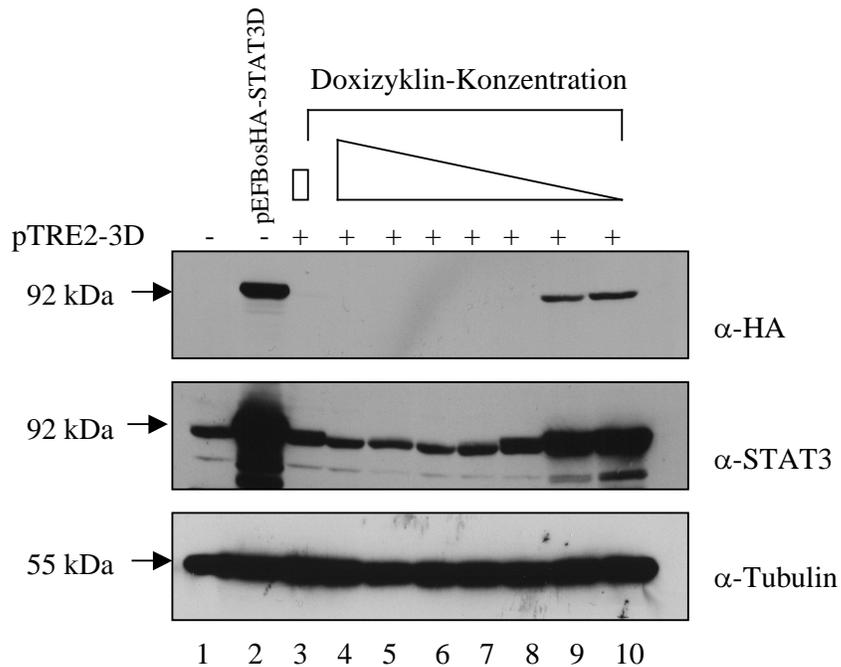
#### **4.1.2 Subklonierung der dominant-negativen STAT3-Mutante (STAT3D) und Austestung des pTRE2-STAT3D-Konstruktes**

Um den „zweiten Teil“ des Tet-off Systems zu erhalten, mußte STAT3D (siehe 4.1, Abb. 2) in das Response-Plasmid pTRE2 kloniert werden. Für diese Klonierung wurde STAT3D mittels PCR aus dem Expressionsvektor pEFBosHA-STAT3D amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen BamHI und HindIII in den pTRE2-Vektor kloniert. Nach Transformation in *E.coli* XL1-blue und Maxipräparation des pTRE2-HA-STAT3D-Konstruktes wurde dieses auf seine Induzierbarkeit geprüft. Es wurden 293-Tet-off Zellen (Clontech, Deutschland), die das tTA-Protein stabil exprimieren, transient mit dem pTRE2-HA-STAT3D-Konstrukt transfiziert und über 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von Doxycyclin (3 µg/ml; 1 µg/ml; 0,3 µg/ml; 0,1 µg/ml; 0,01 µg/ml; 0,001 µg/ml; 0 µg/ml) kultiviert. Danach wurden die Zellen geerntet und die Expression des Konstruktes im

Westernblot durch Detektion des HA-Tags und durch einen spezifischen STAT3-Antikörper nachgewiesen (Abb. 6).

Durch eine Detektion des HA-Tags konnte die Induzierbarkeit und die Funktionalität von pTRE2-HA-STAT3D spezifisch nachgewiesen werden. In Abb. 6, Spur 4 bis Spur 10 sind die Lysate der Doxycyclin-Konzentrationsreihe aufgetragen. Man kann sehen, daß bei hohen Doxycyclin-Konzentrationen [3µg/ml] keine Proteinexpression vorhanden ist (Abb. 6, Spur 4). Diese findet erst wieder bei sehr geringen Doxycyclin-Konzentrationen [0,001 µg/ml] (Abb. 6, Spur 9) bzw. bei Abwesenheit von Doxycyclin (Abb. 6, Spur 10) statt. Auch bei einer Antibiotika-Konzentration [1 µg/ml], die unter Kultivierungsbedingungen ständig im Medium vorhanden ist, ist keine Proteinexpression nachweisbar (Abb. 6, Spur 3). Als Negativkontrolle wurde Zell-Lysat von normalen 293-Zellen, die mit pTRE2-HA-STAT3D transfiziert worden waren, aufgetragen. Es konnte kein HA-STAT3D-Protein nachgewiesen werden (Abb. 6, Spur 1). Die Positivkontrolle für die Spezifität der detektierten Banden lieferten Zell-Lysate von 293-Zellen, die mit pEFBos-HA-STAT3D transfiziert worden waren (Abb. 6, Spur 2).

Ein Reblot mit einem spezifischen STAT3-Antikörper zeigte, daß die durch den HA-Antikörper detektierten Banden denen des spezifischen STAT3-Proteins entsprachen. Hier war sowohl bei der Negativkontrolle (Abb. 6, Spur 1), als auch bei der gesamten Doxycyclin-Konzentrationsreihe (Abb. 6, Spur 4-10) und unter normalen Kulturbedingungen (Abb. 6, Spur 3) STAT3 nachweisbar. Es ist außerdem zu sehen, daß auch das STAT3-Gesamtprotein durch das Tet-off System bei geringen Antibiotika-Konzentrationen induziert wird (Abb. 6, Spur 9 + 10). Dies wird durch den Nachweis gleicher Proteinladung durch einen  $\alpha$ -Tubulin-Antikörper bestätigt.



**Abb. 6: Nachweis der Induzierbarkeit des pTRE2-HA-STAT3D Konstrukts durch Doxycyclin in 293tTA-Zellen.**

293tTA-Zellen wurden transient mit dem pTRE2-HA-STAT3D Konstrukt transfiziert. Nach einer Kultivierung mit verschiedenen Doxycyclin-Konzentrationen über 48 Stunden, wurden die Zellen geerntet. Für den Nachweis des Konstrukts wurden spezifische Antikörper gegen den HA-Tag, gegen STAT3 und gegen Tubulin (zum Nachweis gleicher Proteinmengen) verwendet. +: mit Doxycyclin; -: ohne Doxycyclin.

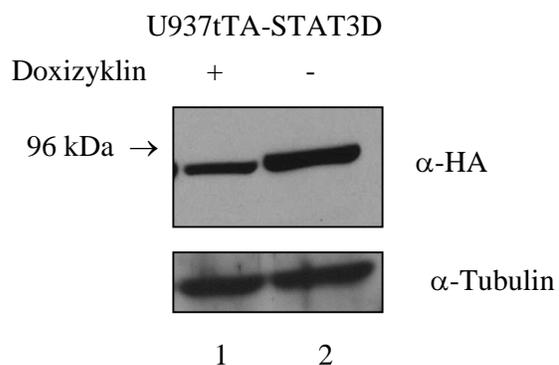
#### 4.1.3 Generierung einer stabilen U937tTA-STAT3D-Zelllinie

Für die Generierung einer stabilen U937tTA-STAT3D-Zelllinie wurde der U937tTA-Zellklon 16 ausgewählt, da dieser eine gute Induktion und eine geringe „leakiness“ aufwies (siehe 4.1.1, Abb. 5). Die Zellen wurden mittels Effektene (Qiagen) mit dem pTRE2-HA-STAT3D- und einem pPur-Plasmid (Clontech, Deutschland; siehe 4.1, Abb. 3), welches für die Resistenz nötig war, kotransfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 0,5 µg/ml Puromycin selektiert. Nach circa drei Wochen Selektion konnten die Poolzellen expandiert und Einzelzellklone durch Klonierung in Softagar generiert werden. Über die gesamte Selektionsdauer war neben Puromycin, zur Selektion, auch Doxycyclin im Medium

enthalten, um das Tet-off System ausgeschaltet zu lassen. Aus diesem Grund mußte auch nach Etablierung der stabilen Zelllinie permanent Doxycyclin im Medium vorhanden sein.

Um die Expression und Induzierbarkeit der U937tTA-STAT3D-Zelllinie zu testen, wurden die Zellen für 72 Stunden mit und ohne Doxycyclin kultiviert, geerntet und die Expression anschließend im Westernblot, durch Detektion des HA-Tags, nachgewiesen (Abb. 7).

In Abb. 7 ist zu sehen, daß das Tet-off System mit diesem Gen und in diesen Zellen funktionsfähig aber sehr „leaky“ ist. Dies zeigt sich daran, daß auch im ausgeschalteten Zustand (Abb. 7, Spur 1) eine gewisse Expression des dominant-negativen STAT3D vorhanden ist. In Abwesenheit von Doxycyclin ist aber dennoch eine deutliche Induktion der STAT3D-Expression zu sehen (Abb. 7, Spur 2). Dies wird durch den Nachweis gleicher Proteinladung durch einen  $\alpha$ -Tubulin-Antikörper bestätigt (Abb. 7).



**Abb. 7: Nachweis der Induzierbarkeit des Tet-off Systems in U937tTA-STAT3D Zellen durch Doxycyclin.**

Die Zellen wurden mit und ohne Doxycyclin kultiviert (72 Stunden) und anschließend geerntet. Für den Nachweis des pTRE2-HA-STAT3D Konstrukts wurden spezifische Antikörper gegen den HA-Tag und gegen Tubulin (zum Nachweis gleicher Proteinmengen) verwendet. +: mit Doxycyclin; -: ohne Doxycyclin.

In der Zellkultur war außerdem zu beobachten, daß die Zellklone nur sehr langsam proliferierten. Diese langsame Proliferation ließ sich auch durch höhere FCS-Konzentrationen im Medium oder durch Zytokinzusatz nicht verändern (Ergebnis ohne Abbildung). Dies führte dazu, daß die Zellen für weiter Experimente nicht zur Verfügung standen, da die benötigte Zellzahl nicht erreicht werden konnte. Diese Beobachtung führte uns zu der

Hypothese, daß die proliferationsinhibierende Wirkung von STAT3D für dieses Phänomen verantwortlich ist, da eine gewisse „leakiness“ des Tet-off Systems vorlag (Abb. 7).

Ein weiterer Hinweis auf die Richtigkeit dieser Vermutung ist durch Versuche an einer transformierten Zelllinie erhalten worden (siehe Abschnitt 4.2). Dazu wurden STAT3WT bzw. STAT3D in die faktorunabhängig wachsende Zelllinie Ba/F3-BCR-ABL eingebracht und die spontane Proliferation ermittelt. Hier zeigte sich, daß sich das Wachstum zwischen Ba/F3-BCR-ABL- und Ba/F3-BCR-ABL-STAT3WT-Zellen nicht unterscheidet. Die Ba/F3-BCR-ABL-STAT3D-Zellen dagegen wachsen signifikant langsamer (Abb. 16). Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß das schlechte Wachstum der U937tTA-STAT3D-Zellen auf die hohe basale Expression der dominant-negativen STAT3-Mutante zurückzuführen ist.

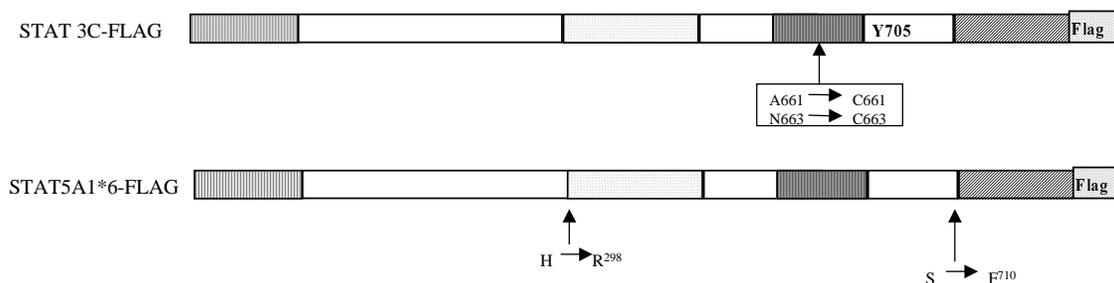
## **4.2 Etablierung von stabilen Ba/F3-Zelllinien mit konstitutiv aktivem STAT3 und STAT5**

### **4.2.1 Etablierung und Charakterisierung der stabil mit STAT3C und STAT5A1\*6 transfizierten Ba/F3-Zelllinien**

Aufgrund der schlechten Proliferation der tet-induzierbaren U937tTA-STAT3D-Zellen haben wir eine alternative Strategie verfolgt, um die Bedeutung von STAT3 und STAT5 in der malignen Transformation hämatopoetischer Zellen untersuchen zu können. Dafür wurden auf der einen Seite konstitutiv aktive STAT-Mutanten anstatt dominant-negativer Mutanten verwendet. Auf der anderen Seite wurde eine IL-3 abhängige pro-B-Mauszelllinie (Ba/F3) der AML-Zelllinie vorgezogen, da hier ein Effekt der konstitutiv aktiven Mutanten, auf Grund der Faktorabhängigkeit der Zellen, schnell zu erkennen ist.

Um die konstitutiv aktive Mutante von STAT3, STAT3C, zu erhalten, wurden im C-terminalen loop der SH2-Domäne die Aminosäuren A661 und N663 jeweils gegen ein Cystein ausgetauscht, so daß die STAT3-Proteine, ohne vorherige Aktivierung, durch Ausbildung von Sulfidbrücken spontan dimerisieren können. Diese Dimere translozieren in den Zellkern, was eine konstitutive DNA-Bindung und eine konstitutive Transkription

induziert (Bromberg, 1999). Die konstitutiv aktive Mutante von STAT5, STAT5A1\*6, wurde generiert, indem zwei Punktmutationen eingeführt wurden (Nosaka, 1999). Die Mutation 1 liegt in der Aktivierungsdomäne ( $S^{710} \rightarrow F^{710}$ ), wogegen die Mutation 6 in der DNA-Bindungsdomäne liegt ( $H^{298} \rightarrow R^{298}$ ). Die beiden Mutanten sind schematisch in Abb. 8 dargestellt.



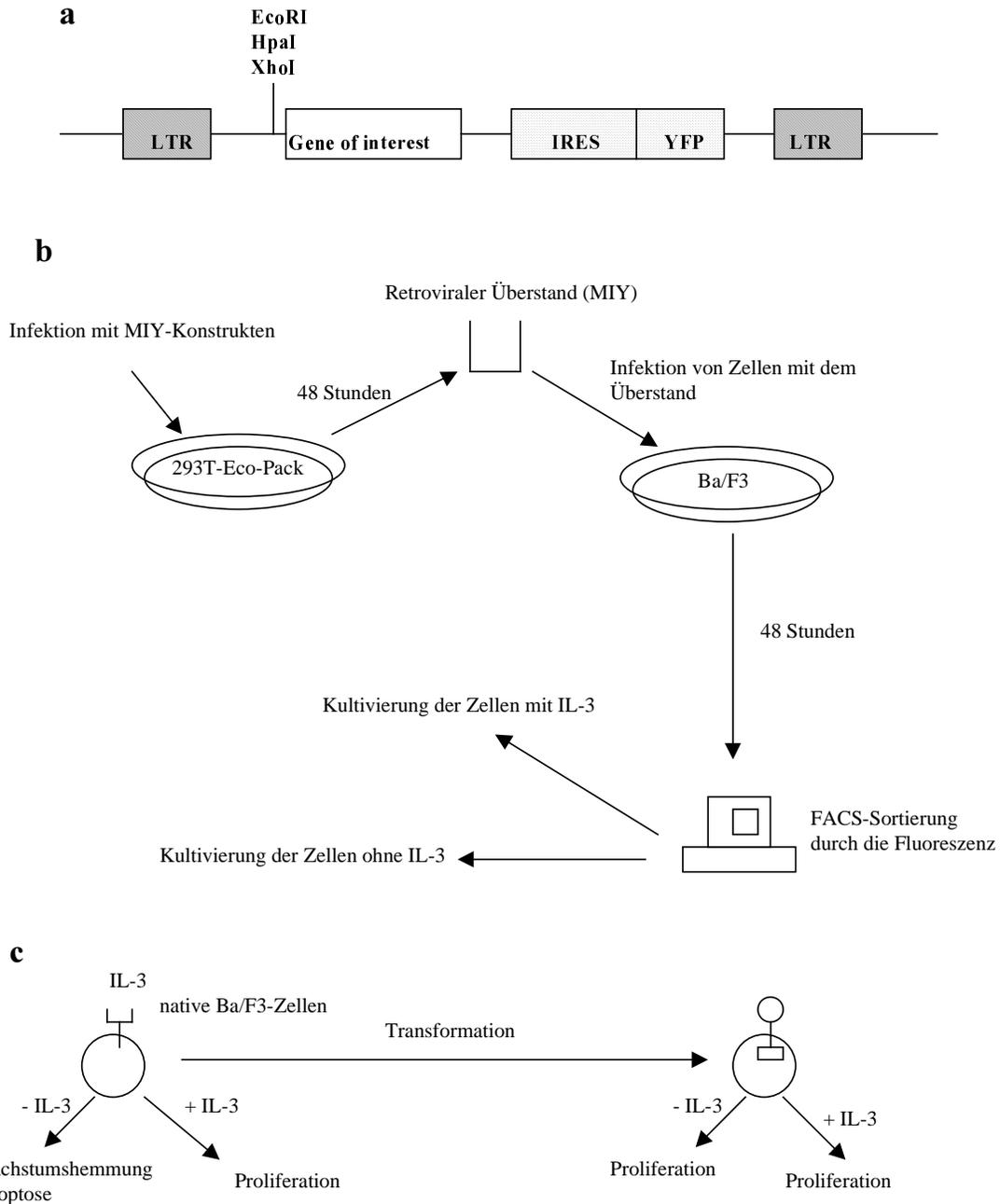
**Abb. 8:** Schematische Präsentation der funktionellen Proteindomänen der konstitutiv aktiven Mutanten von STAT3 und STAT5.

Um unsere Hypothese weiter zu unterstützen, war es von Interesse zu untersuchen, ob diese Mutanten auch in hämatopoetischen Zelllinien zur Transformation führen.

Für die Untersuchungen wurden die Mutanten aus ihren Ursprungsvektoren (RCCMV-STAT3C-Flag; pMXpuro-STAT5A1\*6-Flag) in den pCDNA6A-Vektor, der eine Blasticidin-Resistenz trägt, kloniert, da die Ba/F3-Zellen gegen G418 resistent sind (eigene Beobachtung). Dafür wurden die Schnittstellen von NotI und Eco RI (STAT5A1\*6-Flag) bzw. von NotI und ApaI (STAT3C-Flag) verwendet. Um die Konstrukte zu testen, wurden 293-Zellen mit diesen transient transfiziert. Nach 48 Stunden Kultivierung wurden die Zellen geerntet und die Expression der Konstrukte wurde im Westernblot nachgewiesen (Ergebnisse ohne Abbildung).

Zusätzlich wurden HA-STAT3WT und HA-STAT3D ebenso wie STAT3C-Flag in einen MSCV-IRES-EYFP (MIY)-Vektor (retroviraler Vektor) umkloniert. Dieser wurde, neben dem pCDNA6A-Vektor, verwendet, da einerseits durch den retroviralen Promoter physiologischere Expressionslevel der Proteine erreicht wurden. Andererseits konnten auch Artefakte, wie spontane IL-3 Unabhängigkeit der Zellen, durch die direkte Sortierung der Zellen vermieden werden. Durch die Sortierung erfolgte eine Selektion ohne Antibiotika. Des

weiteren ermöglichte die Gelbfluoreszenz eine schnelle Überprüfung der Transfektionseffizienz bzw. der Proteinexpression. In Abb. 9 ist sowohl der MIY-Vektor als auch die Selektion durch Zellsortierung schematisch dargestellt.



**Abb. 9: In-vitro Infektion von Zellen zur Generierung stabiler Zelllinien mit Konstrukten im retroviralen MSCV-IRES-EYFP-Vektor (MIY).**

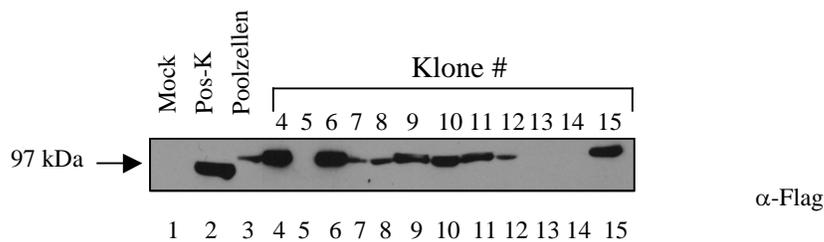
**a:** Schematische Darstellung des MIY-Vektors. **b:** Schema zum vorgehen bei der Infektion von Zellen. **c:** Schematische Darstellung der Transformation von Ba/F3-Zellen.

In Abbildung 9 a ist der MIY-Vektor mit der „multiple cloning site“ für das zu untersuchende Gen vereinfacht dargestellt. Das Gen wird zwischen zwei LTRs und vor die IRES-YFP Sequenz kloniert, so daß YFP und das zu untersuchende Gen vom gleichen Transkript abgelesen werden. Dadurch kann die Fluoreszenz als ein Maß für die Proteinexpression verwendet werden. Abbildung 9 b zeigt schematisch die allgemeine Vorgehensweise bei der Infektion von Zellen mit MIY-Konstrukten und deren anschließenden Sortierung durch die Fluoreszenz am Beispiel von Ba/F3-Zellen. Es werden 293T-EcoPack-Zellen mit den MIY-Konstrukten transfiziert. Die Zellen entlassen die Konstrukte, in Viruspartikel verpackt, ins Medium, so daß infektiöser Überstand gewonnen werden kann, welcher für die Infektion von Ba/F3-Zellen (oder anderen Zellen) verwendet wird. 48 Stunden nach der Infektion werden die Zellen durch die Fluoreszenz im FACS-Sorter sortiert und anschließend weiter kultiviert und expandiert.

In Abbildung 9 c dagegen ist das Prinzip des Ba/F3-Systems gezeigt, was die Grundlage für die Untersuchungen mit konstitutiv aktiven STAT-Mutanten darstellt. Da native Ba/F3-Zellen IL-3 für die Proliferation benötigen, kommt es zu Wachstumshemmung und Apoptose, wenn kein IL-3 vorhanden ist. Infiziert man Ba/F3-Zellen mit Konstrukten wie TEL/ABL oder TEL/JAK2 (transformierende Proteine mit PTK-Aktivität), findet eine Transformation der Zellen statt. Diese sind dadurch faktorunabhängig geworden und benötigen kein IL-3 mehr für die Proliferation. Somit kann dieses Zellsystem eine direkte Antwort auf die Frage geben, ob ein Protein ein transformierendes Potential besitzt oder nicht.

Für die Etablierung der stabilen Zelllinien wurden einerseits die pCDNA6A-STAT3C/STAT5A1\*6-Konstrukte durch Elektroporation in Ba/F3-Zellen eingebracht und durch Blasticidin [8 µg/ml] selektiert. Anschließend erfolgte ein IL-3-Entzug, was eine weitere Selektion darstellte. Die Zellen wuchsen, nachdem sie die Selektion durchlaufen hatten, faktorunabhängig, daß heißt, es hat eine Transformation stattgefunden. Die Expression der transfizierten Konstrukte wurde im Westernblot durch einen Flag-Antikörper überprüft (Abb. 10). Als Beispiel für die Expression der konstitutiv aktiven STAT-Mutanten in den transfizierten Ba/F3-Zellen ist in Abb. 10 die Expression von pCDNA6A-STAT5A1\*6-Flag gezeigt. Es sind sowohl Lysate von Zellklonen (Abb. 10, Spur 4-15) als auch von Poolzellen (Abb. 10, Spur 3) aufgetragen. In den Poolzellen ließ sich STAT5A1\*6-Flag nachweisen (Abb. 10, Spur 3). Bei einigen Klonen war dagegen kein Protein detektierbar (Abb. 10, Spur 5, 13, 14), was auf geringere Expressionslevel zurückzuführen ist. Die restlichen Klone

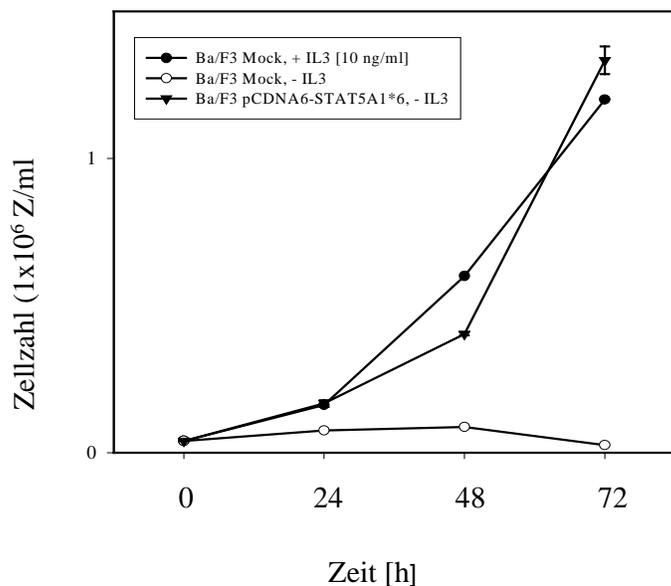
exprimierten STAT5A1\*6-Flag (Abb. 10, Spur 7-12), wobei drei Zellklone ein höheres Expressionslevel zeigten (Abb. 10, Spur 4, 6, 15). Als Positivkontrolle wurde ein Lysat von 293-Zellen, die mit pMXpuro-STAT5A1\*6-Flag transient transfiziert worden waren, verwendet (Abb. 10, Spur 2). Die hier zu sehende geringere Größe des detektierten Proteins ist wahrscheinlich durch verschiedene posttranskriptionale Modifikationen von STAT5 in Ba/F3- (murin, hämatopoetisch) und 293-Zellen (human, epithelial) bedingt. Für die Negativkontrolle wurde ein Lysat von Ba/F3-Zellen, die stabil mit dem leeren Vektor pCDNA6A transfiziert worden waren, verwendet (Abb. 10, Spur 1). Hier ist keine Proteinexpression zu detektieren.



**Abb. 10: Nachweis der Expression von pCDNA6A-STAT5A1\*6-Flag in Ba/F3-Zellen.**

Für den Nachweis des pCDNA6A-STAT5A1\*6 Konstrukts wurde ein spezifischer  $\alpha$ -Flag- Antikörper verwendet. Pos-K: Positivkontrolle; #: Nummer.

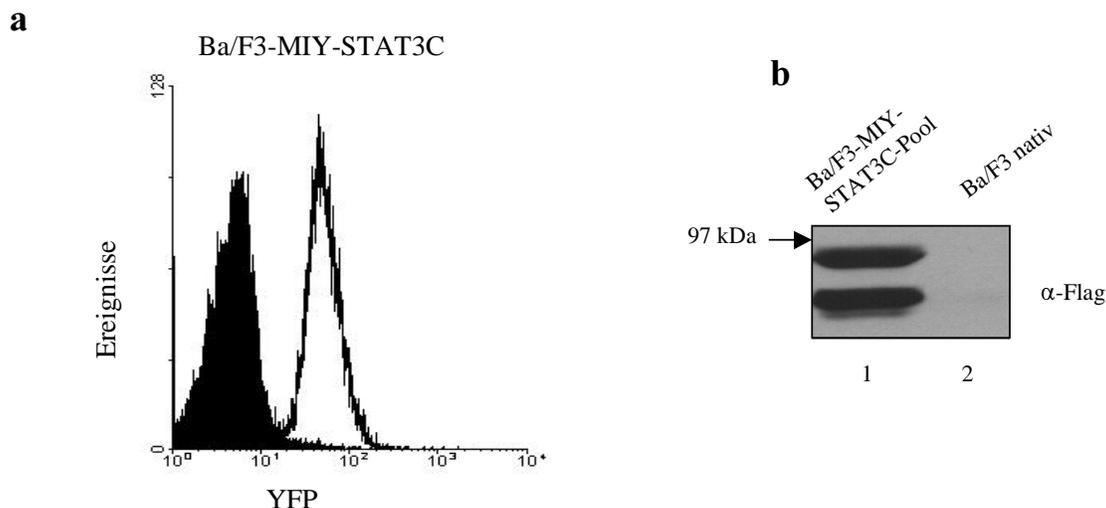
Um die Transformation der Ba/F3-Zellen durch das pCDNA6A-STAT5A1\*6-Flag-Konstrukt, welche sich in faktorunabhängigem Wachstum äußert, zu zeigen wurden Proliferationsassays mit und ohne IL-3 durchgeführt. Dafür wurden die Zellen mit und ohne IL-3 [10 ng/ml] in 96-Loch-Platten ausgesät und nach 24, 48 und 72 Stunden die Zahl der lebenden Zellen durch Trypanblaufärbung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. In Abb. 11 ist die Auswertung von drei unabhängigen Assays dargestellt. Die als Kontrolle verwendeten Ba/F3-Mock-Zellen verhielten sich wie erwartet. Mit IL-3 zeigten sie eine Proliferation wie Ba/F3WT-Zellen. Wogegen sie bei Kultivierung ohne IL-3 nicht mehr proliferierten bzw. tot waren. Die Ba/F3-pCDNA6A-STAT5A1\*6-Flag-Zellen dagegen wuchsen ohne IL-3 genauso gut wie die Kontrollzellen mit IL-3.



**Abb. 11: Induktion von IL-3-Unabhängigkeit in Ba/F3-Zellen durch Überexpression von STAT5A1\*6.**

Es wurden  $2,5 \times 10^4$  Zellen/ml ausgesät und über eine Zeitreihe (24/48/72 Stunden) mit [10 ng/ml] und ohne IL-3 kultiviert. Die Zahl viable Zellen wurde nach Trypanblaufärbung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Es sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Ansätzen des Proliferationsassays gezeigt.

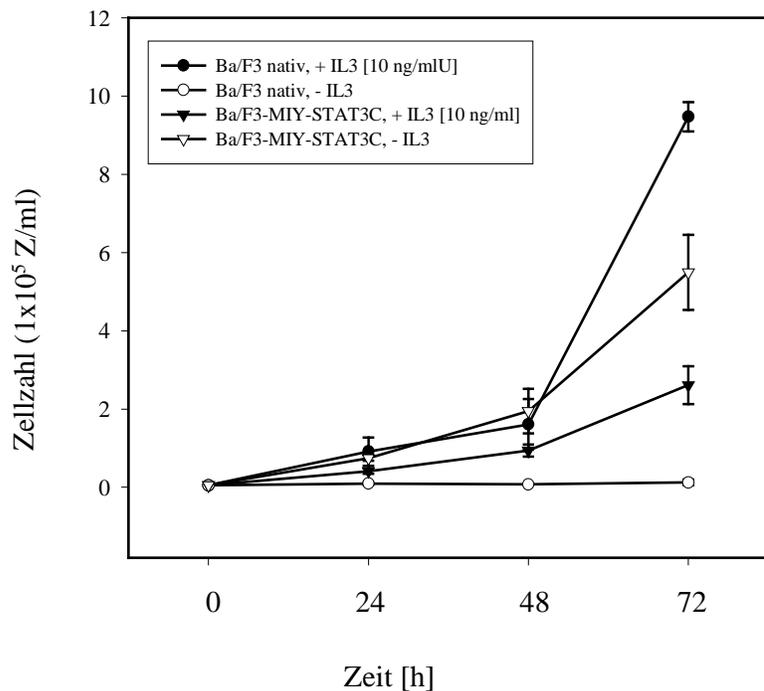
Für die Generierung stabiler Ba/F3-STAT3C-Zellen wurden Ba/F3-Zellen mit viralem MIY-STAT3C-Flag-Überstand infiziert. Eine Selektion erfolgte durch Zellsortierung mit Hilfe ihrer Gelbfluoreszenz 48 Stunden nach der Infektion (siehe auch Abb. 9 b). Die Expression von MIY-STAT3C-Flag konnte sowohl durch FACS-Analyse - da STAT3C-Flag und YFP vom gleichen Transkript abgelesen werden - als auch im Westernblot nachgewiesen werden (Abb. 12 a + b). Abbildung 12 a zeigt die Auswertungen der FACS-Analysen. Das ausgefüllte Histogramm stellt native Ba/F3-Zellen dar, die als Negativkontrolle dienten. Das leere Histogramm dagegen zeigt Ba/F3-MIY-STAT3C-Flag-Zellen. Die Verschiebung dieser Kurve ist durch die spezifische YFP-Fluoreszenz der Zellen, die durch die Expression von MIY-STAT3C verursacht wird, zu erklären. Der Westernblot in Abb. 12 b bestätigt die Expression von STAT3C durch die Detektion des Flag-Tags mittels eines spezifischen Flag-Antikörpers (Abb. 12 b, Spur 1). Als Negativkontrolle diente Lysat von nativen Ba/F3-Zellen (Abb. 12 b, Spur 2).



**Abb. 12: Nachweis der Expression von MIY-STAT3C-Flag in Ba/F3-Zellen.**

**a:** Die Expression von MIY-STAT3C-Flag wurde mittels FACS-Analyse über die Fluoreszenz der Zellen durch YFP nachgewiesen. Ausgefülltes Histogramm: native Ba/F3-Zellen; leeres Histogramm: YFP-positive Ba/F3-MIY-STAT3C-Flag-Zellen. **b:** Zusätzlich wurde die Expression von MIY-STAT3C-Flag im Westernblot durch einen spezifischen  $\alpha$ -Flag-Antikörper nachgewiesen.

Da auch die Ba/F3-MIY-STAT3C-Flag-Zellen faktorunabhängig wuchsen, wurden, wie für die Ba/F3-pCDNA6A-STAT5A1\*6-Zellen beschrieben, Proliferationsassays mit und ohne IL-3 durchgeführt. Die Auswertung der Assays ist in Abbildung 13 dargestellt. Die als Kontrolle verwendeten nativen Ba/F3-Zellen verhielten sich wie erwartet. Daß heißt, sie proliferierten mit IL-3 wie unter Kulturbedingungen, wogegen sie ohne IL-3 nicht wuchsen. Die Ba/F3-MIY-STAT3C-Zellen dagegen proliferierten sowohl mit als auch ohne IL-3. Allerdings zeigten sie ein langsames Wachstum als die nativen Ba/F3-Zellen mit IL-3.

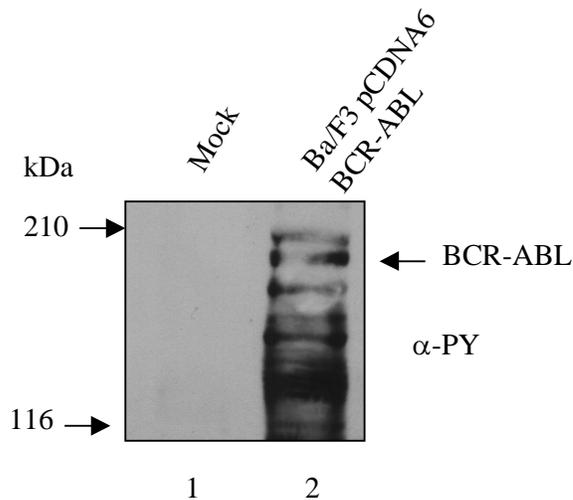


**Abb. 13: Induktion von IL-3-Unabhängigkeit in Ba/F3-Zellen durch Überexpression von STAT3C.**

Es wurden  $2,5 \times 10^4$  Zellen/ml ausgesät und über eine Zeitreihe (24/48/72 Stunden) mit [10 ng/ml] und ohne IL-3 kultiviert. Die Zahl viabler Zellen wurde nach Trypanblaufärbung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Es sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Ansätzen des Proliferationsassays gezeigt.

Da die leukämiespezifische Proteintyrosinkinase BCR-ABL STAT3 aktiviert wurde in unserer Arbeitsgruppe eine durch diese PTK transformierte Ba/F3-Zelllinie als Modellsystem für die STAT-Aktivierung durch PTKs verwendet. Daraus ergab sich ein weiterer Ansatz über die dominant-negative Mutante STAT3D, um die Bedeutung von STAT3 zu untersuchen. Unsere Vermutung war, daß sich die vorhandene Transformation durch STAT3D wenigstens teilweise rückgängig machen läßt.

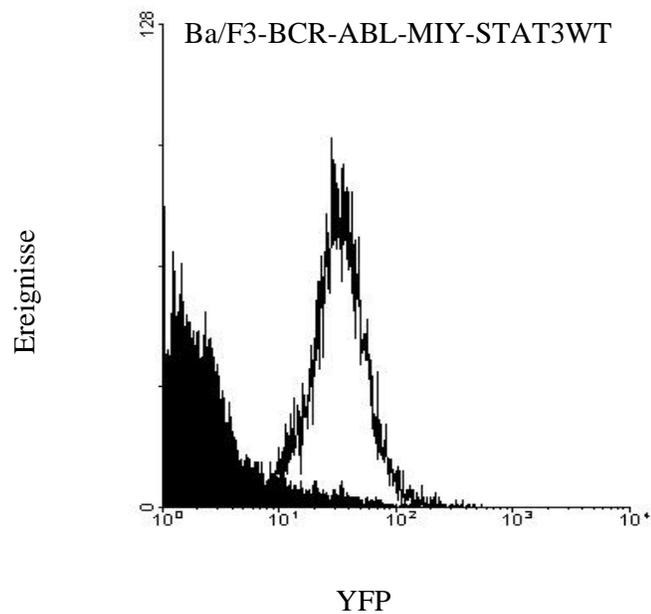
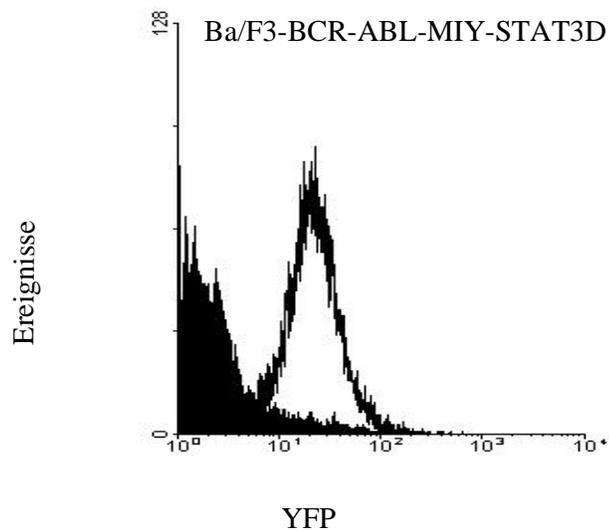
Die hier verwendeten Ba/F3-pCDNA6A-BCR-ABL-Zellen sind durch Elektroporation und anschließende Selektion mit Blasticidin [8 µg/ml] generiert worden. Die Transformation der Zellen zeigte sich in faktorunabhängigem Wachstum. Die Expression von BCR-ABL ist in Abb. 14 zu sehen.



**Abb. 14: Nachweis der Expression von BCR-ABL in Ba/F3-Zellen.**

Die Expression von BCR-ABL wurde im Westernblot durch einen spezifischen Phosphotyrosin-Antikörper nachgewiesen. Mock: Negativkontrolle, Ba/F3-Zellen mit Leervektor.

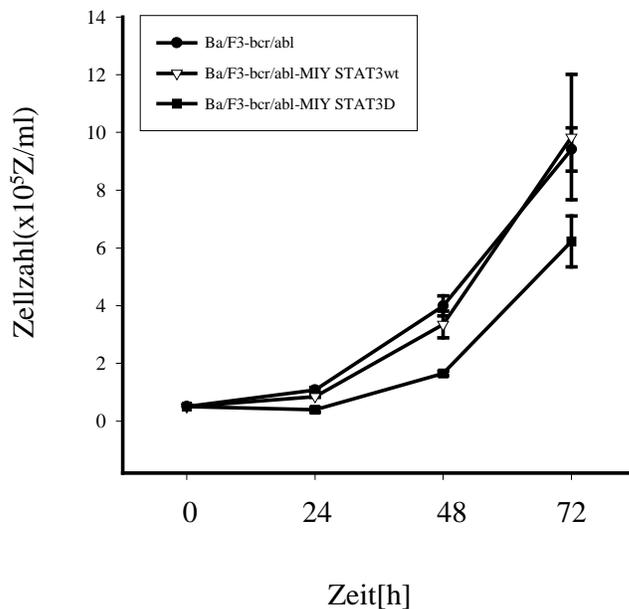
Diese Zellen wurden mit viralem MIY-HA-STAT3WT- und MIY-HA-STAT3D-Überstand infiziert und nach 48 Stunden mittels ihrer YFP-Fluoreszenz sortiert. Die Expression der MIY-Konstrukte wurde, wie beschrieben, in FACS-Analysen nachgewiesen und in Abb. 15 dargestellt. Als Negativkontrolle wurden für beide Zelllinien native Ba/F3-Zellen verwendet (ausgefülltes Histogramm, Abb. 15 a + b). Die Expression von MIY-STAT3WT und MIY-STAT3D (leere Histogramme) zeigt sich jeweils in einer Verschiebung der Kurve nach rechts (Abb. 15 a + b). Die Faktorunabhängigkeit der Zellen blieb erhalten.

**a****b**

**Abb. 15: Nachweis der Expression von MIY-STAT3WT und MIY-STAT3D in Ba/F3-BCR-ABL-Zellen.**

**a:** Die Expression von MIY-STAT3WT in Ba/F3-BCR-ABL-Zellen wurde mittels FACS-Analyse über die Fluoreszenz der Zellen durch YFP nachgewiesen. **b:** Der Nachweis von MIY-STAT3D wurde wie unter a beschrieben erbracht. Ausgefüllte Histogramme: native Ba/F3-Zellen; leere Histogramme: YFP-positive Ba/F3-BCR-ABL-MIY-STAT3WT/3D-Zellen.

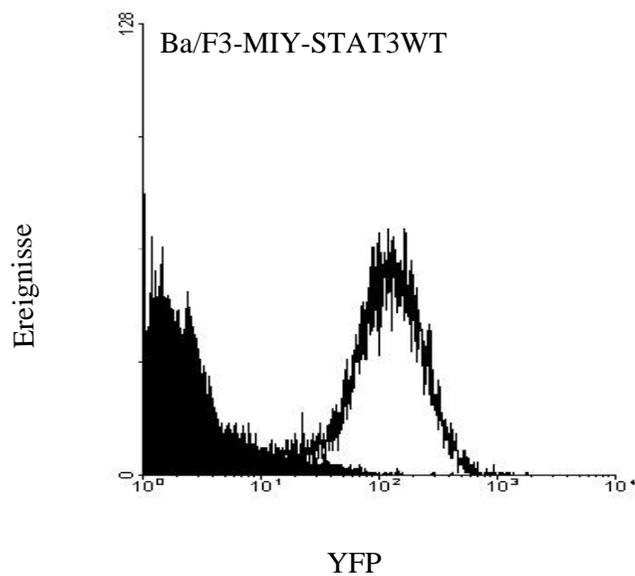
Um einen Effekt von STAT3D zeigen zu können, wurden wieder Proliferationsassays angesetzt, wobei alle Ansätze ohne IL-3 durchgeführt wurden, da die Zellen schon vor der Infektion faktorunabhängig waren. Die Auswertung ist in Abb. 16 dargestellt. Es ist zu sehen, daß die Ba/F3-BCR-ABL-Zellen, die als Kontrolle dienten, stark proliferieren. Auch die Ba/F3-BCR-ABL-MIY-STAT3WT-Zellen zeigen eine Proliferation in dem Maße der Kontrollzellen, was bedeutet, daß STAT3WT keinen Einfluß auf die Zellproliferation hat. Bei den Ba/F3-BCR-ABL-MIY-STAT3D-Zellen dagegen ist zu sehen, daß die Proliferation signifikant langsamer ist als bei den beiden anderen Zelllinien. Durch die dominant-negative STAT3-Mutante konnte also die vorhandene Transformation der Zellen durch eine Verlangsamung der Proliferation beeinflußt werden.

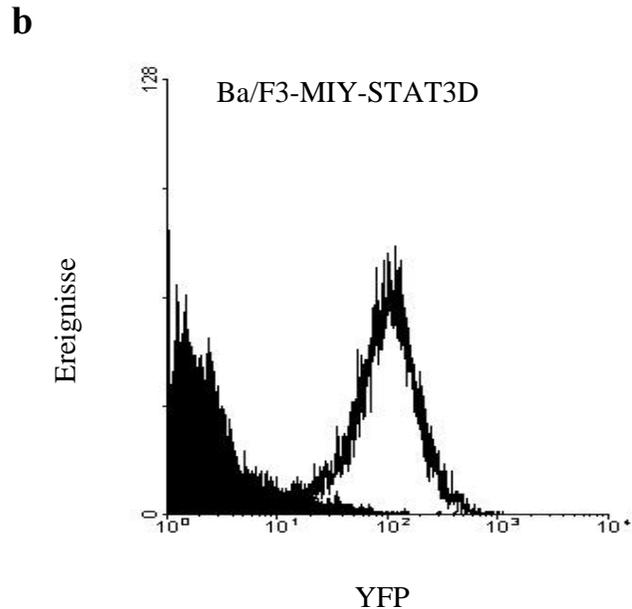


**Abb. 16:** Nachweis des wachstumshemmenden Effekts der dominant-negativen STAT3D Mutante in transformierten Ba/F3-BCR-ABL-Zellen.

Ba/F3-BCR-ABL-Zellen wurden mit MIY-STAT3WT/3D-Konstrukten infiziert und sortiert. Dann wurde ein Proliferationsassay über 72 Stunden durchgeführt. Die Zahl viabler Zellen wurde nach Trypanblaufärbung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Es sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Ansätzen des Proliferationsassays gezeigt.

Um zu zeigen, daß die verlangsamte Proliferation tatsächlich ein Effekt von STAT3D auf die transformierten Zellen ist, wurden dieselben Experimente mit nativen Ba/F3-Zellen, die mit MIY-STAT3WT/3D infiziert worden waren durchgeführt. Auch hier wurde die Expression der Konstrukte in den Zellen durch FACS-Analyse nachgewiesen. Die Daten sind in Abb. 17 a + b dargestellt. Die ausgefüllten Histogramme zeigen ungefärbte, native Ba/F3-Zellen, die als Kontrolle dienten. Die nach rechts verschobenen leeren Histogramme dagegen stellen die gelbfluoreszierenden Ba/F3-MIY-STAT3WT- (Abb. 17 a) und Ba/F3-MIY-STAT3D- (Abb. 17 b) Zellen dar.

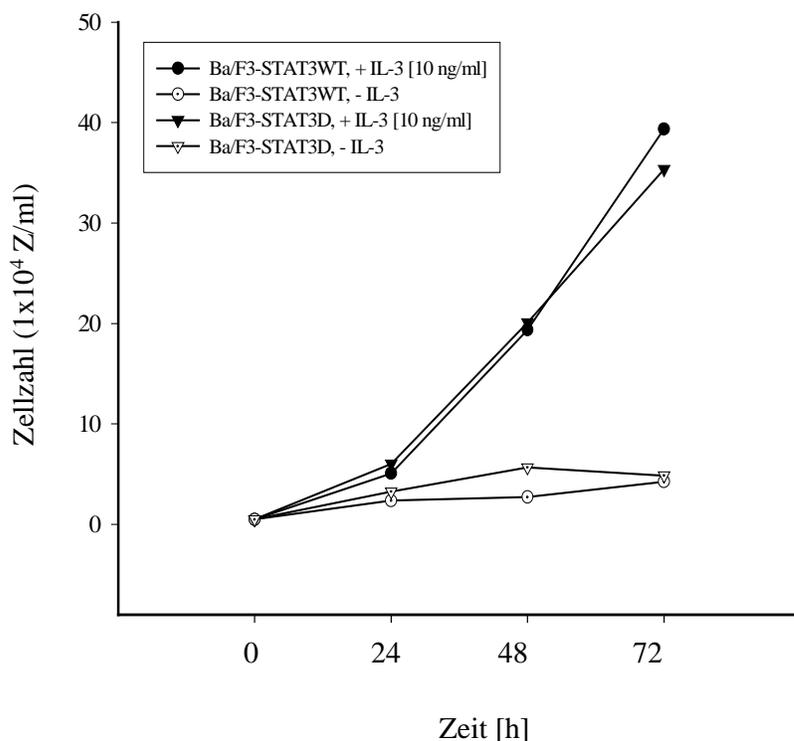
**a**



**Abb. 17: Nachweis der Expression von MIY-STAT3WT und MIY-STAT3D in Ba/F3-Zellen.**

**a:** Die Expression von MIY-STAT3WT in Ba/F3-Zellen wurde mittels FACS-Analyse über die Fluoreszenz der Zellen durch YFP nachgewiesen. **b:** Der Nachweis von MIY-STAT3D wurde wie unter a beschrieben erbracht. Ausgefüllte Histogramme: native Ba/F3-Zellen; leere Histogramme: YFP-positive Ba/F3-MIY-STAT3WT/3D-Zellen.

Der Einfluß der beiden Proteine auf die Proliferation der Ba/F3-Zellen ließ sich durch Proliferationsassays überprüfen. Dazu wurden die Zellen über eine Zeitreihe mit und ohne IL-3 kultiviert und anschließend ausgezählt. In Abb. 18 ist zu sehen, daß sowohl die Ba/F3-MIY-STAT3WT- als auch die Ba/F3-MIY-STAT3D-Zellen mit IL-3 wie native Ba/F3-Zellen proliferierten. Bei einem IL-3-Entzug fand bei beiden Zelllinien keine Proliferation mehr statt (Abb. 18).



**Abb. 18:** *STAT3WT* und die dominant-negative *STAT3D* Mutante haben keinen Effekt auf die Proliferation von Ba/F3-Zellen.

Ba/F3-Zellen wurden mit MIY-STAT3WT/3D infiziert und mittels ihrer YFP-Fluoreszenz sortiert. Dann wurde ein Proliferationsassay über 72 Stunden, mit [10 ng/ml] und ohne IL-3 angesetzt. Die Zahl viabler Zellen wurde nach Trypanblaufärbung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Grafik zeigt die Mittelwerte aus drei unabhängigen Ansätzen des Proliferationsassays.

Somit ist gezeigt worden, daß sowohl STAT3WT als auch STAT3D keinen Einfluß auf das Wachstum der nativen Ba/F3-Zellen haben. Das Wachstum von Ba/F3-Zellen, die durch BCR-ABL transformiert sind, wird dagegen von STAT3D signifikant verlangsamt.

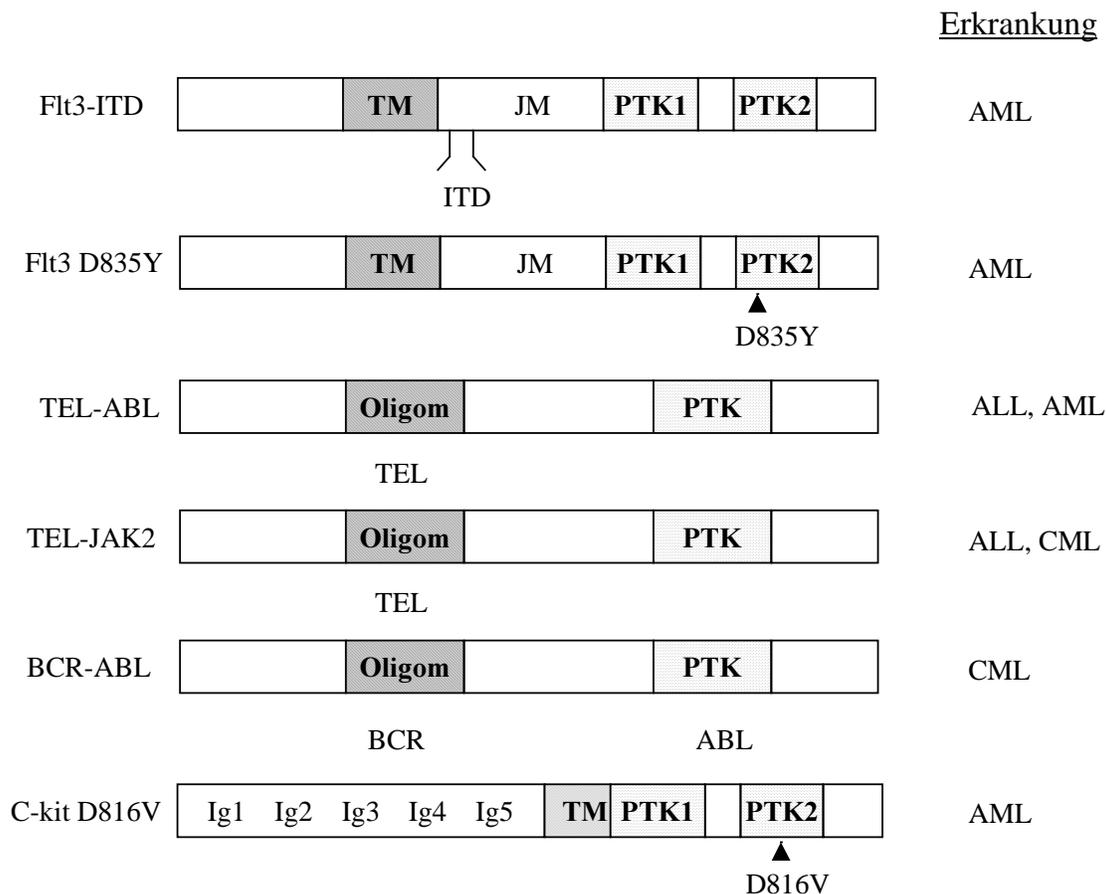
Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, daß konstitutiv aktives STAT3 und STAT5 in hämatopoetischen Zelllinien transformierendes Potential besitzen und zu faktorunabhängigem Wachstum führen. Wildtyp-STAT3 dagegen besitzt kein transformierendes Potential. Die Ergebnisse bestätigen außerdem die Vermutung, daß die Aktivierung/konstitutive Aktivierung von STAT-Proteinen eine wichtige Rolle bei der Transformation von Ba/F3-Zellen spielt und unterstützen unsere Hypothese, daß konstitutive STAT-Aktivierung an der Pathogenese von Leukämien und soliden Tumoren beteiligt sind.

Zusätzlich läßt sich durch das wachstumsverlangsamende Potential von STAT3D in Ba/F3-BCR-ABL-Zelllinien auch das, unter 4.1.3 beschriebene schlechte Wachstum der U937tA-STAT3D-Zellen erklären.

#### **4.2.2 Regulation bekannter Zielgene von STAT3 und STAT5 in stabilen Ba/F3-Zelllinien**

Unsere Vermutung ist, daß die Faktorunabhängigkeit dieser Zelllinien durch die Regulation der STAT-Zielgene hervorgerufen wird, da in diesen Zellen nur STAT3 und STAT5 aktiviert sind. Die Zielgenuntersuchung soll Hinweise auf einen möglichen Mechanismus für die Faktorunabhängigkeit geben.

Die Regulation von Bcl-x<sub>L</sub> und C-MYC, welches Zielgene von STAT3 und STAT5 sind, wurde in faktorunabhängigen, transformierten Ba/F3-Zelllinien untersucht. Für die Experimente wurden folgende Zelllinien verwendet: Ba/F3-nativ, -BCR-ABL, -TEL-ABL, -TEL-JAK2, -STAT3C, -STAT5A1\*6, -Flt3/W51, -Flt3/D835Y, -C-Kit/D816V. Die Flt3-Zelllinien wurden verwendet, da sowohl die ITD-Mutation W51 (interne Tandemduplikation) als auch die Punktmutation D853Y (Asparaginsäure 835 zu Tyrosin) transformierend wirken und STAT3 und STAT5 aktivieren. Aus dem selben Grund wurde die C-Kit/D816V-Zelllinie sowie die Ba/F3-STAT3C- und Ba/F3-STAT5A1\*6-Zellen (siehe für beide auch Abschnitt 4.1) eingesetzt. Diese Mutationen sind ebenso wie die Fusionsproteine BCR-ABL, TEL-ABL, TEL-JAK2 leukämiespezifisch. Die Ba/F3-Zelllinien, die die Fusionsproteine BCR-ABL, TEL-ABL, TEL-JAK2 exprimieren, kamen für diese Experimente in Frage, da die Zellen durch die Fusionsproteine transformiert worden sind und diese Proteine ebenfalls STAT3 und STAT5 aktivieren. Somit stellte die Zielgenuntersuchung eine weitere Möglichkeit dar, die Rolle der STAT-Proteine bei der Transformation zu untersuchen. Sämtliche Konstrukte, die für die Generierung der hier verwendeten Zelllinien benötigt wurden, sind in Abb. 19 dargestellt (STAT3C und STAT5A1\*6 siehe 4.2.1, Abb.8).



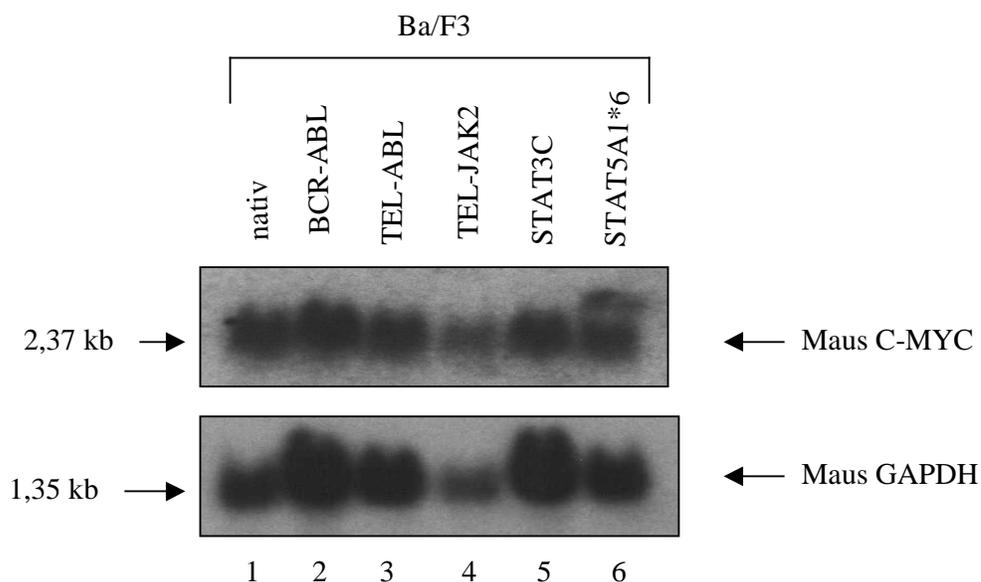
**Abb. 19: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten leukämiespezifischen cDNA-Konstrukte.**

Leukämiespezifische Proteintyrosinkinase. PTK: Proteintyrosinkinase; Oligom: Oligomerisierung; TM: transmembranös; JM: juxtamembranös; Lg: Ligand; ITD: Interne Tandemduplikation; Ig: Immunglobulin-ähnliche Domäne.

Zu Beginn der Experimente wurde RNA aus jeweils  $1 \times 10^7$  Zellen isoliert und die RNA-Konzentration in einer Messung bei 260 nm bestimmt. Danach wurde je 1  $\mu\text{g}$  RNA in cDNA umgeschrieben. Für die Zielgenuntersuchung wurde sowohl RNA im Northernblot, als auch cDNA in der Real-time-PCR eingesetzt. Im Northernblot konnte mit Hilfe von spezifischen Sonden für C-MYC und GAPDH die RNA für diese beiden Gene nachgewiesen werden. Die Sonde für GAPDH wurde aus einem 726 Basenpaar (bp) großen aufgereinigten RT-PCR-Produkt gewonnen. Sie hybridisierte am 5'-Ende der GAPDH-RNA und führte zu einer Detektion eines Signals bei 1,35 kb. Die C-MYC-Sonde dagegen war eine durch Restriktionsverdau präparativ gewonnene cDNA mit einer Größe von 2000 bp. Diese führte

zu einem Signal bei 2,37 kb. Beide Sonden wurden von Isabel Schlosser (KMolbio, GSF, München) zur Verfügung gestellt.

In Abb. 20 ist das Ergebnis des Northernblots dargestellt. C-MYC war gut detektierbar (Abb. 20, Spur 1-6). Es waren allerdings zwischen den einzelnen Zelllinien kaum Unterschiede in der Expressionsstärke von C-MYC zu erkennen (Abb. 20, Spur 1-6). Schwächere Signale, wie bei Ba/F3-TEL-JAK2 zu sehen (Abb. 20, Spur 4), sind durch unterschiedliche RNA-Lademengen zu erklären. Dies ließ sich durch die Detektion von GAPDH, einem „Housekeeping-Gen“, das zum Nachweis von gleichen RNA-Mengen auf dem Gel diente, bestätigen (Abb. 20). Hier ist auch bei Ba/F3-TEL-JAK2 ein schwächeres Signal vorhanden (Abb. 20, Spur 4).



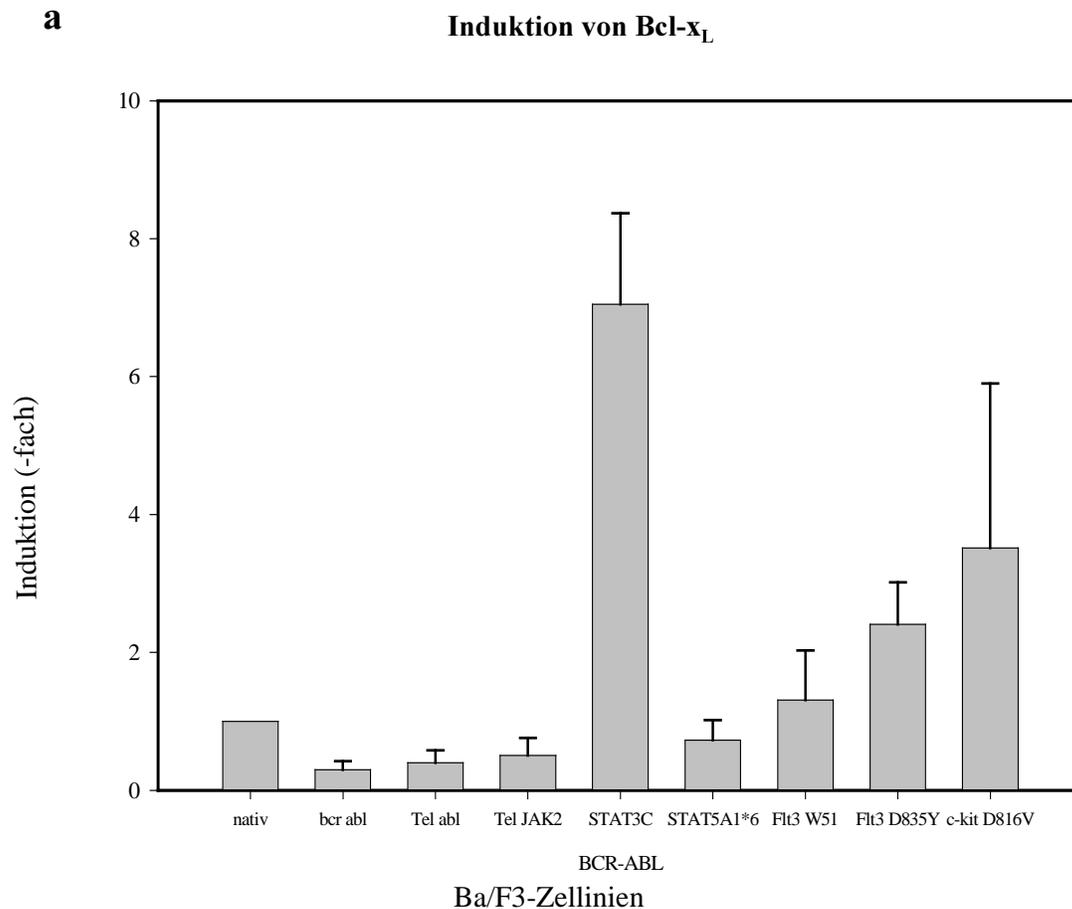
**Abb. 20:** *Nachweis von C-MYC und GAPDH in stabil transformierten Ba/F3-Zelllinien auf RNA-Ebene.*

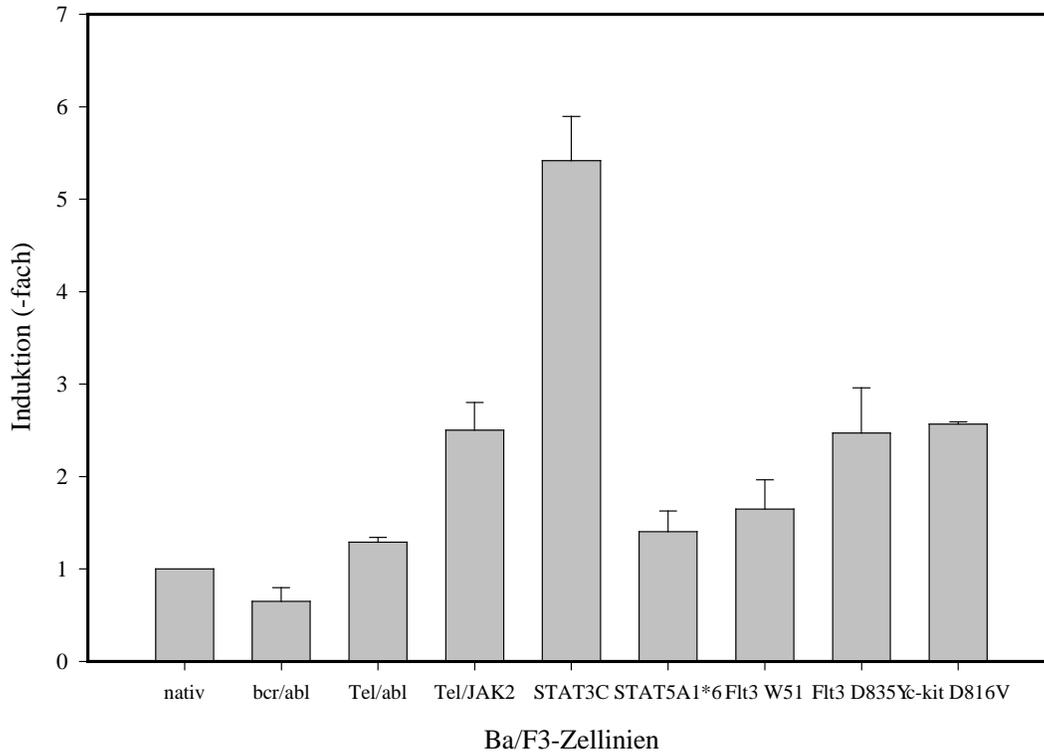
C-MYC und GAPDH wurden in den genannten Zelllinien im Northernblot mittels spezifischer Sonden nachgewiesen. Der Northernblot wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, durchgeführt.

Um eine Regulation nachweisen zu können, wurde nun die sensitivere Methode der Real-time-PCR verwendet. Hierfür wurden je 20 – 100 ng cDNA eingesetzt. Die Auswertung der Meßdaten ist in Abb. 21 gezeigt. Es ist zu sehen, daß Bcl-x<sub>L</sub>, ein Zielgen von STAT3, in den Ba/F3-STAT3C-Zellen um den Faktor sieben hochreguliert wird (Abb. 21 a). Im Gegensatz dazu wird dieses Gen in den Ba/F3-BCR-ABL-, TEL-ABL-, TEL-JAK2, STAT5A1\*6- und Flt3 W51-Zelllinien nicht hochreguliert (Abb. 21 a), obwohl in diesen Zellen STAT3 aktiviert

ist. In den Ba/F3-Flt3-D835Y- und C-Kit D816V-Zellen dagegen wird Bcl-x<sub>L</sub> geringfügig induziert, was darauf hindeutet, daß dieses Gen an der Transformation beteiligt ist, aber nur als einer von vielen Faktoren.

Bei der Auswertung für die Regulation von C-MYC zeichnete sich ein ähnliches Bild ab. Die Daten sind in Abb. 21 b dargestellt. Auch hier ist die Ba/F3-STAT3C-Zelllinie diejenige, die das C-MYC Gen am stärksten hochreguliert (sechsfach) (Abb. 21 b). Im Gegensatz dazu zeichnete sich diesmal für C-MYC bei den restlichen Ba/F3-Zelllinien, außer bei Ba/F3-BCR-ABL, eine geringe bis mäßige Induktion ab (Abb. 21 b). Dies war zu erwarten, da in diesen Zelllinien STAT5 aktiviert ist, und somit auch ein Zielgen von STAT5 induziert werden sollte.



**b****Induktion von C-MYC**

**Abb. 21: Induktion von  $Bcl-x_L$  und C-MYC durch STAT3 und STAT5 in nativen und transformierten Ba/F3-Zelllinien.**

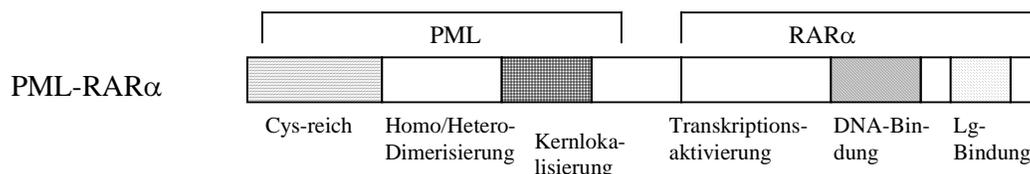
**a:** Induktion von  $Bcl-x_L$ . Es wurde RNA aus den genannten Zelllinien gewonnen und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde eine Real-time-PCR durchgeführt. Es wurde die Induktion dargestellt, wobei die nativen Ba/F3-Zellen gleich eins gesetzt wurden. **b:** Induktion von C-MYC. Es wurde wie unter a beschrieben vorgegangen.

In den Grafiken sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Real-time-PCR-Läufen dargestellt.

### 4.3 Untersuchung der Mechanismen der STAT3/5-Aktivierung in *in vitro* Modellsystemen

Da STAT3 und STAT5 in circa 70% der primären AML-Blasten und in AML-Zelllinien aktiviert sind, stellt sich die Frage, welche Mechanismen für die STAT-Aktivierung verantwortlich sind. Unsere Hypothese dazu war, daß AML-spezifische Alterationen direkt STAT3 und STAT5 aktivieren.

Um diese Hypothese zu bestätigen wurden *in vitro* Untersuchungen auf STAT-Aktivierung durch bekannte Fusionsgene wie PML-RAR $\alpha$  (Abb.22) und Mutationen von N/K-ras, die in 20-30% der AML-Patienten gefunden werden, durchgeführt. PML-RAR $\alpha$  ist eine AML-spezifische Mutation von myeloischen Transkriptionsfaktoren, die in einer Fusion des PML- und des RAR $\alpha$ -Gens besteht. Eine schematische Darstellung von PML-RAR $\alpha$  ist in Abb. 22 zu sehen.



**Abb. 22: Schematische Darstellung von PML-RAR $\alpha$ .**

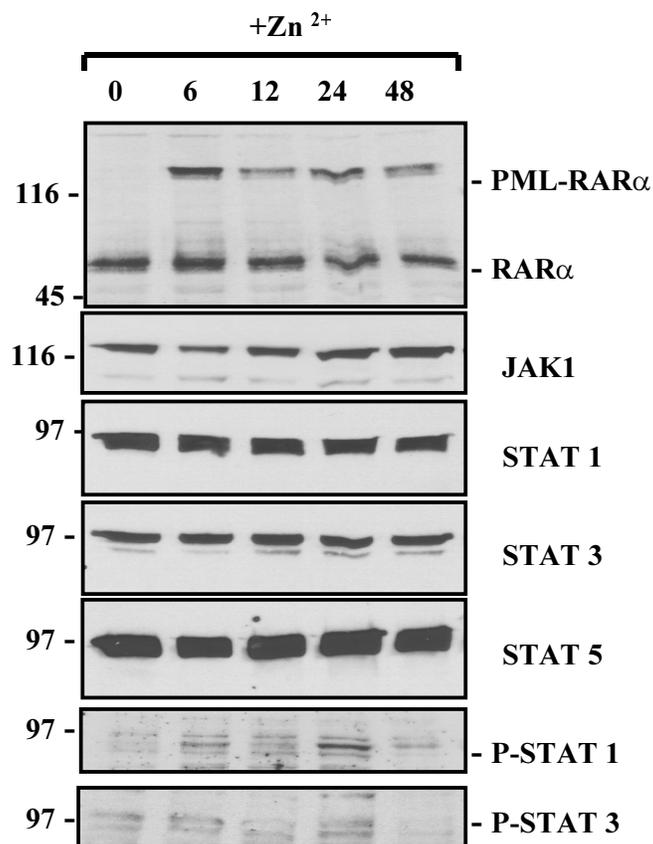
Cys-reich: Cystein-reich; LG: Ligand.

Für die durchgeführten Experimente wurde eine Zink-induzierbare U937 PML-RAR $\alpha$  Zelllinie (Testa, 1994) verwendet. Die Zellen wurden durch Zugabe von Zink [100  $\mu$ M] induziert und nach verschiedenen Zeitintervallen geerntet. Eine STAT-Aktivierung wurde im Westernblot durch spezifische Antikörper nachgewiesen, was in Abb. 23 gezeigt ist. Hier ist zu sehen, daß PML-RAR $\alpha$  ohne Zinkinduktion nicht exprimiert wird (Abb. 23, Spur 1). Die Expression ist sechs Stunden nach Zinkzugabe am stärksten (Abb. 23, Spur 2) und fällt dann wieder ab (Abb. 23, Spur 3-5). Das RAR $\alpha$ -Protein dagegen, was von dem Antikörper ebenfalls erkannt wird, ist unabhängig von der Zinkinduktion nachweisbar (Abb. 23, Spur 1-5).

Eine Detektion des Westernblots mit einem spezifischen STAT1-Antikörper zeigt, daß STAT1 über die gesamte Zeitreihe exprimiert wird. Es ist kein Unterschied in der

Proteinexpression vor und nach Zinkzugabe zu sehen (Abb. 23, Spur 1-5). Das gleiche Bild zeigte sich bei einer Detektion mit einem spezifischen STAT3-Antikörper, wobei die STAT3-Expression schwächer ist als die von STAT1 (Abb. 23, Spur 1-5). Als letztes wurde noch eine Detektion mit einem spezifischen STAT5-Antikörper durchgeführt. Auch hier ist kein Unterschied in der Proteinexpression vor und nach Zinkzugabe zu erkennen. Allerdings wird STAT5 am stärksten von den drei STAT-Proteinen exprimiert (Abb. 23, Spur 1-5).

Um eine STAT-Aktivierung durch PML-RAR $\alpha$  zeigen zu können, wurde noch mit spezifischen Phosphotyrosin-STAT1/5-Antikörpern detektiert. Hier war in beiden Fällen nur ein sehr schwaches Signal zu erkennen und es konnte auch keine Induktion der Aktivierung gezeigt werden (Abb. 23, Spur 1-5). Daraus läßt sich schließen, daß PML-RAR $\alpha$  keinen Einfluß auf die STAT-Aktivierung hat.



**Abb. 23: Expression und Tyrosinphosphorylierung von STAT-Proteinen in zinkinduzierbaren U937 PML-RAR $\alpha$ -Zelllinien.**

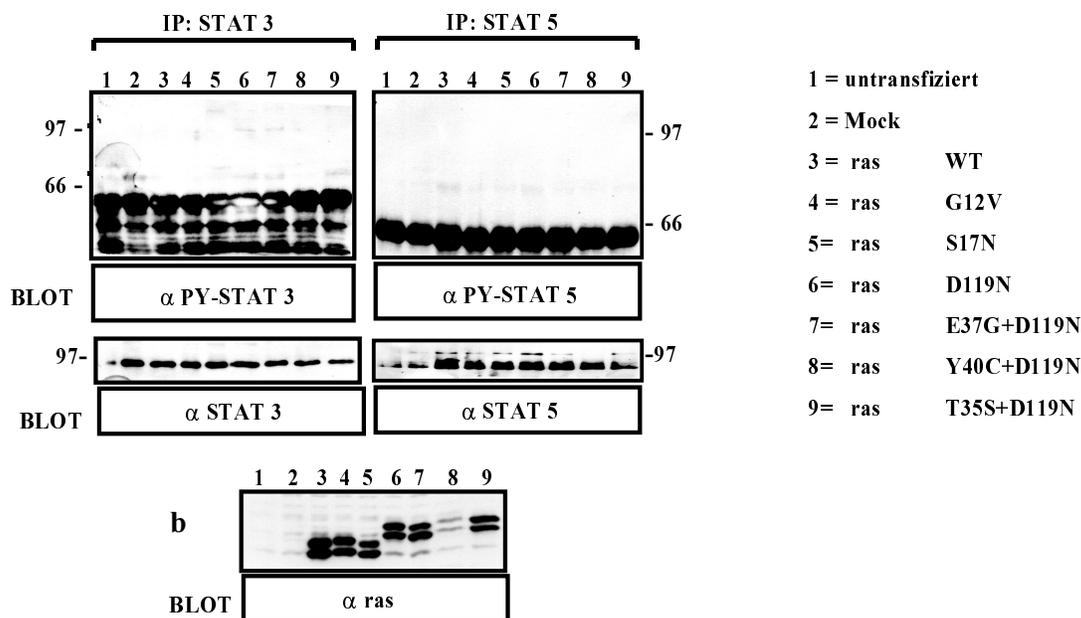
PML-RAR $\alpha$  wurde durch Zugabe von Zink [100  $\mu$ M] induziert und die Zellen wurden in verschiedenen Zeitintervallen, bis zu 48 Stunden, lysiert. Der Nachweis verschiedener Proteine erfolgte mittels den in der Abbildung genannten Antikörpern. P: Phospho; Zn<sup>2+</sup>: Zink.

Um die STAT-Aktivierung durch Mutationen von N/K-ras zu untersuchen, wurden *in vitro* Experimente mit verschiedenen ras-Mutanten durchgeführt. Hierfür wurden neben ras WT noch sechs verschiedene Mutanten (ras G12V, S17N, D119N, E37G+D119N, Y40C+D119N, T35S+D119N) verwendet, die eine oder zwei Punktmutationen besaßen (Cool, 1999). Diese Mutanten sind entweder konstitutiv aktiv oder wirken in dominant-negativer Weise.

Die dominant-negative ras S17N Mutation äußert sich in einer stark geminderten Affinität des Proteins zu GTP (Feig, 1988). Außerdem hemmt sie die Aktivierung von zellulärem Ras. Die ras D119N Mutante dagegen verhält sich wie eine aktivierte ras Mutante (Schmidt, 1996). Dies ist eine Folge der stark verminderten Nukleotid-Affinität, was der Mutante ermöglicht, GTP unabhängig vom Guanin Nukleotid Austauschfaktor (GEF) zu binden. Die Mutation E37G führt zu einer Schwächung der Interaktion mit Ras-Effektorproteinen wie c-Raf-1 und Phosphoinositol-3-Kinase. Das Einbringen dieser Mutation in die ras D119N Mutante führt dazu, daß die aktivierte ras Mutante zu einer dominant-negativen Mutante wird (Cool, 1999). Die Doppelmutanten ras T35S/D119N, E37G/D119N, Y40C/D119N wirken alle in einer dominant-negativen Art und Weise, wobei die Mutante T35S/D119N eine Serum-induzierte DNA-Synthese unterbrechen kann. Im Gegensatz dazu können die anderen beiden Doppelmutanten eine DNA-Synthese in hungrigen NIH3T3-Zellen induzieren (Cool, 1999). Die drei zusätzlich in die D119N Mutante eingebrachten Mutationen bewirken einzeln alle eine teilweise „loss-of-function“.

Da, nach dem Ergebnissen einer Studie von Cacalano (Cacalano, 2001), die STAT-Aktivierung durch den ras-Signalweg vermittelt werden kann, wurden die oben genannten ras Mutanten transient in 293-Zellen transfiziert, um eine mögliche STAT-Aktivierung untersuchen zu können. Um die detektierten Signale deutlich zuordnen zu können, sind Immunpräzipitationen durchgeführt worden. Für einen Nachweis der Aktivierung wurden spezifische Phosphotyrosin-Antikörper verwendet. Abbildung 24 zeigt die Ergebnisse dieser Experimente. Es ist weder bei STAT3 (Abb. 24 a, IP STAT3, Spuren 1-9) noch bei STAT5 (Abb. 24 a, IP STAT5, Spur 1-9) eine Aktivierung der STAT-Proteine zu sehen, was bedeutet, daß keine der ras Mutanten einen Einfluß auf die STAT-Aktivierung besitzt. Um gleiche Proteinladungen nachzuweisen, wurde noch mit spezifischen STAT3/5-Antikörpern detektiert. Es zeigte sich, daß in allen Fällen sowohl STAT3 (Abb. 24 a, IP STAT3, Spur 1-9) als auch STAT5 (Abb. 24 a, IP STAT5, Spur 1-9) gleichmäßig exprimiert wurde. Zur Kontrolle wurde die Expression der ras Mutanten nachgewiesen, die ohne Ausnahme zu detektieren war (Abb. 24 b, Spur 1-9). Diese Ergebnisse lassen also den Schluß zu, daß keine

direkte Interaktion des Ras- und des JAK/STAT-Signalweges vorhanden ist. Dies bedeutet, daß ein anderer Mechanismus für die STAT-Aktivierung verantwortlich ist.

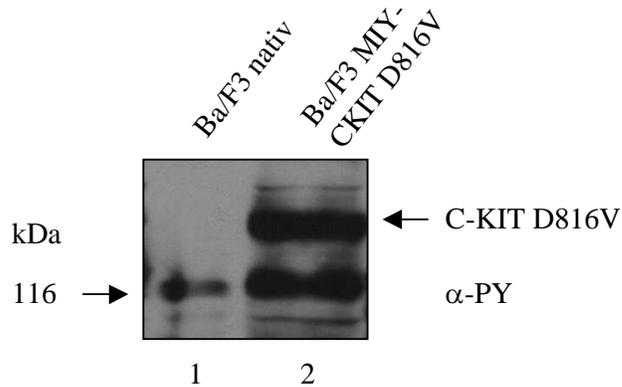


**Abb. 24: Koexpression von Ras-Mutanten und STAT3/5 in 293-Zellen.**

293-Zellen wurden transient mit dem Leervektor und den Ras-Mutanten und STAT3/5 transfiziert und nach 48 Stunden lysiert. **a:** Immunpräzipitate von STAT3 und STAT5 wurden auf einem 7,5-12,5% Gradientengel getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Die Blots wurden mit einem α-Phosphotyrosin-Antikörper detektiert, gestrippt und mit spezifischen STAT3/5-Antikörpern erneut detektiert. **b:** 50 µg Ganzzelllysate von transient transfizierten 293-Zellen, wie unter a beschrieben, wurden in einem 12% SDS-Gel getrennt und der Blot wurde mit einem spezifischen Ras-Antikörper detektiert.

Eine dritte Gruppe von Proteinen, die für die STAT-Aktivierung verantwortlich sein kann, sind leukämie-spezifische Fusionsproteine. In unserer Gruppe konnte in früheren Experimenten gezeigt werden, daß STAT3 und STAT5 durch die Proteintyrosinkinasen (PTK) TEL-ABL, TEL-JAK2 und BCR-ABL aktiviert werden. Für die Untersuchung von in der AML häufiger vorkommende PTKs wie C-Kit D816V, welche bei 10% der Patienten gefunden wird, wurden stabile Ba/F3-Zelllinien generiert. Dafür wurden Ba/F3-Zellen mit viralem MIY-C-Kit WT- und MIY-C-Kit D816V-Überstand infiziert und nach 48 – 72 Stunden im Zellsorter mittels ihrer YFP-Fluoreszenz sortiert. Die sortierten Zellen wuchsen faktorunabhängig. Die Expression der Konstrukte wurde im Westernblot nachgewiesen (Abb. 25). Als Negativkontrolle dienten native Ba/F3-Zellen, bei denen keine spezifische Phosphorylierungsbande bei 130/160 kDa zu detektieren war (Abb. 25, Spur 1). Bei den

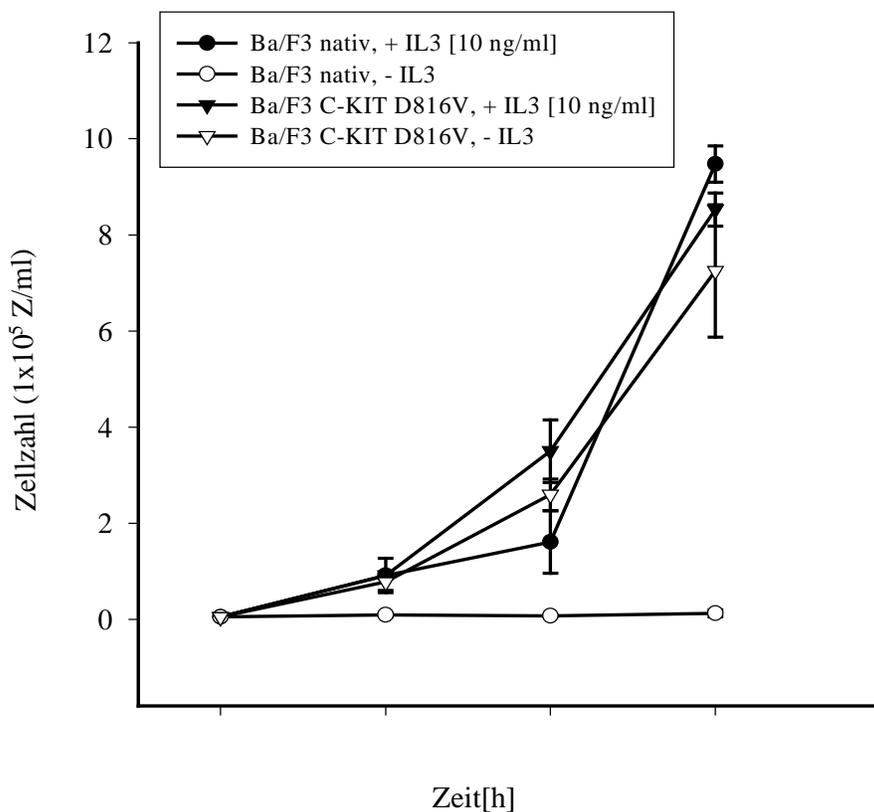
Ba/F3-MIY-C-Kit D816V-Zellen dagegen war ein spezifisches Signal bei 130/160 kDa nachzuweisen (Abb. 25, Spur 2).



**Abb. 25: Nachweis der Expression von MIY-C-Kit D816V in Ba/F3-Zellen.**

Die Expression von MIY-C-Kit D816V wurde im Westernblot durch Detektion mit einem Phosphotyrosin-Antikörper nachgewiesen.

Um das transformierende Potential von C-Kit D816V zu zeigen, wurde den Zellen IL-3 entzogen und anschließend Proliferationsassays mit [10 ng/ml] und ohne IL-3 durchgeführt. Die Auswertung dieser Daten ist in Abb. 26 dargestellt. Als Kontrolle wurden native Ba/F3-Zellen verwendet. Diese proliferierten mit IL-3, wogegen sie ohne IL-3 wie erwartet nicht wuchsen (Abb. 26). Die Ba/F3-C-Kit D816V-Zellen zeigten mit IL-3 ebenfalls eine Proliferation (Abb. 26). Aber auch ohne IL-3 fand eine Proliferation statt, die mit der von Ba/F3-C-Kit D816V-Zellen (mit IL-3) bzw. von nativen Ba/F3-Zellen (mit IL-3) zu vergleichen war (Abb. 26). Es konnte also gezeigt werden, daß C-Kit D816V ein transformierendes Potential besitzt.



**Abb. 26: Die C-Kit D816V Mutante induziert IL-3 unabhängiges Wachstum in Ba/F3-Zellen.**

Es wurden  $2,5 \times 10^4$  Zellen/ml ausgesät und über 72 Stunden mit [10 ng/ml] und ohne IL-3 kultiviert. Die Zahl lebender Zellen wurde nach 24/48/72 Stunden nach Trypanblaufärbung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Grafik zeigt Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Ansätzen des Proliferationsansatzes.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß onkogene PTKs und RTKs zu einer STAT-Aktivierung führen, die unabhängig vom Ras-Signalweg ist und wahrscheinlich nur durch den JAK/STAT-Signalweg, und hier durch die Regulation der Zielgene der STATs, beeinflusst wird.

#### 4.4 Untersuchung der Mechanismen der STAT3/5-Aktivierung in primären AML-Blasten *ex vivo*

Mutationen von Proteintyrosinkinasen, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden (siehe oben), z. B. die Flt3 Mutationen, sind in der AML am häufigsten auftretenden genetischen Alterationen. So wird Flt3-ITD, eine interne Tandemduplikation in der juxtamembranösen Domäne von Flt3 (siehe auch 4.2.2, Abb. 19), in 20-25% der AML-Fälle gefunden (Yokota, 1997; Hayakawa, 2000). Ebenso treten Flt3-D835 Mutationen in 7% der AMLs auf. Diese Mutationen sind Punktmutationen und kommen unabhängig von der Flt3-ITD Mutation vor (Abu-Duhier, 2001; Yamamoto, 2001). In unserer Gruppe konnte außerdem in stabilen Ba/F3-Flt3-ITD-Zellen gezeigt werden, daß diese Konstrukte transformierendes Potential besitzen und STAT3 und STAT5 aktivieren. Deshalb wurden, um unsere in Abschnitt 4.3 generierte Hypothese, daß nur onkogene Proteintyrosinkinasen die STAT3/5-Aktivierung induzieren zu überprüfen, Untersuchungen in primären AML-Blasten *ex vivo* durchgeführt. Hierbei wurde sowohl die STAT3/5-Aktivierung als auch der Flt3-Mutations-Status und die Korrelation der STAT-Aktivierung und des Flt3-Mutations-Status betrachtet.

Insgesamt stand Material von 60 Patienten zur Analyse zur Verfügung. Die Patientenzellen wurden mit RIPA-Puffer lysiert und nach einer Proteinbestimmung für die Analyse im Westernblot verwendet. Die STAT3/5-Aktivierung bzw. -Expression wurde durch spezifische Phospho-STAT3/5-Antikörper bzw. durch spezifische STAT-Antikörper nachgewiesen. Die Daten zur FAB-Klassifikation und der Genetik der Patientenproben wurden uns freundlicherweise von Frau Dr. Susanne Schnittger (Labor für spezielle Leukämiediagnostik, Klinikum Großhadern, München) zur Verfügung gestellt. Die Bestimmung des Flt3-Mutations-Status wurde in unserer Gruppe durch analytische Restriktionen (Ksenia Bagrintseva) und Sequenzierung (Karin Schmieja) des Materials durchgeführt.

Um die Daten in Bezug miteinander setzen zu können, wurden diese erst in verschiedenen Auswertungen zusammengestellt.

Zuerst wurden die Patientenproben nach der FAB-Klassifikation in einzelne Subgruppen eingeteilt, um einen Überblick über die verschiedenen, in dieser Patientengruppe vertretenen, AML-Subtypen zu bekommen. Diese Einteilung ist in Tabelle 1 gezeigt. Hier ist zu sehen, daß von den 60 untersuchten Patienten die meisten (je 17 Patienten) eine AML M1 oder M4

haben, wogegen die Subgruppen M0 und M3 (je 2 Patienten), sowie andere AML-Subformen (3 Patienten) am geringsten vertreten sind. Betrachtet man die Subgruppe M2, so sieht man, daß diese Gruppe etwas weniger stark vertreten ist als die Gruppen M1 und M4 (M2 = 11 Patienten). Im Gegensatz dazu tritt der Subtyp M5 (8 Patienten) nur etwa halb so häufig auf wie die Gruppen M1 und M4.

<b>FAB-Subtyp</b>	<b>Anzahl Patienten (n)</b>
<b>M0</b>	2
<b>M1</b>	17
<b>M2</b>	11
<b>M3</b>	2
<b>M4</b>	17
<b>M5</b>	8
<b>andere</b>	3
<b>Gesamtzahl Patienten</b>	60

**Tabelle 1: Einteilung der analysierten AML-Patientenproben nach der FAB-Klassifikation.**

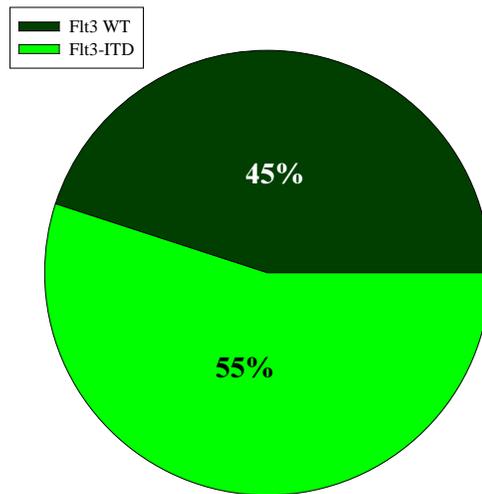
Eine andere Möglichkeit, die Patientenproben in Gruppen einzuteilen lieferte die Zytogenetik. Hier wurden die Proben, wie in Tabelle 2 dargestellt, nach ihrem Karyotyp geordnet. Man sieht, daß die Gruppe mit einem normalen Karyotyp die meisten Patienten (33) beinhaltet. Dagegen sind komplexe Karyotypen (2 Patienten) bzw. Karyotypen mit balancierten

Translokationen wie der Inversion 16 (inv 16) oder der Translokation t(15;17) selten (4 Patienten). Das gleiche galt für Patienten mit anderen, seltenen Mutationen im Karyotyp (17 Patienten), die hier in einer Gruppe zusammengefaßt wurden.

<b>Genetik/Karyotyp</b>	<b>Anzahl Patienten (n)</b>
<b>normal</b>	33
<b>komplex</b>	2
<b>balancierte Trans- Lokation (z. B. inv 16)</b>	4
<b>sonstige</b>	17
<b>nicht durchgeführt</b>	4
<b>Gesamtzahl Patienten</b>	60

**Tabelle 2: Einteilung der analysierten AML-Patientenproben nach Mutationsanalysen durch die Zytogenetik..**

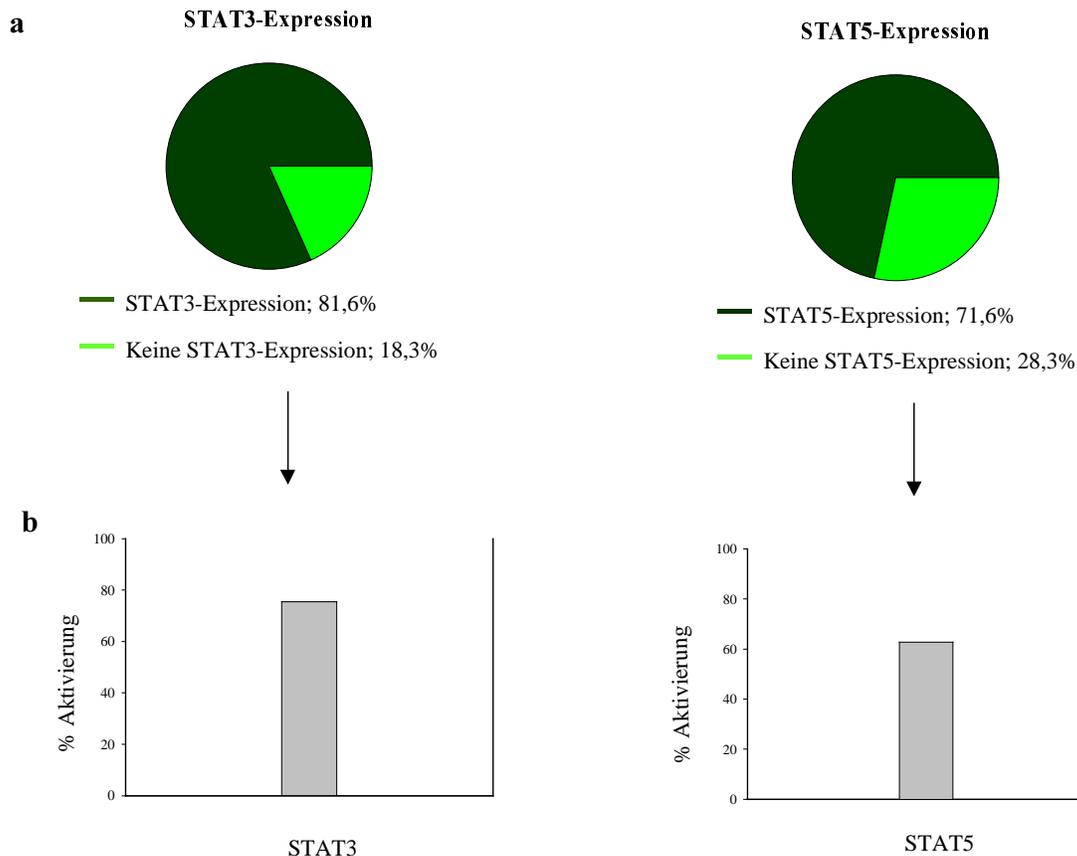
Um später einen Zusammenhang zwischen der STAT-Aktivierung und dem Flt3-Mutations-Status herstellen zu können, wurde dieser für die 60 Patientenproben, wie von Yamamoto et al. (Yamamoto, 2001) und Kiyoi et al. (Kiyoi, 1998) beschrieben, festgestellt. Die Abb. 27 zeigt die Verteilung der Flt3 Mutationen innerhalb dieser Patientengruppe. Etwa die Hälfte der Patienten (27) besitzen normales Flt3 WT. Aber auch die Flt3-ITD Mutation ist mit 33 Patienten stark vertreten. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der großen Zahl von Patienten mit einem normalen Karyotyp, denn die meisten Patienten mit einer Flt3-ITD Mutation zeigen einen normalen Karyotyp.



**Abb. 27: Analyse der AML-Patientenproben auf ihren Flt3-Mutations-Status.**

Die AML-Proben wurden, wie von Yamamoto et al. (Yamamoto, 2001) und Kiyoi et al. (Kiyoi, 1998) beschrieben, auf ihren Flt3-Mutations-Status hin analysiert.

Betrachtet man, nach Analyse der Patientenproben im Westernblot durch Detektion mit spezifischen STAT- bzw. Phospho-STAT-Antikörpern, die Expression/Aktivierung von STAT3 und STAT5, so erhielt man das in Abb. 28 dargestellte Ergebnis. Es ist zu sehen, daß mehr als 2/3 aller Patienten (81,6%; 49 Patienten) STAT3 exprimieren (Abb. 28 a). Von diesen Patienten zeigen wiederum 75,5% eine STAT3-Aktivierung (Abb. 28 b). Eine Expression von STAT5 konnte dagegen nur bei 71,6% (43 Patienten) der Proben nachgewiesen werden (Abb. 28 a). Von diesen 43 Patienten zeigten 62,8% eine STAT5-Aktivierung (Abb. 28 b). Es konnte also gezeigt werden daß die meisten Patienten sowohl STAT3 als auch STAT5 exprimieren und auch in aktivierter Form vorliegen haben, wobei die STAT3-Expression/Aktivierung stärker vorhanden ist (Abb. 28).

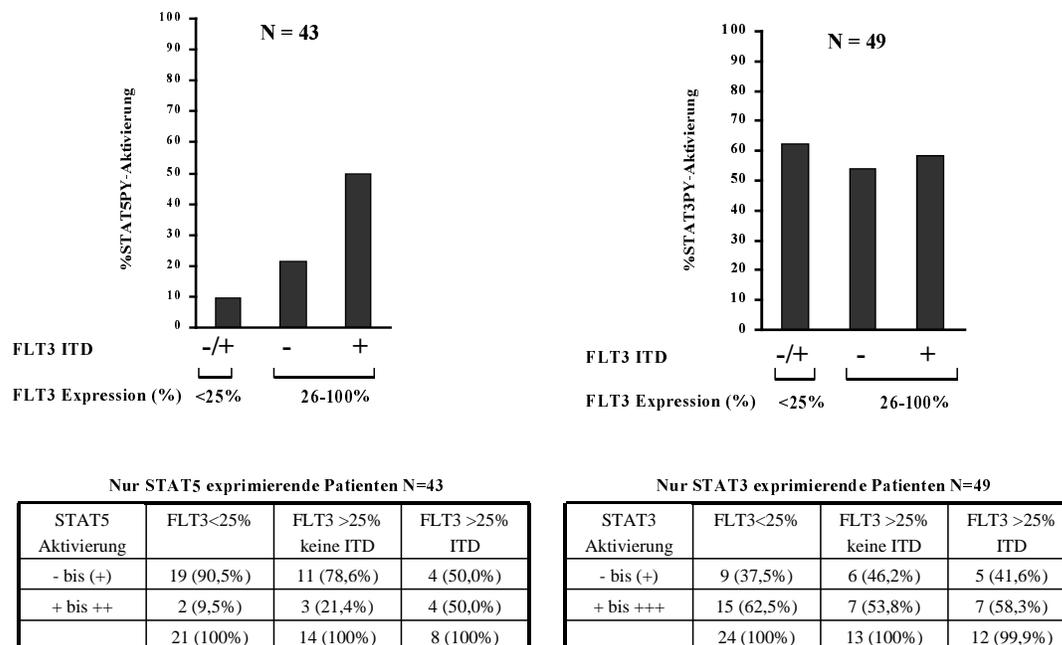


**Abb. 28: Nachweis der STAT3- und STAT5-Expression und Aktivierung in AML-Blasten.**

**a:** Prozentsatz der Patienten, die STAT3 bzw. STAT5 exprimieren. Die Expression wurde im Westernblot durch Detektion mit spezifischen STAT3/5-Antikörpern nachgewiesen. **b:** Prozentsatz der STAT3 und STAT5 exprimierenden Patienten, die eine STAT3/5 Aktivierung zeigen. Die Aktivierung wurde im Westernblot durch Detektion mit spezifischen Phospho-STAT3/5-Antikörpern nachgewiesen.

Um unsere in Abschnitt 4.3 generierte Hypothese, daß nur onkogene PTKs eine STAT3/5-Aktivierung induzieren zu überprüfen, wurde die STAT-Aktivierung in Abhängigkeit des Flt3-Mutations-Status der Patienten betrachtet. Hierfür wurde die Flt3-Expression in den Patientenzellen gemessen. In Abb. 29 ist diese Korrelation gezeigt. Für die Aktivierung von STAT5 ist zu sehen, daß diese bei geringer Expression von Flt3 bei 10% der Patienten zu finden ist, unabhängig davon, ob eine ITD-Mutation vorhanden ist oder nicht (Abb. 29 a). Ist dagegen eine Flt3-Expression in 25% der AML-Blasten detektierbar, so steigt die STAT5-Aktivierung auf das Doppelte (20%; Abb. 29 a). Ist aber eine Flt3-ITD-Mutation vorhanden und die Flt3-Expression liegt bei über 25%, so ist bei 50% der Patienten eine STAT5-

Aktivierung zu detektieren (Abb. 29 a). Die Flt3-ITD-Mutation spielt also im Zusammenhang mit der Flt3-Expression eine große Rolle bei der STAT5-Aktivierung. Im Gegensatz dazu wird die STAT3-Aktivierung, die unabhängig von der Flt3-Expression bei 50-60% liegt, durch die Flt3-ITD Mutation nicht beeinflusst (Abb. 29 b).



**Abb. 29: Korrelation von STAT3/5-Aktivierung in AML-Blasten mit dem Flt3-Mutations-Status.**

**a:** STAT5-Aktivierung in Abhängigkeit vom Flt3-Mutations-Status. Die STAT5-Aktivierung wurde bei den Patienten, die STAT5 exprimieren, mit der Flt3-Expression und dem Flt3-Mutations-Status korreliert. **b:** STAT3-Aktivierung in Abhängigkeit vom Flt3-Mutations-Status. Es wurde wie unter a beschrieben vorgegangen.

Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, daß eine STAT3- bzw. STAT5-Aktivierung in 75,5% bzw. 62,8% der AML-Patienten nachweisbar ist. Außerdem war in dem von uns untersuchten Patientenkollektiv eine Korrelation von der Flt3-Expression, dem Auftreten einer Flt3-ITD-Mutation und einer STAT5-Aktivierung nachweisbar, wogegen dies bei der STAT3-Aktivierung keine Rolle spielte.

## 5 Diskussion

Die Grundlage zu der vorliegenden Arbeit lieferten Ergebnisse früherer Untersuchungen zum JAK/STAT-Signalweg an primären AML-Blasten und Zelllinien von Patienten mit AML. Da die normale Proliferation und Differenzierung von myeloischen Zellen durch Zytokine wie dem „granulocyte colony-stimulating factor“ (G-CSF) oder dem „granulocyte-macrophage colony-stimulating factor“ (GM-CSF) reguliert werden, wurde vermutet, daß eine gestörte Signalweiterleitung von Zytokinrezeptoren über die Januskinasen und die STAT-Proteine an der Pathogenese der AML beteiligt sein könnte. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, daß in leukämischen Blasten von Patienten und auch in leukämischen Zelllinien sowohl STAT1 als auch STAT3 und STAT5 stark exprimiert und konstitutiv aktiviert sind (Biethahn, 1999). Außerdem ist bekannt, daß STAT-Proteine in vielen malignen Tumoren, einschließlich der AML, und in transformierten Zelllinien konstitutiv aktiviert sind. Es wird postuliert, daß konstitutiv aktives STAT3 ein transformierendes Potential besitzt (Bromberg, 1999), und daß STAT5 an der zellulären Transformation durch BCR-ABL und TEL-JAK2 beteiligt ist (de Groot, 1999; Schwaller, 2000).

In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die konstitutive STAT-Aktivierung eine wichtige Rolle bei der Transformation von hämatopoetischen Zellen spielt. Außerdem konnte gezeigt werden, daß onkogene Rezeptor- und Proteintyrosinkinase zu einer STAT-Aktivierung führen, die unabhängig vom Ras-Signalweg ist und wahrscheinlich nur durch den JAK/STAT-Signalweg beeinflusst wird.

### 5.1 Stabile Expression einer dominant-negativen STAT3-Mutante in AML-Zelllinien mit Hilfe eines Tet-off-Systems

Es wurde ein induzierbares Tet-off System gewählt, da dadurch die durch das dominant-negative STAT3D auftretenden Effekte besser untersucht und eingeordnet werden können. Die antiproliferative Wirkung des Proteins und ein proapoptotischer Effekt von stark überexprimiertem STAT3 in der Zelle, die in einem stabilen Expressionssystem auftreten,

erschweren eine Untersuchung der Rolle von STAT3 in der Pathogenese der AML. In einem induzierbaren System dagegen läßt sich die Expression von STAT3D kontrollieren. Dadurch ist es möglich, den antiproliferativen und differenzierungsfördernden Effekt dieses Proteins näher zu charakterisieren und die Rolle von STAT3 zu untersuchen.

Nach Etablierung des Tet-off Systems konnte gezeigt werden, daß dieses mit dem STAT3D-Gen und in U937 Zellen funktionsfähig, aber sehr „leaky“ ist. Diese „leakiness“ äußerte sich in einer deutlichen basalen Expression von STAT3D auch im „off“-Zustand des Systems und in einem reduzierten Zellwachstum. Diese Tatsache führte dazu, daß die Zellen für weitere Experimente nicht zur Verfügung standen.

Eine Ursache sowohl für die „leakiness“ als auch für das reduzierte Zellwachstum könnte die zweifache klonale Selektion sein, die die Zellen während der Generierung eines solchen Tet-off Systems durchlaufen müssen. Dabei werden Subklone selektiert, die möglicherweise andere Eigenschaften haben als die parenteralen Zellen, was sowohl durch die Vereinzelung der Zellen als auch durch die schlechteren Wachstumsbedingungen im Softagar beeinflusst wird. Zusätzlich übt das verwendete Antibiotikum einen Selektionsdruck aus.

Eine zweite Ursache ist ein möglicher toxischer Effekt der verwendeten Antibiotika. Denn diese werden für die Selektion in einer Konzentration eingesetzt, bei der nur Zellen, die eine Resistenz erworben haben, überleben. Außerdem wurden bei der zweiten Selektion zwei Antibiotika gleichzeitig verwendet, da das Tet-off System mittels Doxycyclin ausgeschaltet werden mußte. Dieser Einsatz von zwei verschiedenen Wirkstoffen gleichzeitig und eine dadurch bedingte höhere Antibiotika-Konzentration kann die Eigenschaften der Zellen ebenfalls beeinflussen haben.

Ein weiterer Grund für die „leakiness“ ist eine mögliche Abschwächung der Bindespezifität des Transaktivators an seine Operatorsequenz im Response-Plasmid. Diese Spezifität war von Gossen et al. (Gossen, 1992) in HeLa Zellen gezeigt worden. Da für den zweiten Schritt bei der Etablierung des Tet-off Systems ein tTA-Zellklon mit einer geringen „leakiness“ und einer guten Induktion ausgesucht wurde (Franzrahe, 2000; Franzrahe, 2001), ist die Möglichkeit für eine Reduktion der Spezifität des Transaktivators, und somit eine Erhöhung der „leakiness“, gegeben. Dies wird ebenfalls durch die Selektion (Vereinzelung der Zellen, schlechtere Wachstumsbedingungen, Antibiotika-Konzentrationen, ect.) begünstigt.

Im Gegensatz dazu steht noch der Effekt des eingebrachten Gens als hauptsächliche Ursache für das reduzierte Zellwachstum. Denn das dominant-negativ wirkende STAT3D hat sowohl einen wachstumshemmenden, als auch einen differenzierungsinduzierenden und proapoptotischen Effekt (Niu, 2001). Dadurch läßt sich das verlangsamte Wachstum der Zellen erklären. Denn, durch die „leakiness“ bedingt, ist ständig eine basale Expression von STAT3D vorhanden und auch die wachstumshemmenden, differenzierungsinduzierenden und proapoptotischen Effekte treten auf. Diese Wachstumsverlangsamung durch die Expression von STAT3D konnte in späteren Experimenten bestätigt werden.

Somit hat das zur Untersuchung der Rolle von STAT-Proteinen in der AML verwendete Tet-off System, wegen der vorhandenen „leakiness“ des Systems, keine endgültige Antwort auf unsere Fragestellung gebracht, so daß wir zur Bearbeitung der dieser Arbeit zugrundeliegenden Fragestellung ein alternatives experimentelles Konzept verfolgt haben.

## **5.2 Etablierung von stabilen Ba/F3-Zelllinien mit konstitutiv aktivem STAT3 und STAT5**

Aufgrund der schlechten Proliferation der tet-induzierbaren U937tTA-STAT3D-Zellen sind wir auf ein anderes Konzept ausgewichen, um die Bedeutung von STAT3 und STAT5 in der malignen Transformation hämatopoetischer Zellen untersuchen zu können. Dafür wurden auf der einen Seite konstitutiv aktive STAT-Mutanten anstatt dominant-negativer Mutanten verwendet. Auf der anderen Seite wurde eine IL-3 abhängige pro-B-Mauszelllinie (Ba/F3) verwendet, da der transformierende Effekt konstitutiv aktiver STAT-Mutanten auf Grund der Faktorabhängigkeit der Zellen beurteilt werden kann.

Mit diesem System konnte gezeigt werden, daß konstitutiv aktives STAT3 (STAT3C) und STAT5 (STAT5A1\*6) im Gegensatz zu STAT3WT in hämatopoetischen Zelllinien transformierendes Potential besitzen und zu faktorunabhängigem Wachstum führen. Es wurde außerdem gezeigt, daß dominant-negatives STAT3D in transformierten Ba/F3-BCR-ABL-Zellen ein wachstumsverlangsamendes Potential hat. Zusätzlich wurde bei der

Untersuchung der Regulation von STAT3/5-Zielgenen eine Induktion von C-MYC und Bcl-x<sub>L</sub> durch STAT3C nachgewiesen.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß konstitutiv aktives STAT5A1\*6 in hämatopoetischen Zellen transformierendes Potential besitzt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit früheren Arbeiten von Onishi et al. (Onishi, 1998) und Nosaka et al. (Nosaka, 1999). Im Gegensatz zu diesen Arbeiten wurde hier aber kein retrovirales System für die Generierung der stabilen Ba/F3-STAT5A1\*6-Zellen verwendet, sondern, nach Umklonierung in einen pCDNA6A Vektor, eine Elektroporation mit anschließender Selektion durchgeführt. Diese Zellen dienten als Positivkontrolle für die Ba/F3-STAT3C-Zellen. Denn mit Hilfe der Ba/F3-STAT5A1\*6-Zellen konnte die Transformation der Ba/F3-STAT3C-Zellen eindeutig dem konstitutiv aktivem STAT3C zugeordnet werden (siehe 4.2.1, Abb. 11 und Abb. 13).

Bei der Zielgenuntersuchung konnte keine Induktion von C-MYC oder Bcl-x<sub>L</sub> nachgewiesen werden (siehe 4.2.2, Abb. 21). Dies steht im Gegensatz zu den publizierten Daten (Nosaka, 1999; Onishi, 1998; Silva, 1999), denn es konnte eine, durch konstitutiv aktives STAT5, induzierte Bcl-x<sub>L</sub> Expression gezeigt werden. Zusätzlich wurde eine STAT5 Konsensus-Bindestelle in der Bcl-x<sub>L</sub> Promoterregion gefunden (Smithgall, 2000; Socolovsky, 1999). Folglich sollte eine Bcl-x<sub>L</sub> Induktion vorhanden sein. Da dies nicht der Fall ist, bedeutet das, daß die Transformation der Ba/F3-Zellen durch andere Zielgene von STAT5 hervorgerufen wird, da eine Induktion von Bcl-x<sub>L</sub> weder im Northernblot noch in der Real-time-PCR nachzuweisen war. Auch für C-MYC konnte keine Induktion gezeigt werden. Dies bedeutet, daß dieser Transkriptionsfaktor, der ein wichtiger Regulator von Zellproliferation und Survival ist, zumindest in den hier verwendeten Modellsystemen keine Rolle bei der Transformation von Ba/F3-Zellen durch STAT5A1\*6 spielt.

Es konnte außerdem erstmals in dieser Arbeit gezeigt werden, daß STAT3C in hämatopoetischen Zellen transformierendes Potential besitzt. Dies war bis jetzt nur für epitheliale Zellen bekannt (Bromberg, 1999). Im Gegensatz zur Generierung von Ba/F3-STAT5A1\*6-Zellen wurden die Ba/F3-STAT3C-Zellen durch retrovirale Infektion und Sortierung im FACS erhalten. Eine Transformation der Zellen äußerte sich, wie bei STAT5A1\*6, durch ein faktorunabhängiges Wachstum. Durch Proliferationsassays konnte in Übereinstimmung mit den Experimenten an epithelialen Zellen das transformierende Potential gezeigt werden (4.2.1, Abb. 13). Die faktorunabhängige Proliferation der Zellen weist auf

einen Schutz der Zellen vor Apoptose hin, wie es für U266-Myelomazellen beschrieben wurde (Catlett-Falcone, 1999).

Bei der Zielgenuntersuchung konnte eine starke Induktion sowohl von Bcl-x<sub>L</sub> als auch von C-MYC detektiert werden. Diese Daten stehen im Einklang mit in anderen Zellsystemen publizierten Daten. So wurde in humanen Myelomazellen ein Zusammenhang zwischen konstitutiver STAT3 Aktivierung, Bcl-x<sub>L</sub> Induktion sowie Apoptoseresistenz nachgewiesen (Catlett-Falcone, 1999). Bromberg et al. konnten außerdem zeigen, daß die Expression von STAT3C in epithelialen Zellen die Transkription eines Reporterkonstruktes mit einer Promotersequenz vom bcl-x-Gen induziert (Bromberg, 1999). Zusätzlich wurden STAT3 Bindestellen im Bcl-x<sub>L</sub> Promoter gefunden (Catlett-Falcone, 1999; Fujio, 1997). Diese Daten unterstützen unser Ergebnis zur Induktion von Bcl-x<sub>L</sub> durch STAT3C in hämatopoetischen Zellen. Es kann außerdem der Schluß gezogen werden, daß STAT3C über Bcl-x<sub>L</sub> eine anti-apoptotische Wirkung ausübt, was wiederum zur Transformation der Zellen beiträgt.

Auch die Induktion von C-MYC durch STAT3C konnte in hämatopoetischen Zellen erstmals nachgewiesen werden. Diese Daten stehen ebenfalls im Einklang mit Publikationen zum IL-6 Signalweg, in dem STAT3 eine wichtige Rolle spielt. So konnten Kiuchi et al. (Kiuchi, 1999) zeigen, daß STAT3 die transkriptionelle Regulation des C-MYC Gens, die durch IL-6 induziert wird, vermittelt. Zusätzlich ist bekannt, daß STAT3 Bindestellen im C-MYC Promoter existieren (Bowman, 2000; Hirano, 2000). Es kann also der Schluß gezogen werden, daß sowohl Bcl-x<sub>L</sub> eine anti-apoptotische als auch C-MYC eine proliferative Wirkung auf die durch STAT3C transformierten Zellen ausüben.

Für Ba/F3-Zellen, die durch BCR-ABL, TEL-ABL, TEL-JAK2, Flt3-ITD und Flt3 D835Y transformiert wurden, konnte keine Induktion von Bcl-x<sub>L</sub> nachgewiesen werden, obwohl diese Zelllinien alle STAT3 und STAT5 konstitutiv aktiviert exprimieren (siehe 4.2.2, Abb. 21). Es ist wahrscheinlich, daß diese PTKs Bcl-x<sub>L</sub> induzieren. Diese Induktion ist aber möglicherweise zu schwach, um sie detektieren zu können. Im Gegensatz dazu war bei Ba/F3-STAT3C-Zellen eine starke Induktion von Bcl-x<sub>L</sub> detektierbar, da Bcl-x<sub>L</sub> ein direktes Zielgen von STAT3 ist. Auch für C-MYC konnte, außer bei Ba/F3-TEL-JAK2- und Ba/F3-TEL-ABL-Zellen, keine Induktion durch die PTKs gezeigt werden, da auch hier die Induktion möglicherweise zu schwach für eine Detektion war. Für die Fusionsproteine TEL-ABL und TEL-JAK2 gibt es dagegen frühere Daten, die zeigen, daß der mRNA Gehalt von C-MYC durch die Expression von diesen Proteinen erhöht wird (Lacronique, 2000; Hannemann,

1998). So kann die Transformation der Ba/F3-Zellen durch diese beiden Proteine wenigstens teilweise mit der Induktion von C-MYC erklärt werden.

Zusätzlich konnte in dieser Arbeit auch ein transformierendes Potential für die Rezeptortyrosinkinase (RTK) C-KIT D816V gezeigt werden (siehe 4.3, Abb. 26). Diese transformierte Zelllinie zeigte eine leicht erhöhte Induktion von C-MYC (siehe 4.2.2, Abb. 21), was mit den Ergebnissen von Ning et al. (Ning, 2001) übereinstimmt. Da auch hier eine konstitutive STAT3 Aktivierung vorhanden ist, liegt es nahe, daß C-MYC, über die STAT3 Aktivierung, zu der Transformation beiträgt.

Mit Hilfe der dominant-negativen Mutante STAT3D und der transformierten Ba/F3-BCR-ABL-Zelllinie wurde ein wachstumsverlangsamendes Potential für STAT3D nachgewiesen (siehe 4.2.1, Abb. 16). Da bekannt ist, daß STAT3 in BCR-ABL exprimierenden Zellen konstitutiv aktiviert ist (Chai, 1997; de Groot, 1999), ließ sich aus diesem Ergebnis der Schluß ziehen, daß die dominant-negative Mutante in der Zelle Dimere mit aktiviertem STAT3 bildet, so daß der durch konstitutiv aktives STAT3 vorhandene proproliferative und anti-apoptotische Effekt gemindert wird. Diese Daten liefern auch eine mögliche Erklärung für den, durch die „Leakiness“ verursachten, im Tet-off System aufgetretenen Effekt der Verlangsamung des Zellwachstums.

### **5.3 Mechanismen der STAT-Aktivierung**

Daß konstitutiv aktivierte STAT-Proteine transformierendes Potential besitzen, konnte durch die Generierung von stabilen Ba/F3-Zelllinien mit konstitutiv aktivem STAT3 und STAT5 gezeigt werden. Dies bestätigt die Vermutung, daß aktivierte STAT-Proteine eine Rolle bei der Transformation von Zellen spielen. Um die Mechanismen der STAT-Aktivierung in der AML zu untersuchen, wurden verschiedene leukämiespezifische genetische Alterationen auf ihr STAT-aktivierendes Potential untersucht. In diesen Experimenten wurde gezeigt, daß nur onkogene Phosphotyrosinkinasen, jedoch nicht aktivierte ras-Mutanten oder PML-RAR $\alpha$  STAT3/5 aktivieren können (Spiekermann, 2002).

Bekannte AML-spezifische Mutationen wie PML-RAR $\alpha$  und N/K-ras wurden auf ihre Fähigkeit, STAT-Proteine zu aktivieren, untersucht. Das onkogene Fusionsprotein PML-RAR $\alpha$  diente dazu, festzustellen, ob ein allgemeiner Mechanismus zur STAT-Aktivierung führt, oder ob es sich hierbei um einen spezifischen Mechanismus onkogener PTKs/RTKs handelt. Denn es ist bekannt, daß PML-RAR $\alpha$  nötig ist, um akute Promyelozytenleukämie (APL) zu verursachen. Zusätzlich zu diesem Fusionsprotein muß aber mindestens eine weitere Mutation auftreten. Dies wurde in *in vivo* Experimenten an einem Mausmodell gezeigt, da, bis zum Auftreten einer APL, eine Latenz von sechs Monaten bis zu einem Jahr beobachtet wurde (Grisolano, 1997; He, 1998; Piazza, 2000).

Da eine Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges durch PML-RAR $\alpha$  als zusätzliches Ereignis für die Entstehung von APL möglich ist, wurde dies in dieser Arbeit untersucht. Es konnte aber keine STAT3- oder STAT5-Aktivierung nachgewiesen werden. Daraus kann geschlossen werden, daß PML-RAR $\alpha$  den JAK/STAT-Signalweg nicht beeinflusst. Somit liegt also kein allgemeiner Aktivierungsmechanismus von STAT-Proteinen durch leukämische Fusionsproteine ohne PTK-Aktivität vor.

Im Gegensatz dazu wurde mit ras-Mutanten, die in der AML sehr häufig sind (20-30%), untersucht, ob ein „cross talk“ zwischen dem ras- und dem JAK/STAT-Signalweg durch STAT-Aktivierung stattfindet. Auch hier konnte keine STAT3/5-Aktivierung durch aktivierte ras-Mutanten nachgewiesen werden. Da in epithelialen Zellen eine Aktivierung von STAT3 durch eine aktivierte ras-Mutante induziert werden konnte (Zushi, 1998), sollte diese Hypothese in hämatopoetischen Zellen überprüft werden. Außerdem haben Mizuguchi et al. (Mizuguchi, 2000) erst vor kurzem eine JAK Kinase vermittelte Aktivierung des ras-Signalweges beschrieben. Da in unseren Experimenten keine STAT3/5-Aktivierung durch aktivierte ras-Mutanten nachweisbar war, scheint eine direkte Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges durch aktiviertes ras als Ursache für die konstitutive STAT3/5-Aktivierung in AML-Blasten unwahrscheinlich.

Dagegen wurde in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, daß Ba/F3-Zellen, die stabil mit onkogenen PTKs (TEL-JAK2, TEL-ABL, BCR-ABL) transfiziert wurden, transformiert sind und aktiviertes STAT3 und STAT5 exprimieren. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit *in vivo* Studien an einem Maus-Knochenmarkstransplantationsmodell in STAT5A/B<sup>-/-</sup> und

Wildtypmäusen (Schwaller, 2000), in denen gezeigt werden konnte, daß STAT5 für ein durch TEL-JAK2 induziertes myelo- und lymphoproliferatives Syndrom essentiell ist.

Eine weitere onkogene Mutante einer PTK, die bei ca. 10% der AML-Patienten nachweisbar ist, stellt die C-KIT D816V Mutante dar. Auch hier zeigte sich, nach stabiler Transfektion von Ba/F3-Zellen, ein transformierendes Potential dieser Mutante (siehe 4.3, Abb. 26). Eine STAT3- oder STAT5-Aktivierung konnte, im Gegensatz zu den bei den durch andere PTKs transformierten Zelllinien erhaltenen Ergebnissen, nicht detektiert werden. Dagegen ist von anderen Gruppen in einer humanen AML-Zelllinie eine STAT3-Aktivierung durch C-KIT D816V gefunden worden (Ning, 2001). Aber auch hier gibt es unterschiedliche Daten. So wurde nur eine Serin- nicht aber eine Tyrosinphosphorylierung von STAT3, nach einer SCF-Stimulierung, in einer humanen, SCF-abhängigen („stem cell factor“), myeloischen Zelllinie gefunden (Gotoh, 1996). Im Gegensatz dazu haben andere Gruppen wiederum keinen Effekt von C-KIT auf die Aktivierung von STAT-Proteinen gefunden (O’Farrell, 1996; Jacobs-Helber, 1997). Da in unseren Experimenten eine Mauszelllinie verwendet wurde, und in verschiedenen Zellsystemen unterschiedliche Effekte von C-KIT auf die Aktivierung von STAT-Proteine nachweisbar waren, ist es wahrscheinlich, daß C-KIT D816V in unserem Zellsystem keine STAT3/5- Aktivierung induziert.

Diese Erkenntnisse lassen darauf schließen, daß die aktivierten STAT-Proteine eine wichtige Rolle bei der Transformation von hämatopoetischen Zellen durch onkogene PTKs spielen. Im Gegensatz hierzu können andere Onkogene, die in der AML nachweisbar sind, wie ras-Mutationen oder PML-RAR $\alpha$  STAT3 oder STAT5 nicht direkt aktivieren.

#### **5.4 STAT-Aktivierung in primären AML-Blasten in Abhängigkeit von PTK-Mutationen**

Die häufigste genetische Alteration in der AML ist die Flt3-ITD Mutation, die bei 25% der AML-Patienten vorkommt. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß stabile Ba/F3-Flt3-ITD-Zellen transformiert und STAT3 und STAT5 aktiviert werden. Daher wurde in primären AML-Blasten sowohl die STAT3- und STAT5-Aktivierung als auch die Korrelation mit den Flt3-Mutationen untersucht.

Es wurde, um die *in vitro* generierte Arbeitshypothese in primären AML-Blasten zu überprüfen, die STAT-Aktivierung in primären Blasten von 60 Patienten mit der Häufigkeit von Flt3-ITD Mutationen in Bezug zueinander gesetzt. Diese Betrachtungsweise zeigt, daß eine starke STAT3-Aktivierung vorliegt (50-60%), unabhängig von der Flt3-Expression und davon, ob eine Flt3-ITD-Mutation vorhanden ist oder nicht (4.4, Abb. 29 b). Bei der Betrachtung von STAT5 war dagegen ein Zusammenhang zwischen Flt3-Expression, Flt3-ITD-Mutation und STAT5-Aktivierung zu sehen (siehe 4.4, Abb. 29 a). So war bei geringer Flt3-Expression nur bei 10% der Blasten eine STAT5-Aktivierung nachweisbar. War dagegen eine starke Flt3-Expression und eine Flt3-ITD Mutation vorhanden, so konnte eine STAT5-Aktivierung bei 50% der Patienten detektiert werden. Diesen Ergebnisse zeigen, daß eine starke Korrelation zwischen dem Auftreten einer Flt3-ITD Mutation und der STAT5-Aktivierung besteht.

Die hier gefundene STAT3/5-Aktivierung in AML-Blasten von 75,5% bzw. 62,8% ist etwa dreimal so häufig wie die von anderen Gruppen dazu veröffentlichten Daten (Weber-Nordt, 1996; Lin, 2000; Xia, 1998). Dies kann aber auf die unterschiedliche Zahl an Patientenproben, die verschiedenen vorhandenen AML-Subgruppen und andere Auswertungsmethoden zurückgeführt werden. Hayakawa et al. (Hayakawa, 1998) dagegen konnten in einem größeren Patientenpool (50 Patienten) Daten zur STAT3/5-Aktivierung (74% bzw. 80%) erheben, die unseren Daten entsprechen. Im Gegensatz dazu zeigten Birkenkamp et al. (Birkenkamp, 2001) ebenfalls eine Korrelation zwischen STAT5-Aktivierung und Flt3-Mutationen. Die von dieser Gruppe genannten Zahlen zur Korrelation mit einer Flt3-ITD Mutation liegen im gleichen Bereich wie die von uns ermittelte Daten, wodurch unsere Daten bestätigt wurden. Somit läßt sich die Hypothese aufstellen, daß die Flt3-ITD-Mutation an der STAT5-Aktivierung beteiligt ist.

Es gibt noch andere Mechanismen, die zu einer konstitutiven STAT-Aktivierung führen können. So wurde in unserer Arbeitsgruppe vor kurzem in AML-Patienten eine weitere Flt3-Mutation charakterisiert. Diese Mutation besteht in der Insertion von zwei zusätzlichen Aminosäuren zwischen AA 840 und AA 841 von Flt3 (Flt3 840 GS). Sie tritt ebenso wie die beiden anderen Flt3-Mutationen unabhängig von diesen auf. Eine STAT-Aktivierung durch diese Mutante wird zur Zeit noch untersucht.

Auf der anderen Seite führen auch andere Rezeptortyrosinkinasen (RTK) wie C-KIT D816V, zu einer STAT-Aktivierung. Eine Korrelation von C-KIT Mutationen mit STAT-Aktivierung

in primären AML-Blasten ist allerdings noch nicht gefunden worden. Es konnte aber eine Aktivierung von STAT3 durch C-KIT D816V *in vitro* gezeigt werden (Ning, 2001). Daraus kann man schließen, daß auch hier ein Zusammenhang mit der STAT-Aktivierung in der AML besteht. Aber auch in der AML seltene onkogene PTKs wie TEL-JAK2 und TEL-ABL spielen bei der STAT-Aktivierung eine Rolle. So haben Schwaller et al. (Schwaller, 2000), in einem *in vivo* Mausmodell nachgewiesen, daß STAT5 durch TEL-JAK2 aktiviert wird. Für TEL-ABL wurde in unserer Arbeitsgruppe in stabilen Ba/F3-TEL-ABL-Zellen eine starke STAT3/5-Aktivierung gezeigt (Spiekermann, 2002).

Eine weitere Möglichkeit für eine STAT-Aktivierung, die nicht von einer Mutation abhängig ist, ist die autokrine Produktion von Wachstumsfaktoren, wie z. B. IL-6. Es konnte gezeigt werden, daß AML-Blasten, bei denen STAT3 konstitutiv aktiviert ist, eine auto-/parakrine IL-6 Produktion aufwiesen. Wurden diese Zellen mit neutralisierenden  $\alpha$ -IL-6 Antikörpern inkubiert und nach Waschen mit IL-6 stimuliert, so konnte die STAT3-Phosphorylierung wieder durch IL-6 induziert werden (Schuringa, 2000). Diese Ergebnisse zeigen, daß IL-6 den JAK/STAT-Signalweg, und somit die STAT-Aktivierung in AML-Blasten, über einen autokrinen Loop stimuliert.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß onkogene PTKs eine konstitutive STAT-Aktivierung bewirken, welche wiederum an der Pathogenese von Leukämien und soliden Tumoren beteiligt ist. Die konstitutive Aktivierung des PTK-STAT-Signalwegs stellt wahrscheinlich durch das direkt transformierende Potential einen entscheidenden Mechanismus in der molekularen Pathogenese der AML dar.

## **5.5 Therapeutische Optionen durch das „targeting“ des STAT3/5-Signalweges**

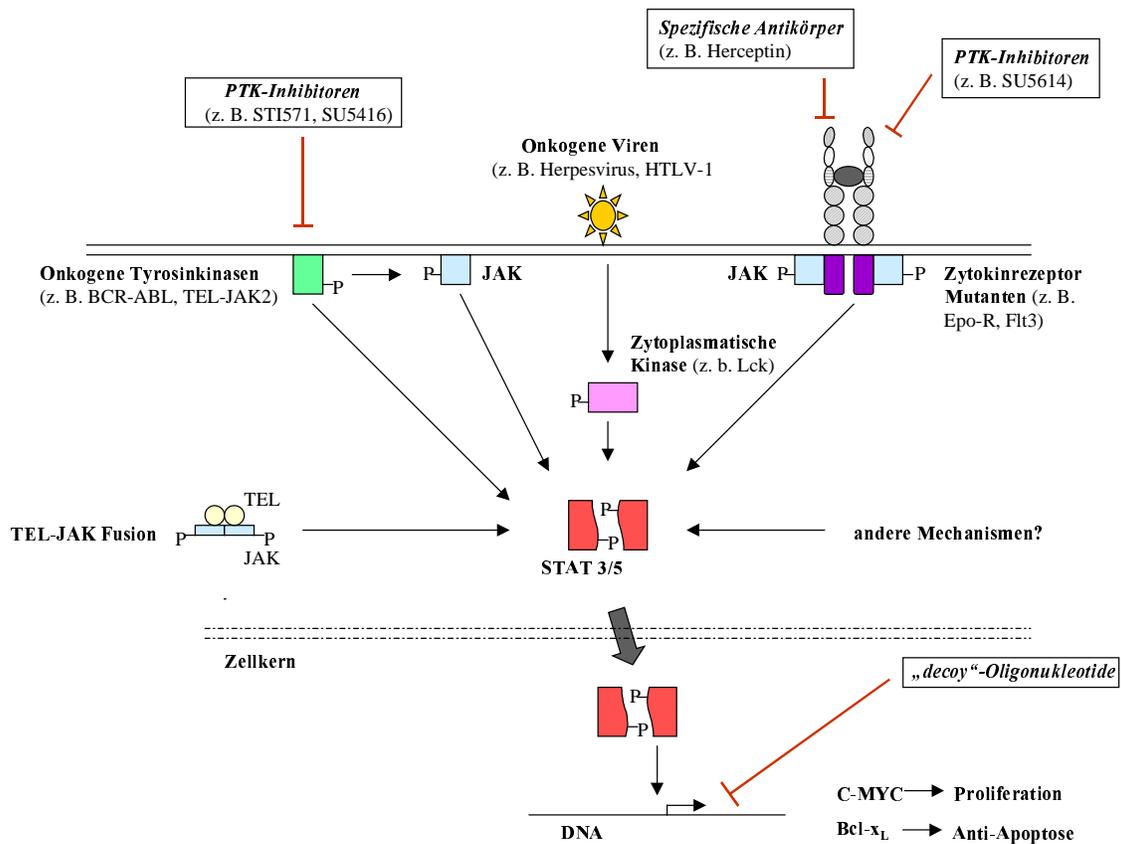
Der PTK-STAT-Signalweg vermittelt ein entscheidendes mitogenes Signal in verschiedenen hämatologischen Tumoren und stellt somit ein vielversprechendes Ziel für spezifische therapeutische Interventionen dar.

In den letzten Jahren wurden Inhibitoren für verschiedene PTKs entwickelt. Die meisten dieser Substanzen sind kleinmolekulare Inhibitoren, die an verschiedene, für das Enzym wichtige Regionen binden.

Die erfolgreichsten Inhibitoren sind zur Zeit diejenigen, die an die ATP-Bindestelle im katalytischen Zentrum der PTKs binden (Al-Obeidi, 2000). Hierzu gehört der Kinase-Inhibitor STI571. Dieser bindet in der katalytischen Domäne von c-ABL, C-KIT und PDGF-Rezeptor, die alle eine STAT-Aktivierung bewirken. STI571 ist erfolgreich in klinischen Studien zur Behandlung von BCR-ABL-positiven akuten lymphatischen und chronisch myeloischen Leukämien (ALL; CML) eingesetzt worden (Druker, 2000). Dies deutet auf einen baldigen Einsatz von STI571 als Standardtherapie bei der Behandlung solcher Leukämien hin. Aber auch andere PTK-Inhibitoren wie z. B. SU5416, die Split-Kinase PTKs der Klasse III und IV wie den VEGF-Rezeptor, und somit die Angiogenese hemmen, sind zur Zeit in klinischen Studien der Phasen II und III (O'Donnell, 1999).

Ein anderer Weg die Signalweiterleitung durch PTKs zu unterbrechen sind Antikörper gegen die Rezeptoren, die von Krebszellen exprimiert werden. Bei verschiedenen Krebsarten sind solche Antikörper schon im Einsatz (Al-Obeidi, 2000). So wird Herceptin, ein rekombinanter, monoklonaler Antikörper mit einer hohen Affinität zu p185HER2 in der Behandlung von Brustkrebspatienten mit HER2-positiven Tumoren eingesetzt. Inzwischen finden auch klinischen Studien bei andere Tumoren, die HER2 überexprimieren statt.

Eine weitere Möglichkeit ist das Einbringen von „decoy“-Oligonukleotiden - kurzer doppelsträngiger DNA-Stränge, die STAT-Bindeelemente enthalten – in die Zelle. Diese Moleküle können, wenn sie im Überschuß vorhanden sind, die aktivierten STATs binden bevor sie an die Promoterelemente von Zielgenen binden. Dadurch könnten STAT-vermittelte Genaktivierungen verhindert werden und ein therapeutischer Effekt erzielt werden (Lin, 2000; Turkson, 2000). Diese Methode wurde erfolgreich von Huang et al. (Huang, 1999) und Wang et al. (Wang, 2000) *in vitro* getestet.



**Abb. 30: Mechanismen der STAT-Aktivierung und therapeutische Ansätze in der Leukämie durch das „targeting“ des STAT-Signalwegs.**

Onkogene PTK/RTK aktivieren, ebenso wie onkogene Viren, Fusionsproteine oder andere Mechanismen, STAT3 und STAT5. Diese induzieren eine Transkription von anti-apoptotischen und proliferationsfördernden Genen wie Bcl-x<sub>L</sub> und C-MYC. Diese Aktivierung kann durch PTK/RTK-Inhibitoren, spezifische Antikörper oder „decoy“-Oligonukleotide gehemmt werden (verändert nach Ward et al., 2000).

Stellt man das in dieser Arbeit gezeigte Ergebnis, daß onkogene PTKs eine Aktivierung von STAT3/5 bewirken im Zusammenhang mit den oben genannten therapeutischen Optionen dar, so erhält man das in Abb. 30 gezeigte Schema. Dieses zeigt neben der STAT-Aktivierung durch onkogene PTKs die beiden vielversprechendsten therapeutischen Ansätze, die sich aus den bisherigen Untersuchungen zur Rolle von STAT-Proteinen in der Leukämie ergeben haben. Hierzu gehören die PTK-Inhibitoren, wie der Flt3-Inhibitor SU5614, der selektiv in Flt3-ITD positiven AML-Blasten eine Proliferationsinhibition und Apoptose induziert (Spiekermann, unveröffentlicht). Aber auch die „decoy“-Oligonukleotide stellen eine gute Grundlage für neue Therapieansätze dar.

## 6 Zusammenfassung

Die Grundlage zu der vorliegenden Arbeit lieferten Ergebnisse früherer Untersuchungen zum JAK/STAT-Signalweg an Patientenzellen und Zelllinien. Da die normale Proliferation und Differenzierung von myeloischen Zellen durch Zytokine (z. B. G-CSF, GM-CSF) reguliert werden, wurde vermutet, daß eine gestörte Signalweiterleitung von Zytokinrezeptoren über die Januskinasen und die STAT-Proteine an der Pathogenese der AML beteiligt sein könnte. Außerdem ist bekannt, daß STAT-Proteine in vielen malignen Tumoren, einschließlich der AML, und in transformierten Zelllinien konstitutiv aktiviert sind. Daraus ergab sich einerseits die Frage nach der Bedeutung von STAT3 und STAT5 in der malignen Transformation hämatopoetischer Zellen. Andererseits sollte geklärt werden, welche Mechanismen für die konstitutive STAT-Aktivierung in der AML verantwortlich sind.

Um diese Fragen beantworten zu können, wurden zwei verschiedene Konzepte verfolgt. Auf der einen Seite wurde ein induzierbares Tet-off-System in der AML-Zelllinie U937 etabliert, in dem eine dominant-negative Mutante von STAT3 (STAT3D) verwendet wurde. Es stellte sich aber nach der Etablierung heraus, daß das System eine erhebliche „Leakiness“ aufwies. Denn auch im „off“-Zustand war eine starke Expression des Zielgens vorhanden, so daß, durch den wachstumshemmenden Effekt von STAT3D, keine weiteren Experimente möglich waren. Dieser proliferationsinhibierende Effekt konnte in, von unserer Arbeitsgruppe als Modellsystem verwendeten, transformierten Ba/F3-BCR-ABL-Zellen bestätigt werden.

Auf der anderen Seite wurden zur Klärung der Rolle von STAT3 und STAT5 stabile Ba/F3-Zelllinien mit den konstitutiv aktiven Mutanten von STAT3 (STAT3C) und STAT5 (STAT5A1\*6) generiert. Mit diesem System konnte gezeigt werden, daß konstitutiv aktives STAT3 und STAT5 in hämatopoetischen Zellen transformierendes Potential besitzen und zu faktorunabhängigem Wachstum der Zellen führen. Um das Entstehen der Transformation und der Faktorunabhängigkeit auch in durch andere Fusionsproteine (TEL-ABL, TEL-JAK2) und onkogene RTKs (Flt3-ITD, C-KIT D816V) transformierten Zellen näher zu untersuchen, wurde die Regulation bekannter Zielgene (Bcl-x<sub>L</sub>, C-MYC) von STAT3 und STAT5 betrachtet. Eine Induktion von Bcl-x<sub>L</sub> (anti-apoptotisch) und C-MYC (proproliferativ) war vor allem in Ba/F3-Zellen mit konstitutiv aktivem STAT3 (STAT3C) zu finden, was die Transformation und die Faktorunabhängigkeit erklärt.

Da bekannt ist, daß STAT-Proteine in primären AMLs und in AML-Zelllinien aktiviert sind wurden, um den Mechanismus der STAT-Aktivierung zu untersuchen, Zellen, die ras-Mutationen bzw. das Fusionsprotein PML-RAR $\alpha$  enthielten, auf STAT-Aktivierung und –Expression untersucht. Hier zeigte sich, daß weder PML-RAR $\alpha$  noch aktiviertes ras Einfluß auf den Proteingehalt oder die Aktivierung von STAT1, 3, 5 haben. Daraus ist zu schließen, daß keine direkte Interaktion des Ras- und des JAK/STAT-Signalweges vorhanden ist. Es muß also ein anderer Mechanismus zu Grunde liegen. Deshalb wurden Zelllinien, die durch onkogene Proteintyrosin (PTK)- bzw. Rezeptortyrosinkinasen (RTK) transformiert waren, auf STAT-Aktivierung untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß onkogene PTKs und RTKs zu einer Aktivierung von STAT3 und STAT5 führen.

Um die *in vitro* generierten Arbeitshypothesen in primären AML-Blasten zu überprüfen, wurden AML-Blasten von 60 Patienten auf STAT-Aktivierung untersucht. Die Ergebnisse wurden im Zusammenhang mit dem Auftreten der häufig vorkommenden PTK-Mutation Flt3-ITD betrachtet. Denn es konnte *in vitro* gezeigt werden, daß diese Mutation transformierendes und STAT3- und STAT5-aktivierendes Potential besitzt. In den AML-Blasten konnte eine STAT3/5-Aktivierung von 75,5% bzw. 62,8% detektiert werden. Nach der Auswertung der STAT-Aktivierung im Zusammenhang mit dem Flt3-Status und der Flt3-Expression zeigte sich eine Abhängigkeit der STAT5-Aktivierung von der Flt3-Expression und dem Vorhandensein der Flt3-ITD-Mutation. Dagegen trat eine STAT3-Aktivierung unabhängig von diesen Parametern auf. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Flt3-ITD-Mutation an der STAT5-Aktivierung in der primären AML beteiligt ist.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß onkogene PTKs eine konstitutive STAT-Aktivierung bewirken, welche wiederum an der Pathogenese von Leukämien und soliden Tumoren beteiligt ist. Außerdem stellt die konstitutive Aktivierung des PTK-STAT-Signalwegs wahrscheinlich durch das direkt transformierende Potential einen entscheidenden Mechanismus in der molekularen Pathogenese der AML dar. Dieser Signalweg bietet somit ein vielversprechendes Ziel für spezifische therapeutische Interventionen, z. B. durch PTK-Inhibitoren und spezifische Antikörper.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abu-Duhier, F. M., Goodeve, A. C., Wilson, G. A., Care, R. S., Peake, I. R., & Reilly, J. T. 2001. Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, 113(4): 983-988.
- Akira, S. 2000. Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting. *Oncogene*, 19(21): 2607-2611.
- Al-Obeidi, F. A., & Lam, K. S. 2000. Development of inhibitors for protein tyrosine kinases. *Oncogene*, 19(49): 5690-5701.
- Andreasson, P., Johansson, B., Carlsson, M., Jarlsfelt, I., Fioretos, T., Mitelman, F., & Hoglund, M. 1997. BCR/ABL-negative chronic myeloid leukemia with ETV6/ABL fusion. *Genes Chromosomes Cancer*, 20(3): 299-304.
- Ashman, L. K., Ferrao, P., Cole, S. R., & Cambareri, A. C. 2000. Effects of mutant c-kit in early myeloid cells. *Leuk Lymphoma*, 37(1-2): 233-243.
- Azam, M., Erdjument-Bromage, H., Kreider, B. L., Xia, M., Quelle, F., Basu, R., Saris, C., Tempst, P., Ihle, J. N., & Schindler, C. 1995. Interleukin-3 signals through multiple isoforms of Stat5. *Embo J*, 14(7): 1402-1411.
- Becker, S., Groner, B., & Muller, C. W. 1998. Three-dimensional structure of the Stat3beta homodimer bound to DNA. *Nature*, 394(6689): 145-151.
- Beghini, A., Peterlongo, P., Ripamonti, C. B., Larizza, L., Cairoli, R., Morra, E., & Mecucci, C. 2000. C-kit mutations in core binding factor leukemias. *Blood*, 95(2): 726-727.
- Behre, G., Smith, L. T., & Tenen, D. G. 1999. Use of a promoterless Renilla luciferase vector as an internal control plasmid for transient co-transfection assays of Ras-mediated transcription activation. *Biotechniques*, 26(1): 24-26, 28.

- Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. A., Gralnick, H. R., & Sultan, C. 1976. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*, 33(4): 451-458.
- Biethahn, S., Alves, F., Wilde, S., Hiddemann, W., & Spiekermann, K. 1999. Expression of granulocyte colony-stimulating factor- and granulocyte- macrophage colony-stimulating factor-associated signal transduction proteins of the JAK/STAT pathway in normal granulopoiesis and in blast cells of acute myelogenous leukemia. *Exp Hematol*, 27(5): 885-894.
- Birkenkamp, K. U., Geugien, M., Lemmink, H. H., Kruijer, W., & Vellenga, E. 2001. Regulation of constitutive STAT5 phosphorylation in acute myeloid leukemia blasts. *Leukemia*, 15(12): 1923-1931.
- Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J., & Jove, R. 2000. STATs in oncogenesis. *Oncogene*, 19(21): 2474-2488.
- Bromberg, J. 2001. Activation of STAT proteins and growth control. *Bioessays*, 23(2): 161-169.
- Bromberg, J., & Darnell, J. E., Jr. 2000. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene*, 19(21): 2468-2473.
- Bromberg, J. F., Wrzeszczynska, M. H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R. G., Albanese, C., & Darnell, J. E., Jr. 1999. Stat3 as an oncogene. *Cell*, 98(3): 295-303.
- Cacalano, N. A., Sanden, D., & Johnston, J. A. 2001. Tyrosine-phosphorylated SOCS-3 inhibits STAT activation but binds to p120 RasGAP and activates Ras. *Nat Cell Biol*, 3(5): 460 - 465.
- Caldenhoven, E., van Dijk, T. B., Solari, R., Armstrong, J., Raaijmakers, J. A. M., Lammers, J. W. J., Koendermann, L., & de Groot, R. P. 1996. STAT3 $\beta$ , a splice variant of

- transcription factor STAT3, is a dominant negative regulator of transcription. *J Biol Chem*, 271: 13221-13227.
- Catlett-Falcone, R., Dalton, W. S., & Jove, R. 1999a. STAT proteins as novel targets for cancer therapy. Signal transducer and activator of transcription. *Curr Opin Oncol*, 11(6): 490-496.
- Catlett-Falcone, R., Landowski, T. H., Oshiro, M. M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernandez-Luna, J. L., Nunez, G., Dalton, W. S., & Jove, R. 1999b. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity*, 10(1): 105-115.
- Chai, S. K., Nichols, G. L., & Rothman, P. 1997. Constitutive activation of JAKs and STATs in BCR-Abl-expressing cell lines and peripheral blood cells derived from leukemic patients. *J Immunol*, 159(10): 4720-4728.
- Chen, X., Vinkemeier, U., Zhao, Y., Jeruzalmi, D., Darnell, J. E., Jr., & Kuriyan, J. 1998. Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell*, 93(5): 827-839.
- Coffer, P. J., Koenderman, L., & de Groot, R. P. 2000. The role of STATs in myeloid differentiation and leukemia. *Oncogene*, 19(21): 2511-2522.
- Cool, R. H., Schmidt, G., Lenzen, C. U., Prinz, H., Vogt, D., & Wittinghofer, A. 1999. The Ras mutant D119N is both dominant negative and activated. *Mol Cell Biol*, 19(9): 6297-6305.
- Daley, G. Q., Van Etten, R. A., & Baltimore, D. 1990. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science*, 247(4944): 824-830.

- Dang, C. V., Resar, L. M., Emison, E., Kim, S., Li, Q., Prescott, J. E., Wonsey, D., & Zeller, K. 1999. Function of the c-Myc oncogenic transcription factor. *Exp Cell Res*, 253(1): 63-77.
- Darnell, J. E., Jr., Kerr, I. M., & Stark, G. R. 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, 264(5164): 1415-1421.
- Darnell, J. E. J. 1997. STATs and gene regulation. *Science*, 277: 1630-1635.
- de Groot, R. P., Raaijmakers, J. A., Lammers, J. W., Jove, R., & Koenderman, L. 1999. STAT5 activation by BCR-Abl contributes to transformation of K562 leukemia cells. *Blood*, 94(3): 1108-1112.
- de Groot, R. P., Raaijmakers, J. A., Lammers, J. W., & Koenderman, L. 2000. STAT5-Dependent CyclinD1 and Bcl-xL expression in Bcr-Abl-transformed cells. *Mol Cell Biol Res Commun*, 3(5): 299-305.
- de Wet, J. R., Wood, K. V., DeLuca, M., Helinski, D. R., & Subramani, S. 1987. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, 7(2): 725-737.
- Decallonne, B., Overbergh, L., Casteels, K. M., Gysemans, C., Bouillon, R., & Mathieu, C. 2000. Streptococcal wall component OK432 restores sensitivity of non-obese diabetic (NOD) thymocytes to apoptotic signals. *Diabetologia*, 43(10): 1302-1308.
- Decker, T., & Kovarik, P. 2000. Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene*, 19(21): 2628-2637.
- Druker, B. J., & Lydon, N. B. 2000. Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest*, 105(1): 3-7.

- Dyson, N. 1998. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev*, 12(15): 2245-2262.
- Emig, M., Saussele, S., Wittor, H., Weisser, A., Reiter, A., Willer, A., Berger, U., Hehlmann, R., Cross, N. C., & Hochhaus, A. 1999. Accurate and rapid analysis of residual disease in patients with CML using specific fluorescent hybridization probes for real time quantitative RT-PCR. *Leukemia*, 13(11): 1825-1832.
- Feig, L. A., & Cooper, G. M. 1988. Inhibition of NIH 3T3 cell proliferation by a mutant ras protein with preferential affinity for GDP. *Mol Cell Biol*, 8(8): 3235-3243.
- Fenski, R., Flesch, K., Serve, S., Mizuki, M., Oelmann, E., Kratz-Albers, K., Kienast, J., Leo, R., Schwartz, S., Berdel, W. E., & Serve, H. 2000. Constitutive activation of FLT3 in acute myeloid leukaemia and its consequences for growth of 32D cells. *Br J Haematol*, 108(2): 322-330.
- Franzrahe S., S. T., Balling R., Hiddemann W., Spiekermann K. 2000. Establishment of inducible expression systems to study the role of STAT transcription factors in AML. *Blood*, 96 (11/2): 132b.
- Franzrahe S., S. T., Just U., Balling R., Hiddemann W., Spiekermann K. 2001. Establishment of inducible expression systems to study the role of STAT transcription factors in AML. *Acute Leukemias IX*.
- Fujio, Y., Kunisada, K., Hirota, H., Yamauchi-Takahara, K., & Kishimoto, T. 1997. Signals through gp130 upregulate bcl-x gene expression via STAT1-binding cis-element in cardiac myocytes. *J Clin Invest*, 99(12): 2898-2905.
- Gari, M., Goodeve, A., Wilson, G., Winship, P., Langabeer, S., Linch, D., Vandenberghe, E., Peake, I., & Reilly, J. 1999. c-kit proto-oncogene exon 8 in-frame deletion plus insertion mutations in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, 105(4): 894-900.

- Golub, T. R., Barker, G. F., Bohlander, S. K., Hiebert, S. W., Ward, D. C., Bray-Ward, P., Morgan, E., Raimondi, S. C., Rowley, J. D., & Gilliland, D. G. 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(11): 4917-4921.
- Gossen, M., & Bujard, H. 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(12): 5547-5551.
- Gotoh, A., Takahira, H., Mantel, C., Litz-Jackson, S., Boswell, H. S., & Broxmeyer, H. E. 1996. Steel factor induces serine phosphorylation of Stat3 in human growth factor-dependent myeloid cell lines. *Blood*, 88(1): 138-145.
- Gotze, K. S., Ramirez, M., Tabor, K., Small, D., Matthews, W., & Civin, C. I. 1998. Flt3high and Flt3low CD34+ progenitor cells isolated from human bone marrow are functionally distinct. *Blood*, 91(6): 1947-1958.
- Griffin, J. D. 2001. Point mutations in the FLT3 gene in AML. *Blood*, 97(8): 2193A-2193.
- Grimwade, D., Biondi, A., Mozziconacci, M. J., Hagemeijer, A., Berger, R., Neat, M., Howe, K., Dastugue, N., Jansen, J., Radford-Weiss, I., Lo Coco, F., Lessard, M., Hernandez, J. M., Delabesse, E., Head, D., Liso, V., Sainty, D., Flandrin, G., Solomon, E., Birg, F., & Lafage-Pochitaloff, M. 2000. Characterization of acute promyelocytic leukemia cases lacking the classic t(15;17): results of the European Working Party. Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique, Groupe de Francais d'Hematologie Cellulaire, UK Cancer Cytogenetics Group and BIOMED 1 European Community-Concerted Action "Molecular Cytogenetic Diagnosis in Haematological Malignancies". *Blood*, 96(4): 1297-1308.
- Grisolano, J. L., Wesselschmid, R. L., Pelicci, P. G., & Ley, T. J. 1997. Altered myeloid development and acute leukemia in transgenic mice expressing PML-RAR alpha under control of the cathepsin G regulatory sequences. *Blood*, 89: 376-387.

- Hannemann, J. R., McManus, D. M., Kabarowski, J. H., & Wiedemann, L. M. 1998. Haemopoietic transformation by the TEL/ABL oncogene. *Br J Haematol*, 102(2): 475-485.
- Hayakawa, F., Towatari, M., Iida, H., Wakao, H., Kiyoi, H., Naoe, T., & Saito, H. 1998. Differential constitutive activation between STAT-related proteins and MAP kinase in primary acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol*, 101(3): 521-528.
- Hayakawa, F., Towatari, M., Kiyoi, H., Tanimoto, M., Kitamura, T., Saito, H., & Naoe, T. 2000. Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogene*, 19(5): 624-631.
- He, L. Z., Guidez, F., Tribioli, C., Peruzzi, D., Ruthardt, M., Zelent, A., & Pandolfi, P. P. 1998. Distinct interactions of PML-RARalpha and PLZF-RARalpha with co-repressors determine differential responses to RA in APL. *Nat Genet*, 18(2): 126-135.
- Hirano, T., Ishihara, K., & Hibi, M. 2000. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene*, 19(21): 2548-2556.
- Holland JF, F. E., Bast RC, Kufe DW, Morton DL, Weichselbaum RR. 1997. *Cancer Medicine, 4th edn* (4 ed.). Baltimore: Williams and Wilkins.
- Horvath, C. M., Wen, Z., & Darnell, J. E., Jr. 1995. A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain. *Genes Dev*, 9(8): 984-994.
- Huang, J. S., Guh, J. Y., Hung, W. C., Yang, M. L., Lai, Y. H., Chen, H. C., & Chuang, L. Y. 1999. Role of the Janus kinase (JAK)/signal transducers and activators of transcription (STAT) cascade in advanced glycation end-product-induced cellular mitogenesis in NRK-49F cells. *Biochem J*, 342(Pt 1): 231-238.
- Ihle, J. N. 2001. The Stat family in cytokine signaling. *Curr Opin Cell Biol*, 13(2): 211-217.

- Ihle, J. N., Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Yamamoto, K., & Silvennoinen, O. 1995. Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annu Rev Immunol*, 13: 369-398.
- Jacobs-Helber, S. M., Penta, K., Sun, Z., Lawson, A., & Sawyer, S. T. 1997. Distinct signaling from stem cell factor and erythropoietin in HCD57 cells. *J Biol Chem*, 272(11): 6850-6853.
- Janssen, J. W., Ridge, S. A., Papadopoulos, P., Cotter, F., Ludwig, W. D., Fonatsch, C., Rieder, H., Ostertag, W., Bartram, C. R., & Wiedemann, L. M. 1995. The fusion of TEL and ABL in human acute lymphoblastic leukaemia is a rare event. *Br J Haematol*, 90(1): 222-224.
- Kelly, L., Clark, J., & Gilliland, D. G. 2002. Comprehensive genotypic analysis of leukemia: clinical and therapeutic implications. *Curr Opin Oncol*, 14(1): 10-18.
- Kiuchi, N., Nakajima, K., Ichiba, M., Fukada, T., Narimatsu, M., Mizuno, K., Hibi, M., & Hirano, T. 1999. STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene. *J Exp Med*, 189(1): 63-73.
- Kiyoi, H., Towatari, M., Yokota, S., Hamaguchi, M., Ohno, R., Saito, H., & Naoe, T. 1998. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia*, 12(9): 1333-1337.
- Kotenko, S. V., & Pestka, S. 2000. Jak-Stat signal transduction pathway through the eyes of cytokine class II receptor complexes. *Oncogene*, 19(21): 2557-2565.
- Lacronique, V., Boureux, A., Monni, R., Dumon, S., Mauchauffe, M., Mayeux, P., Gouilleux, F., Berger, R., Gisselbrecht, S., Ghysdael, J., & Bernard, O. A. 2000. Transforming properties of chimeric TEL-JAK proteins in Ba/F3 cells. *Blood*, 95(6): 2076-2083.

- Lin, T. S., Mahajan, S., & Frank, D. A. 2000. STAT signaling in the pathogenesis and treatment of leukemias. *Oncogene*, 19(21): 2496-2504.
- Liu, K. D., Gaffen, S. L., & Goldsmith, M. A. 1998. JAK/STAT signaling by cytokine receptors. *Curr Opin Immunol*, 10(3): 271-278.
- Luo, H., Rose, P., Barber, D., Hanratty, W. P., Lee, S., Roberts, T. M., D'Andrea, A. D., & Dearolf, C. R. 1997. Mutation in the Jak kinase JH2 domain hyperactivates drosophila and mammalian Jak-STAT pathways. *Mol Cell Biol*, 17: 1562-1571.
- Luscher, B. 2001. Function and regulation of the transcription factors of the Myc/Max/Mad network. *Gene*, 277(1-2): 1-14.
- Lyman, S. D., James, L., Johnson, L., Brasel, K., de Vries, P., Escobar, S. S., Downey, H., Splett, R. R., Beckmann, M. P., & McKenna, H. J. 1994. Cloning of the human homologue of the murine flt3 ligand: a growth factor for early hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 83(10): 2795-2801.
- Mackarehtschian, K., Hardin, J. D., Moore, K. A., Boast, S., Goff, S. P., & Lemischka, I. R. 1995. Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity*, 3(1): 147-161.
- MacKenzie, K. L., Dolnikov, A., Millington, M., Shounan, Y., & Symonds, G. 1999. Mutant N-ras induces myeloproliferative disorders and apoptosis in bone marrow repopulated mice. *Blood*, 93(6): 2043-2056.
- Matsumura, I., Kitamura, T., Wakao, H., Tanaka, H., Hashimoto, K., Albanese, C., Downward, J., Pestell, R. G., & Kanakura, Y. 1999. Transcriptional regulation of the cyclin D1 promoter by STAT5: its involvement in cytokine-dependent growth of hematopoietic cells. *Embo J*, 18(5): 1367-1377.
- Mizuguchi, R., Noto, S., Yamada, M., Ashizawa, S., Higashi, H., & Hatakeyama, M. 2000. Ras and signal transducer and activator of transcription (STAT) are essential and

- sufficient downstream components of Janus kinases in cell proliferation. *Jpn J Cancer Res*, 91(5): 527-533.
- Mizuki, M., Fenski, R., Halfter, H., Matsumura, I., Schmidt, R., Muller, C., Gruning, W., Kratz-Albers, K., Serve, S., Steur, C., Buchner, T., Kienast, J., Kanakura, Y., Berdel, W. E., & Serve, H. 2000. Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood*, 96(12): 3907-3914.
- Nagata, H., Worobec, A. S., Oh, C. K., Chowdhury, B. A., Tannenbaum, S., Suzuki, Y., & Metcalfe, D. D. 1995. Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(23): 10560-10564.
- Nakajima, K., Yamanaka, Y., Nakae, K., Kojima, H., Ichiba, M., Kiuchi, N., Kitaoka, T., Fukada, T., Hibi, M., & Hirano, T. 1996. A central role for Stat3 in IL-6-induced regulation of growth and differentiation in M1 leukemia cells. *Embo J*, 15(14): 3651-3658.
- Nevins, J. R. 1998. Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families. *Cell Growth Differ*, 9(8): 585-593.
- Nguyen, M. H., Ho, J. M., Beattie, B. K., & Barber, D. L. 2001. TEL-JAK2 mediates constitutive activation of the phosphatidylinositol 3'-kinase/protein kinase B signaling pathway. *J Biol Chem*, 276(35): 32704-32713.
- Ning, Z. Q., Li, J., & Arceci, R. J. 2001. Signal transducer and activator of transcription 3 activation is required for Asp(816) mutant c-Kit-mediated cytokine-independent survival and proliferation in human leukemia cells. *Blood*, 97(11): 3559-3567.

- Niu, G., Heller, R., Catlett-Falcone, R., Coppola, D., Jaroszeski, M., Dalton, W., Jove, R., & Yu, H. 1999. Gene therapy with dominant-negative Stat3 suppresses growth of the murine melanoma B16 tumor in vivo. *Cancer Res*, 59(20): 5059-5063.
- Niu, G., Shain, K. H., Huang, M., Ravi, R., Bedi, A., Dalton, W. S., Jove, R., & Yu, H. 2001. Overexpression of a dominant-negative signal transducer and activator of transcription 3 variant in tumor cells leads to production of soluble factors that induce apoptosis and cell cycle arrest. *Cancer Res*, 61(8): 3276-3280.
- Nosaka, T., Kawashima, T., Misawa, K., Ikuta, K., Mui, A. L., & Kitamura, T. 1999. STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells. *Embo J*, 18(17): 4754-4765.
- O'Donnell A., T. J., Walker R., Etterley L., Wolf L., Raymaud F., Padhani A., Hannah A. L., Langecker P., Judson I. 1999. *Eur. J. Cancer*, 35: 282-283.
- O'Farrell, A. M., Ichihara, M., Mui, A. L., & Miyajima, A. 1996. Signaling pathways activated in a unique mast cell line where interleukin-3 supports survival and stem cell factor is required for a proliferative response. *Blood*, 87(9): 3655-3668.
- Onishi, M., Nosaka, T., Misawa, K., Mui, A. L. F., Gorman, D., McMahon, M., Miyajima, A., & Kitamura, T. 1998. Identification and characterization of a constitutively active STAT5 mutant that promotes cell survival. *Mol Cell Biol*, 18: 3871-3879.
- Parganas, E., Wang, D., Stravopodis, D., Topham, D. J., Marine, J. C., Teglund, S., Vanin, E. F., Bodner, S., Colamonici, O. R., van Deursen, J. M., Grosveld, G., & Ihle, J. N. 1998. Jak2 is essential for signalling through a variety of cytokine receptors. *Cell*, 93: 385-395.
- Pellegrini, S., & Dusanter-Fourt, I. 1997. The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs). *Eur J Biochem*, 248(3): 615-633.

- Piazza, F., Gurrieri, C., & Pandolfi, P. P. 2001. The theory of APL. *Oncogene*, 20(49): 7216-7222.
- Prendergast, G. C. 1999. Targeting farnesyltransferase: Is ras relevant?, *ASCO Educational book Spring*: 22-28.
- Qiu, F. H., Ray, P., Brown, K., Barker, P. E., Jhanwar, S., Ruddle, F. H., & Besmer, P. 1988. Primary structure of c-kit: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family--oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C terminus. *Embo J*, 7(4): 1003-1011.
- Rane, S. G., & Reddy, E. P. 2000. Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene*, 19(49): 5662-5679.
- Reddy, E. P., Korapati, A., Chaturvedi, P., & Rane, S. 2000. IL-3 signaling and the role of Src kinases, JAKs and STATs: a covert liaison unveiled. *Oncogene*, 19(21): 2532-2547.
- Reuter, C. W., Morgan, M. A., & Bergmann, L. 2000. Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies? *Blood*, 96(5): 1655-1669.
- Rodig, S. J., Meraz, M. A., White, J. M., Lampe, P. A., Riley, J. K., Arthur, C. D., King, K. L., Sheehan, J. C. F., Yin, L., Pennica, D., Johnson, E. M. J., & Schreiber, R. D. 1998. Disruption of the JAK1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the JAKs in cytokine-induced biologic responses. *Cell*, 93: 373-383.
- Saharinen, P., Takaluoma, K., & Silvennoinen, O. 2000. Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. *Mol Cell Biol*, 20(10): 3387-3395.
- Schindler, C., & Darnell, J. E., Jr. 1995. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem*, 64: 621-651.

- Schmidt, G., Lenzen, C., Simon, I., Deuter, R., Cool, R. H., Goody, R. S., & Wittinghofer, A. 1996. Biochemical and biological consequences of changing the specificity of p21ras from guanosine to xanthosine nucleotides. *Oncogene*, 12(1): 87-96.
- Schuringa, J. J., Jonk, L. J., Dokter, W. H., Vellenga, E., & Kruijer, W. 2000. Interleukin-6-induced STAT3 transactivation and Ser727 phosphorylation involves Vav, Rac-1 and the kinase SEK-1/MKK-4 as signal transduction components. *Biochem J*, 347(Pt 1): 89-96.
- Schwaller, J., Parganas, E., Wang, D., Cain, D., Aster, J. C., Williams, I. R., Lee, C. K., Gerthner, R., Kitamura, T., Frantsve, J., Anastasiadou, E., Loh, M. L., Levy, D. E., Ihle, J. N., & Gilliland, D. G. 2000. Stat5 is essential for the myelo- and lymphoproliferative disease induced by TEL/JAK2. *Mol Cell*, 6(3): 693-704.
- Sekimoto, T., Imamoto, N., Nakajima, K., Hirano, T., & Yoneda, Y. 1997. Extracellular signal-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by nuclear pore-targeting complex formation with NPI-1, but not Rch1. *Embo J*, 16(23): 7067-7077.
- Shuai, K. 2000. Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene*, 19(21): 2638-2644.
- Silva, M., Benito, A., Sanz, C., Prosper, F., Ekhterae, D., Nunez, G., & Fernandez-Luna, J. L. 1999. Erythropoietin can induce the expression of bcl-x(L) through Stat5 in erythropoietin-dependent progenitor cell lines. *J Biol Chem*, 274(32): 22165-22169.
- Silvennoinen, O., Saharinen, P., Paukku, K., Takaluoma, K., & Kovanen, P. 1997. Cytokine receptor signal transduction through Jak tyrosine kinases and Stat transcription factors. *Apmis*, 105(7): 497-509.
- Sinibaldi, D., Wharton, W., Turkson, J., Bowman, T., Pledger, W. J., & Jove, R. 2000. Induction of p21WAF1/CIP1 and cyclin D1 expression by the Src oncoprotein in mouse fibroblasts: role of activated STAT3 signaling. *Oncogene*, 19(48): 5419-5427.

- Smithgall, T. E., Briggs, S. D., Schreiner, S., Lerner, E. C., Cheng, H., & Wilson, M. B. 2000. Control of myeloid differentiation and survival by Stats. *Oncogene*, 19(21): 2612-2618.
- Socolovsky, M., Fallon, A. E., Wang, S., Brugnara, C., & Lodish, H. F. 1999. Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a<sup>-/-</sup>5b<sup>-/-</sup> mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell*, 98(2): 181-191.
- Spiekermann, K., Schwab, R., Pau, M., Schmieja, K., Franzrahe, S., & Hiddemann, W. 2001. Constitutive activation of STAT3 and STAT5 is induced by leukemic fusion proteins and is sufficient to transform hematopoietic precursor cells. (*submitted*).
- Spiekermann K., P. M., Schwab R., Schmieja K., Franzrahe S., Hiddemann W. 2002. Constitutive activation of STAT3 and STAT5 is induced by leukemic fusion proteins with protein tyrosine kinase activity and is sufficient for transformation of hematopoietic precursor cells. *Exp. Hematology*, in press.
- Spiekermann K., S. R., Pau M., Schmieja K., Franzrahe S., Hiddemann W. 2001a. Constitutive activation of STAT5 is induced by leukemic protein tyrosine kinases and is sufficient to induce IL-3-independent growth of Ba/F3 cells. *Blood*, 98(11/1): 574a.
- Spiekermann K., S. R., Pau M., Schmieja K., Franzrahe S., Hiddemann W. 2001b. Constitutive activation of STAT5 is induced by leukemic protein tyrosine kinases and is sufficient to induce IL-3-independent growth of Ba/F3 cells. *presented at Acute Leukemias IX*.
- Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N., Kishimoto, T., & Akira, S. 1997. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(8): 3801-3804.
- Testa, U., Grignani, F., Barberi, T., Fagioli, M., Masciulli, R., Ferrucci, P. F., Seripa, D., Camagna, A., Alcalay, M., Pelicci, P. G., & et al. 1994. PML/RAR alpha<sup>+</sup> U937

- mutant and NB4 cell lines: retinoic acid restores the monocytic differentiation response to vitamin D3. *Cancer Res*, 54(16): 4508-4515.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9): 4350-4354.
- Turkson, J., & Jove, R. 2000. STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene*, 19(56): 6613-6626.
- Wang, L. H., Yang, X. Y., Kirken, R. A., Resau, J. H., & Farrar, W. L. 2000. Targeted disruption of stat6 DNA binding activity by an oligonucleotide decoy blocks IL-4-driven T(H)2 cell response. *Blood*, 95(4): 1249-1257.
- Ward, A. C., Touw, I., & Yoshimura, A. 2000. The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood*, 95(1): 19-29.
- Warmuth, M., Bergmann, M., Priess, A., Hauslmann, K., Emmerich, B., & Hallek, M. 1997. The Src family kinase Hck interacts with Bcr-Abl by a kinase-independent mechanism and phosphorylates the Grb2-binding site of Bcr. *J Biol Chem*, 272(52): 33260-33270.
- Weber-Nordt, R. M., Egen, C., Wehinger, J., Ludwig, W., Gouilleux-Gruart, V., Mertelsmann, R., & Finke, J. 1996. Constitutive activation of STAT proteins in primary lymphoid and myeloid leukemia cells and in Epstein-Barr virus (EBV)-related lymphoma cell lines. *Blood*, 88: 809-816.
- Wen, X., Lin, H. H., Shih, H. M., Kung, H. J., & Ann, D. K. 1999. Kinase activation of the non-receptor tyrosine kinase Etk/BMX alone is sufficient to transactivate STAT-mediated gene expression in salivary and lung epithelial cells. *J Biol Chem*, 274(53): 38204-38210.

- Xia, Z., Baer, M. R., Block, A. W., Baumann, H., & Wetzler, M. 1998. Expression of signal transducers and activators of transcription proteins in acute myeloid leukemia blasts. *Cancer Res*, 58(14): 3173-3180.
- Yamamoto, Y., Kiyoi, H., Nakano, Y., Suzuki, R., Kodera, Y., Miyawaki, S., Asou, N., Kuriyama, K., Yagasaki, F., Shimazaki, C., Akiyama, H., Saito, K., Nishimura, M., Motoji, T., Shinagawa, K., Takeshita, A., Saito, H., Ueda, R., Ohno, R., & Naoe, T. 2001. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*, 97(8): 2434-2439.
- Yarden, Y., Kuang, W. J., Yang-Feng, T., Coussens, L., Munemitsu, S., Dull, T. J., Chen, E., Schlessinger, J., Francke, U., & Ullrich, A. 1987. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *Embo J*, 6(11): 3341-3351.
- Yokota, S., Kiyoi, H., Nakao, M., Iwai, T., Misawa, S., Okuda, T., Sonoda, Y., Abe, T., Kahsima, K., Matsuo, Y., & Naoe, T. 1997. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines. *Leukemia*, 11(10): 1605-1609.
- Zushi, S., Shinomura, Y., Kiyohara, T., Miyaziki, Y., Kondo, S., Sugimachi, M., Higashimoto, Y., Kanayama, S., & Matsuzawa, Y. 1998. STAT3 mediates the survival signal in oncogenic ras-transfected intestinal epithelial cells. *Int J Cancer*, 78: 326-330.