

III. Medizinische Klinik und Poliklinik
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Chr. Peschel)

Identifizierung und Klonierung von HEFL, einem neuen Interaktionspartner von Bcr-Abl

Thomas Will

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. J.G. Duyster
2. Univ.-Prof. Dr. F. Fend

Die Dissertation wurde am 19. 10. 2005 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 29. 03. 2006 angenommen.

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Allgemeine Einführung	1
1.2	Signaltransduktion	3
1.2.1	Protein-Tyrosinkinasen.....	3
1.2.1.1	Onkogene Tyrosinkinasen.....	4
1.2.2	Adaptor-Proteine.....	5
1.3	Bcr-Abl und seine Rolle bei der chronisch myeloischen Leukämie	6
1.3.1	Die chronisch myeloische Leukämie.....	6
1.3.1.1	Klinischer Verlauf und diagnostische Befunde.....	7
1.3.1.2	Therapie.....	9
1.3.2	c-Abl.....	11
1.3.3	Bcr-Abl.....	14
1.4	Aufgabenstellung	18
2.	Material	20
2.1	Chemikalien und Biochemikalien	20
2.2	Enzyme	21
2.3	Radiochemikalien	22
2.4	Zelllinien	22
2.5	Bakterienstämme	22
2.6	Vektoren	23
2.7	Antikörper	23
2.8	Molekularbiologische Kits	23
2.9	Molekulargewichtsmarker für Proteine und Nukleinsäuren	24
2.10	DNA-Konstrukte	24
2.11	Standard-Geräte	24
2.12	Kulturmedien, Lösungen Puffer	26
3.	Methoden	30
3.1	Arbeiten mit Nukleinsäuren	30
3.1.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen.....	30
3.1.2	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA.....	30
3.1.3	Agarosegelelektrophorese.....	30

3.1.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	31
3.1.5	Ligation von DNA.....	31
3.1.6	Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction, PCR).....	32
3.1.6.1	PCR-Mutagenese.....	32
3.1.7	Isolierung von Plasmid-DNA aus einer Bakterienkultur.....	35
3.1.8	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	35
3.1.9	RACE (Rapid amplification of cDNA ends).....	36
3.1.10	Northern Blot.....	40
3.2	Arbeiten mit dem Bakterium Escherichia coli	40
3.2.1	Kulturmedien.....	40
3.2.2	Hitzeschock-Transformation von Bakterien.....	41
3.2.3	Induktion von rekombinantem GST-Fusionsprotein in E. coli.....	41
3.2.4	Isolierung von rekombinantem GST-Fusionprotein aus E. coli.....	42
3.3	Arbeiten mit eukaryoten Zelllinien	43
3.3.1	Kultivierung von Zelllinien.....	43
3.3.2	Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität.....	44
3.3.3	Transiente Transfektion von adhärenenten Zellen.....	44
3.4	Arbeiten mit Proteinen	45
3.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	45
3.4.2	Coomassiefärbung von Polyacrylamid-Gelen.....	46
3.4.3	Western Blot.....	46
3.4.4	Amidoschwarz-Färbung von transferierten Proteinen.....	48
3.4.5	Immunpräzipitation.....	47
3.4.6	Bindungsassay mit GST-Fusionsprotein.....	48
3.4.7	Generierung eines polyklonalen Antikörpers.....	49
3.5	Das Yeast-Two-Hybrid-System	50
3.5.1	Funktionsprinzip und Arbeitsschema.....	50
3.5.2	Verwendeter Hefestamm, cDNA-Bibliothek und Plasmide.....	51
3.5.3	Amplifikation der cDNA-Bibliothek.....	52
3.5.4	Herstellung und Transformation von kompetenten Hefen.....	52
3.5.5	Kotransformation.....	52
3.5.6	Isolierung von DNA aus Hefen.....	53
3.5.7	Transformation von DNA in E. coli.....	53
3.5.8	Rücktransformation von DNA in Hefen.....	53
4.	Ergebnisse	54
4.1	Identifikation von F6/HEFL als Interaktionspartner von Bcr-Abl mittels des Yeast-Two-Hybrid-Systems	54

4.2	Klonierung der kompletten cDNA von F6/HEFL	56
4.2.1	3'-RACE erbringt das Stop-Codon einer kleineren Spleißvariante von HEFL.....	56
4.2.2	Sequenzanalytik des 3'-Endes des ursprünglich in Hefe identifizierten Klons F6/HEFL erbringt das Stop-Codon der größeren Spleißvariante von HEFL.....	57
4.2.3	Bestimmung des Start-Codons von F6/HEFL durch 5'-RACE.....	58
4.2.4	HEFL besitzt eine interne EcoR1-Restriktionsstelle.....	59
4.3	Charakterisierung von F6/HEFL auf mRNA- und Proteinebene	61
4.3.1	Ein Northern Blot zeigt eine vornehmliche Expression von HEFL in peripheren Blut-Leukozyten und Milz.....	61
4.3.2	Aminosäuresequenz und Domänenstruktur des HEFL-Proteins.....	62
4.3.3	Ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen die SH3-Domäne von HEFL erkennt und präzipitiert ein 105 KD großes Protein.....	64
4.4	Untersuchung der Protein-Interaktion zwischen F6/HEFL und Bcr-Abl	67
4.4.1	F6/HEFL interagiert mit Bcr-Abl im humanen Zellysat (semi-in-vivo).....	67
4.4.2	In-vivo-Koimmunpräzipitationsstudie von HEFL mit Bcr-Abl im Cos1-Zellsystem.....	68
4.5	Bedeutung der HEFL-SH3-Domäne für die Interaktion von HEFL und Bcr-Abl.	70
4.5.1	Die Interaktion von HEFL und Bcr-Abl scheint über Bindung der HEFL-SH3-Domäne an ein Poly-Prolin-Motiv im C-terminalen Segment des Abl-Teils von Bcr-Abl vermittelt.....	70
4.5.2	Die HEFL-SH3-Domäne ist nicht alleine für die Interaktion mit Bcr-Abl verantwortlich.....	72
4.6	Die Interaktion von HEFL mit Bcr-Abl (Wt) führt zur Phosphorylierung von HEFL	74
5.	Diskussion	76
5.1	Klonierung des HEFL-Gens.....	76
5.2	HEFL hat die Domänenstruktur eines Multi-Adaptor-Proteins der Cas-Protein-Familie....	79
5.3	Charakterisierung der Interaktion von HEFL mit Bcr-Abl.....	81
5.4	HEFL scheint in den Integrinsignalweg involviert zu sein.....	84
6.	Zusammenfassung	85
7.	Literaturverzeichnis	87

8.	Abbildungsverzeichnis	101
9.	Danksagung	103

Abkürzungsverzeichnis

α	alpha/anti
Δ	delta/ <i>Deletion</i>
μ	Mikro (-gramm, -liter, -mol)
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
ALL	akute lymphatische Leukämie
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
Bcr	<i>breakpoint cluster region</i>
BSA	bovines Serumalbumin
C	Celsius
c-Abl	zelluläre Form des Abelson-Gens
CBL	<i>casitas B-lineage lymphoma protein</i>
cDNA	komplementäre (<i>complementary</i>) DNA
CIAP	alkalische Phosphatase aus Kalbsdarm (<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>)
CML	chronisch myeloische Leukämie
CRKL	<i>Crk oncogene-like protein</i>
C-terminal	carboxyterminal
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-deoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>

<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
F	Farad
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FCS	fetales Kälberserum
g	Gramm
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
Grb	<i>growth factor receptor-bound protein</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEFL	<i>human enhancer of filamentation like</i>
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethanolsulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
IFN	Interferon
IL-3	Interleukin 3
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JAK	Januskinase
kb	Kilobase(n)
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Kin ⁻	kinasedefekt
Li	Lithium
M	molar
mA	Milliampere
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
MKS	Multiklonierungsstelle
mM	millimolar
mRNA	messenger-RNA
Mut	Mutante
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	Trinatrium-Citrat

Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NCBI	<i>National Center of Biotechnological Information</i>
ng	Nanogramm
N-terminal	aminoterminal
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PH	Pleckstrin-homolog
Ph ¹	Philadelphia-Chromosom
Ph ⁺	Philadelphia-Chromosom positiv
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PMSF	Phenylmethylnsulfonfluorid
PtdIns(3,4)P2	Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat
PtdIns(3,4,5)P3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PVDF	Polyvinylidinfluorid
RB	Retinoblastom
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde(n)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SH	Src-homolog
SOS	<i>son of sevenless</i>
SHC	<i>Src homology 2-containing protein</i>
Src	<i>sarcoma-kinase</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
STI	<i>signal transduction inhibitor</i>
T(A)E	Tris-(Acetat-)EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
THULL	Threonin, Histidin, Uracil, Leucin, Lysin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ts	temperatursensitiv
U	<i>unit</i>
UV	ultraviolett

V/V	Volumen pro Volumen
W(T)(t)	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Einführung

Krebs ist seit Beginn des zwanzigsten Jahrhunderts die zweithäufigste Todesursache nach den Herz- und Kreislauferkrankungen. Krebserkrankungen stellen dabei ein sehr vielschichtiges Problem dar, das fast jeden Aspekt der Biologie normaler Zellen berührt: Von der molekularen über die zelluläre Ebene bis zur Gewebisdifferenzierung und schließlich zur Untersuchung überregionaler Kontrollsysteme wie etwa des Hormon- und Immunsystems. Maligne Tumoren sind eine Erkrankung der Gene; sie wachsen klonal, d.h. sie gehen auf eine einzige, entgleiste Zelle zurück. Dies bedeutet, dass die Eigenschaften der Malignität von der Mutter- auf die Tochterzellen vererbt werden und somit genetisch fixiert sind. Regelmäßig gefundene chromosomale Anomalien bei Leukämien (Kap. 1.3) sprechen ebenfalls dafür, dass Veränderungen auf DNA-Ebene für die unkontrollierte Proliferation von Zellen verantwortlich sind (Li, *et al.*, 1991). Allen Malignomen ist gemeinsam, daß sie nicht mehr den normalen Wachstumskontroll-Mechanismen gehorchen. Pathogenetisch kommt hier Proteinprodukten von Genen, die in die Kontrolle der Zellproliferation und Differenzierung involviert sind, die entscheidende Rolle zu. Zwei Hauptgruppen lassen sich bei den betroffenen Genen abgrenzen: Protoonkogene und Tumorsuppressorgene. Erstere sind Vorstufen der Onkogene und physiologisch an Kontrolle von Zellteilung und Differenzierung beteiligt. Durch Genmutation (z.B. Punktmutation, Deletion) oder chromosomale Translokation - seien sie spontan, durch Chemikalien oder ionisierende Strahlen induziert - können diese Gene geschädigt werden und sich zu aktivierten Onkogenen verwandeln. Diese sind auch ohne Anregung von außen aktiv und programmieren die betroffenen Zellen ständig auf Zellteilung und Proliferation. Ein zweiter Mechanismus der Onkogenese betrifft die Tumorsuppressorgene, die normalerweise die Entstehung von unkontrolliert wachsenden Tumor-Zellen unterdrücken. Hier führt ein Funktionsverlust oder gar eine totale Inaktivierung zur unkontrollierten Zellproliferation (Hunter, 1997; Boxer, 1994).

Krebsentstehung resultiert aus der Akkumulation von mehreren Mutationen in kritischen Genen. Wie beispielhaft bei der Entstehung von Koloncarcinomen untersucht, müssen im Sinne einer Mehrschrittkarzinogenese acht bis zehn Gene durch Mutation verändert sein, bevor aus einer normalen eine Krebszelle entsteht (Kern u. Vogelstein, 1991). Eine der häufigsten Mutationen sind Veränderungen der Chromosomenstruktur, nämlich Deletionen, Inversionen und Translokationen. Alle sind typische Kennzeichen von Krebszellen und im Verlauf der Entwicklung eines Krebsgewebes entstanden. Daneben gibt es

Chromosomenveränderungen, die für einen bestimmten Tumor-Typ kennzeichnend sind. Hierzu zählen hämatologische Neoplasien wie Leukämien, denen oft spezifische Chromosomen-Translokationen zugrunde liegen. Die Translokation von genetischem Material zwischen zwei Chromosomen kann prinzipiell zwei Typen von Ergebnissen produzieren: Zum einen kann ein normalerweise genau reguliertes Gen unter den Einfluß eines Immun-Globulin-Enhancers kommen und verstärkt exprimiert werden. Zum anderen können zwei getrennte Gene miteinander verschmelzen, so dass ein Protein mit neuen Eigenschaften entsteht (Mitani 1996; Solomon *et al.*, 1991; Yunis u. Tanzer, 1993).

Das erste Beispiel für eine spezifische Translokation in Leukozyten ist die chronisch myeloische Leukämie. Hier kommt es zur Verschmelzung des ABL-Gens auf Chromosom 9 mit dem BCR- (*breakpoint cluster region*) Gen auf Chromosom 22 (Sawyers, 1992b; Daley u. Ben-Neriah, 1991). Das resultierende Philadelphia-Chromosom (verkürztes Chromosom 22) findet sich bei nahezu allen Fällen der chronisch myeloischen Leukämie sowie einem Teil der Fälle mit akuter lymphatischer Leukämie (Chan *et al.*, 1987). In der Folge entsteht in den CML-Zellen ein Fusionsprotein, welches eine erhöhte Tyrosinkinaseaktivität aufweist verglichen mit der des normalen ABL-Proteins. Dieses Fusionsprotein vermittelt einen unregulierten Stimulus für die Proliferation der Zelle und wird ursächlich für die klonale Stammzellerkrankung verantwortlich gemacht (Daley *et al.*, 1990; Kelliher *et al.*, 1990). Die exakte Rolle von BCR-ABL bei der Entstehung des malignen Klons ist noch nicht definiert. Intensive Forschungsanstrengungen über die Signaltransduktionswege von BCR-ABL haben aber in jüngster Zeit mit der Entwicklung des Tyrosinkinase-Inhibitors *Imatinib mesylate* einen neuen Therapieansatz ermöglicht, der mit großem Erfolg gezielt in die molekulare Pathogenese der CML eingreift. Leider wurde der initiale Enthusiasmus durch das Auftreten von Resistenzen etwas gedämpft (Gorre *et al.*, 2001). Gerade hier ist die molekulare Grundlagenforschung weiter gefordert, größtmögliche Erkenntnisse über das komplexe System der mit BCR-ABL vernetzten Signalwege zu gewinnen. So konnten z.B. in vitro mit *Imatinib mesylate*-resistenten BCR-ABL-positiven Zelllinien durch Hemmung des Ras-Signalweges mit einem Farnesyl-Transferase-Inhibitor positive Ergebnisse erzielt werden (Hoover *et al.*, 2002). Das Beispiel *Imatinib mesylate* veranschaulicht die Bedeutung des Verständnisses der molekularen Basis der Onkogenese. Eine Eradikation des Leukämieklons und somit Heilung kann jedoch mit *Imatinib mesylate* nicht erreicht werden. Deshalb ist es wichtig, kritische *down stream* Signalwege von BCR-ABL zu identifizieren. Dabei sind eine Vielzahl kritischer Zielmoleküle von BCR-ABL noch unbekannt.

Ein modifizierter *yeast two-hybrid screen* wurde daher in unserer Arbeitsgruppe etabliert, um neue Interaktionspartner von BCR-ABL zu identifizieren. Dabei wurde eine c-DNA-Bibliothek der CML-Zelllinie K562 auf Interaktion mit BCR-ABL untersucht und das Protein HEFL als ein neuer Interaktionspartner identifiziert. Die vorliegende Arbeit fokussiert sich auf die

Klonierung des HEFL-Gens und die molekulare Charakterisierung der Interaktion des HEFL-Proteins mit BCR-ABL.

1.2 Signaltransduktion

Jede lebende Zelle tauscht mit ihrer Umgebung Informationen aus, die ihr die wichtige Entscheidung über Wachstumsstillstand (und eventuell Differenzierung) oder Zellteilung und Proliferation ermöglichen. Signaltransduktion bezeichnet dabei den Prozeß der Weitergabe eines Signals. Der Signafluß kann dabei sowohl aus dem Zellinneren nach außen als auch aus der unmittelbaren Umgebung einer Zelle in das Zellinnere bis zur Erbsubstanz DNA im Zellkern gerichtet sein. Dort vermitteln dann spezifische DNA-bindende Proteine die Aktivierung oder Inhibition bestimmter Gene als Antwort auf das initiale Signal. Signalgeber sind kleine Proteine oder Peptide, sogenannte Wachstumsfaktoren oder Wachstumshormone wie z.B. EGF (*epidermal growth factor*), IGF (*insulin-like growth factor*) und PDGF (*platelet derived growth factor*), die an einen Rezeptor auf der Zelloberfläche binden. Dieser wird dadurch aktiviert und vermittelt Kontakte zu anderen intrazellulären Proteinen bis schließlich Transkriptionsfaktoren aktiv werden und die Expression von Genen eingeleitet oder unterdrückt wird (Schlessinger und Ullrich, 1992; Brunet, 1998).

1.2.1 Protein-Tyrosinkinasen

Bei den Stoffwechselfvorgängen, die in die Vermittlung eines Signals von außerhalb einer Zelle nach intrazellulär bis in den Zellkern involviert sind, spielen die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen eine entscheidende Rolle. In der Koordination von Wachstumsprozessen, morphogenetischen Programmen, aber auch bei der malignen Transformation kommt dabei der Übertragung von Phosphatgruppen auf die Aminosäure Tyrosin ein zentraler Stellenwert zu. Die Enzyme, die die Phosphorylierungsreaktion katalysieren, werden als Protein-Tyrosinkinasen bezeichnet. Phosphatasen hingegen dephosphorylieren Phosphotyrosin-Reste und sind somit an der Herabregulation mitogener Signale beteiligt. Prinzipiell lassen sich Protein-Tyrosinkinasen zwei Hauptgruppen zuordnen. Die eine umfasst Rezeptoren der Zellmembran (Rezeptor-Tyrosinkinasen). Diese haben eine extrazelluläre Liganden-Bindungsdomäne, eine transmembranöse Domäne und einen zytoplasmatischen, inneren Teil. Der innere Anteil ist Träger der Tyrosinkinase, die die γ -Phosphatgruppe von ATP auf Tyrosin in der Seitenkette eines Proteins überträgt. Basierend auf Sequenzhomologien und unterschiedlichen strukturellen Charakteristika lassen sich vier Subgruppen klassifizieren mit dem EGF-R, Insulin-R, PDGF-R, FGF-R als jeweiligem Hauptvertreter der entsprechenden Subgruppe (Ullrich und Schlessinger, 1990;

Fantl *et al.*, 1993). Die andere Hauptgruppe repräsentiert die sogenannten Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen, die keine extrazelluläre Bindestelle für Liganden besitzen und an der Innenseite der Zellmembran, im Zytoplasma und im Zellkern lokalisiert sein können (Bolen *et al.*, 1991 u. 1992; Ullrich und Schlessinger, 1990). Ein bedeutender Vertreter einer Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase ist c-Abl, auf deren funktionelle Bedeutung vor allem in Bezug auf diese Arbeit in Kapitel 1.3.2 genauer eingegangen werden wird.

In der Signalvermittlung durch Rezeptor-Tyrosinkinasen bewirkt die Bindung von Liganden eine Dimerisierung oder Oligomerisierung monomerer Tyrosinkinase-Rezeptoren bzw. eine Konformationsänderung der tetrameren Rezeptoren der Insulinfamilie. Die Dimerisierung bzw. Konformationsänderung bewirkt eine Aktivierung der zytoplasmatischen Kinase-Domäne. Die Substrate der Tyrosinkinase sind zum einen die Rezeptoren selbst (Autophosphorylierung), zum anderen zelluläre Proteine, die mit den zytoplasmatischen Domänen der Rezeptoren assoziieren (Ullrich und Schlessinger, 1990; Heldin, 1995). Die Proteine, die an die Phosphotyrosinreste von Rezeptor-Tyrosinkinasen binden, sind für die Weiterleitung des auf der Zelloberfläche vom Rezeptor empfangenen Signals in die Zelle verantwortlich. Durch die Konstitution aus speziellen, hochkonservierten Domänen mit hoher Bindungsspezifität können diese Proteine mit einer Vielzahl von Signalmolekülen in Kontakt treten und so die kontrollierte Aktivierung bestimmter zum Teil komplex miteinander vernetzter Signalwege induzieren (Schlessinger u. Ullrich, 1992; Pawson u. Schlessinger, 1993). Diese Adaptor-Proteine genannten Moleküle und deren strukturelle Domänen sollen später näher erläutert werden.

1.2.1.1 Onkogene Tyrosinkinasen

Die Bedeutung der allosterischen Regulation der Rezeptoraktivierung (Kap. 1.2.1) und Signaltransduktion wird betont durch das Auftreten einer Vielfalt von strukturellen Veränderungen bei Derivaten von Rezeptor-Tyrosinkinasen mit transformierendem Potential (Ullrich und Schlessinger, 1990). So können genetische mutagene Veränderungen zu einer konstitutiven Dimerisierung von Rezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität führen und folglich die Wirkung der physiologischen Liganden imitieren. Diese konstitutiv aktiven Tyrosinkinasen wirken dann als Onkogen, indem sie dauerhaft mitogene Signalwege stimulieren (Sawyers u. Denny, 1994). Verschiedene Wege der konstitutiven Aktivierung von Tyrosinkinasen sind möglich. Ein Beispiel ist das Produkt des Protoonkogens HER2/neu. Hier führt der Austausch einer einzigen Aminosäure (Glutaminsäure anstelle von Valin) in der transmembranösen Domäne zur Aktivierung der Proteintyrosinkinase aufgrund verstärkter Rezeptoroligomerisierung (Stern *et al.*, 1988; Weiner *et al.*, 1989). Hämatologischen Neoplasien wie Leukämien und Lymphomen liegen hingegen oft spezifische chromosomale Translokationen zugrunde, in deren Folge es zur konstitutiven

Dimerisierung/Oligomerisierung und damit Aktivierung von (Rezeptor-)Protein-Tyrosinkinasen kommt. Häufig handelt es sich dabei um die Bildung eines Fusionsproteins aus trunkierter (Rezeptor-)Protein-Tyrosinkinase fusioniert mit Proteinsequenzen, die in der Regel typische Dimerisierung-Motive aufweisen (Rodrigues u. Park, 1994). Beispiele sind die irregulär exprimierten, konstitutiv aktiven Tyrosinkinasen Npm-Alk beim großzelligen anaplastischen Lymphom (Morris *et al*, 1994) und Bcr-Abl. Das Fusionsprotein Bcr-Abl wird ursächlich für die Entstehung der CML verantwortlich gemacht und in Kapitel 1.3.3 näher charakterisiert werden (Konopka *et al*, 1985; Daley *et al*, 1990).

1.2.2 Adaptor-Proteine

Die nach Rezeptorstimulation erfolgende kontrollierte Aktivierung bestimmter Signalkaskaden wird durch zytoplasmatische Proteine vermittelt (Kap. 1.2.1). Diese sogenannten Adaptor-Proteine können enzymatische Aktivität zeigen oder praktisch nur aus Protein-Bindungsdomänen bestehen. Bedeutend sind hierbei SH2 -, und SH3 - Domänen (Src-Homologie-Domäne 2 bzw. 3), deren Bezeichnung auf die Homologie mit einer entsprechenden Domäne des Src-Onkoproteins beruht, sowie die Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH). Wesentliche Funktion der Adaptor-Proteine ist die Translokation von zytoplasmatischen Proteinen an funktionell bedeutsame Orte der Zelle. Dies bringt zum einen Enzyme wie z.B. PLC γ und PI3Kinase in die Nähe zu ihren Substraten in der Zellmembran. Ferner werden die Enzyme durch Bindung an den Rezeptor an Tyrosinresten phosphoryliert und hierdurch aktiviert (Fantl *et al*, 1993). Zum anderen kann durch die Interaktion zwischen SH2-Domäne von Adaptor-Proteinen ohne enzymatische Aktivität wie Grb2 und Shc mit einem Phosphotyrosin-Rest von Rezeptoren die Kopplung an Ras und damit Stimulation eines mitogenen Signalwegs erfolgen. Die entscheidende, funktionelle Bedeutung der SH2-Domäne, die etwa 100 Aminosäuren umfasst, liegt dabei in ihrer Assoziation mit Phosphotyrosin-Resten der (Rezeptor-) Tyrosinkinasen. Die Spezifität der Bindung wird durch die Struktur der SH2-Domäne und drei dem Phosphotyrosin-Rest C-terminal benachbarte Aminosäuren bestimmt (Pawson u. Schlessinger, 1993; Songyang *et al*, 1993). SH3-Domänen bestehen aus ungefähr 60 Aminosäuren und binden an prolinreiche Aminosäuresequenzabschnitte zytoplasmatischer Bindungspartner (Pawson u. Schlessinger, 1993). Als Konsensussequenz der Bindungspartner wurde ein spezifisches PXXP-Motiv in einer etwa 10 Aminosäuren langen Sequenz identifiziert (Rickles *et al*, 1994). Neben der Vermittlung der intermolekularen Assoziation mit zytoplasmatischen Proteinen fungieren SH3-Domänen auch als intramolekulare Regulatoren der Tyrosin-Kinase-Aktivität wie z.B. für die c-Src - und c-Abl - Tyrosinkinase beschrieben, da die Deletion der SH3-Domäne zur konstitutiven Aktivierung dieser Tyrosinkinasen führt (Pawson u. Schlessinger, 1993). PH-Domänen umfassen ein ungefähr 100 Aminosäuren großes Bindungsmotiv, welches zuerst

in dem thrombozytären Protein Pleckstrin definiert wurde, das als Substrat für die Proteinkinase C dient (Musacchio *et al.*, 1993). PH-Domänen binden Phospholipide wie PtdIns(3,4)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃ - Produkte der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3Kinase) - und werden dadurch mit der Zellmembran konnektiert. Ist die genaue Bedeutung der PH-Domäne für die intrazelluläre Signaltransduktion noch unklar, scheint doch die Interaktion mit Phospholipiden eine zentrale Rolle zu spielen (Lemmon *et al.*, 1996).

1.3 Bcr-Abl und seine Rolle bei der chronisch myeloischen Leukämie

1.3.1 Die chronisch myeloische Leukämie (CML)

Die chronisch myeloische Leukämie ist eine klonale myeloproliferative Erkrankung der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle (Silver, 1990; Gold u. Champlin, 1985). Charakteristisch ist das Vorkommen aller granulozytären Vorstufen (von den Myeloblasten bis zu den Segmentkernigen) im peripheren Blut. In klassischen Fällen geht sie mit einer hochgradigen Leukozytose (50 000 bis 300 000 pro μ l) einher (Wertheim *et al.*, 2002). Der Begriff Leukämie bedeutet „weißes Blut“. Er ist historisch geprägt und bezieht sich auf die verbreiterte Leukozytenmanschette (buffy coat) auf der Erythrozytensäule nach Zentrifugation des Blutes, die Virchow erstmals bei Leukämiepatienten so beschrieb. Die Häufigkeit der Erkrankung liegt bei 1-2 Erkrankungen pro 100 000 Menschen und Jahr mit einem medianem Erkrankungsalter von 53 Jahren (Wertheim *et al.*, 2002). Die durchschnittliche Lebenserwartung beträgt etwa 60 Monate. Bei etwa 20 bis 25% kommen längere Verläufe (über 10 Jahre) vor (Kantarjian *et al.*, 1993). Die Ätiologie der CML ist wie bei allen Leukämien letztlich ungeklärt. Im Einzelfall werden ionisierende Strahlen und Chemikalien wie Benzol als das auslösende Agens identifiziert. In der Mehrzahl der Fälle spielen jedoch unbekannte Faktoren eine Rolle. Besonders interessant ist der molekulargenetische Hintergrund der Erkrankung. Die CML war das erste Beispiel einer malignen Erkrankung, bei der eine regelhaft auftretende chromosomale Anomalie registriert werden konnte, nämlich eine verkürzte Form des Chromosoms 22, 22q-, die gemäß der Entdecker Nowell und Hungerford aus Philadelphia als Philadelphia-Chromosom bekannt geworden ist (Nowell u. Hungerford, 1960; Rowley, 1973). Das Philadelphia-Chromosom entsteht als Folge einer reziproken Translokation zwischen Chromosom 9 und Chromosom 22 [t(9;22)(q34;q11)]. Als Resultat der Translokation kommt es zur Bildung des Fusionsgens Bcr-Abl durch eine „Kopf-an-Fuß“ - Verschmelzung des Bcr (Breakpoint cluster region)-Gens auf Chromosom 22 mit dem Abl-Gen auf Chromosom 9 (Abb. 1) und konsekutiver Expression des Fusionsproteins Bcr-Abl (Abb. 1) bei über 95% der Patienten mit CML (Klein *et al.*, 1982; Bartram *et al.*, 1983) sowie bei bis zu 20% der Erwachsenen bzw. ca. 5% der Kinder mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) (Melo, 1996).

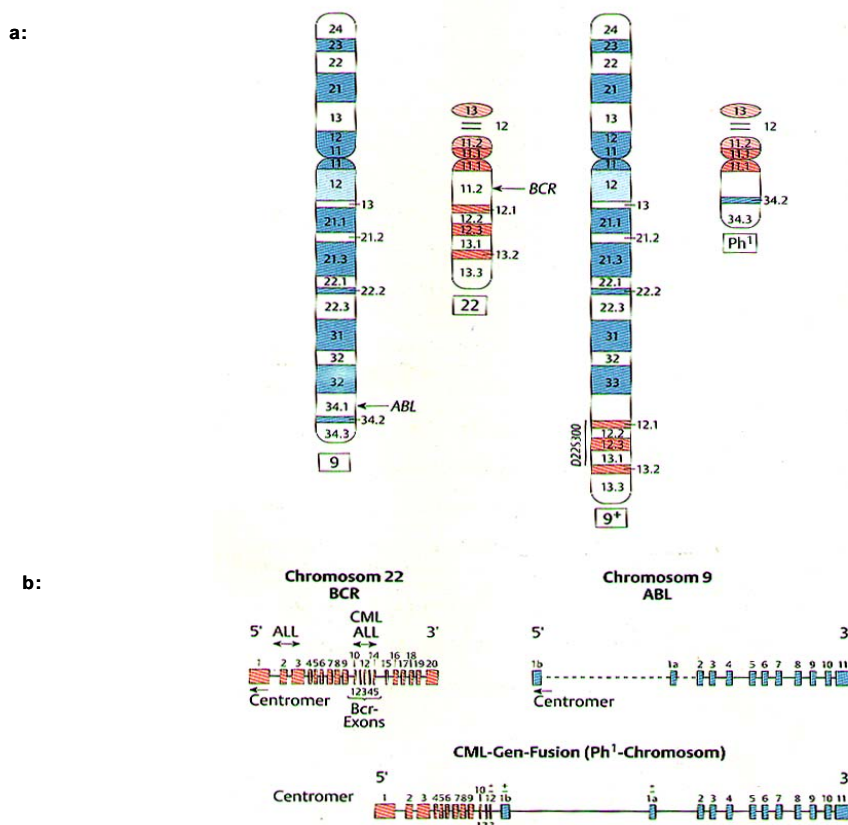


Abb. 1

Zytogenetik der CML (nach Kurzrock *et al.*, 1988; Rabbitts, 1994)

a: Reziproke Translokation des c-Abl-Gens auf Chromosom 9 und des Bcr-Gens auf Chromosom 22 mit Bildung des Philadelphia-Chromosoms.

b: Original-Gene und Fusionsgen als molekulare Konsequenz der Translokation

Dieses Protein verfügt über eine erhöhte Tyrosinkinaseaktivität mit proliferationsfördernder Wirkung, wodurch die klonale Stammzellerkrankung ausgelöst wird. Der eindeutige Beweis für einen kausalen Zusammenhang gelang im Tier-Modell mit dem Nachweis der Fähigkeit des Bcr-Abl – Onkogens, Leukämie bei Mäusen zu induzieren (Daley *et al.*, 1990; Kelliher *et al.*, 1990). Details zur molekularen Pathogenese werden im Rahmen der Charakterisierung des Fusionspartners c-Abl und des Bcr-Abl – Onkogens in Kapitel 1.3.2 bzw. 1.3.3 abgehandelt.

1.3.1.1 Klinischer Verlauf und diagnostische Befunde

Der Beginn der Erkrankung ist fast immer schleichend. Vom Zeitpunkt der malignen Entartung der pluripotenten Stammzelle des Knochenmarks bis zur Diagnosestellung der

CML vergehen etwa acht Jahre (Herold *et al.*, 2001). 40% der Patienten sind zu diesem Zeitpunkt asymptomatisch. Die ersten Beschwerden rühren oft von einer zunehmenden Milzvergrößerung her: Druck und Vollegefühl im Oberbauch, manchmal in den Rücken ausstrahlende Schmerzen. Dazu gesellen sich unspezifische Beschwerden wie allgemeine Schwäche, Gewichtsabnahme, Knochenschmerzen, subfebrile oder febrile Temperaturen und bisweilen Nachtschweiß. Seltener findet sich eine allgemeine Blutungsneigung als alarmierendes Symptom. Charakteristische Laborbefunde sind eine Leukozytose im peripheren Blut (Leukozytenzahlen bis $> 500\,000$ pro μl) durch Vermehrung der neutrophilen Granulozyten sowie eine Linksverschiebung mit Auftreten von granulopoetischen Vorstufen bis zum Myeloblasten. Typisch sind auch eine Basophilie, Anämie und initial bei der Hälfte der Fälle eine Thrombocytose bis $\geq 700\,000$ pro μl sowie eine Erhöhung von Harnsäure und LDH als Folge des vermehrten Zellumsatzes. Von differentialdiagnostischer Bedeutung ist auch eine fehlende oder stark verminderte Aktivität der alkalischen Leukozytenphosphatase, deren Aktivität bei allen übrigen myeloproliferativen Erkrankungen erhöht ist. Im Knochenmark findet sich eine Hyperplasie der Myelopoese, bisweilen auch der Megakaryopoese, mit Ersatz des Fettmarks und Verdrängung der erythropoetischen Zellen. Wegweisend ist ferner die zytogenetische und molekulare Analytik, die durch den Nachweis der Bcr-Abl-Translokation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und des Bcr-Abl-Fusionsproteins durch Western-Blotting beweisend für die Ph^+ - CML ist. In 5-10% der Fälle lässt sich mit diesen Methoden kein Philadelphia-Chromosom nachweisen (Ph^- - CML). Die CML zeigt klassischerweise einen Verlauf in drei Phasen (Abb. 2).

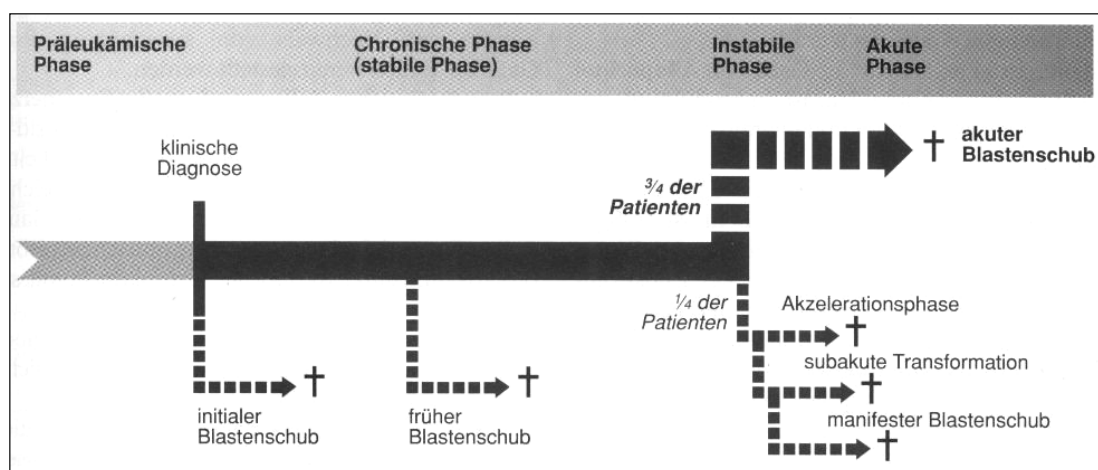


Abb. 2

Phasenhafter Verlauf der Ph^+ - CML (nach Staib *et al.*, 1998)

Stufenweiser Verlauf der CML. Die Länge der einzelnen Phasen differiert individuell; dabei spielen sekundäre zytogenetische und molekulare Veränderungen eine Rolle (siehe Text).

Im Rahmen der initialen chronischen Phase, die therapeutisch gut kontrollierbar ist – oft ohne auffallende Klinik oder hämatologische Symptome – entwickelt sich nach drei bis fünf Jahren eine akzelerierte Phase. Typisch hierfür ist eine Zunahme der Myeloblasten $\geq 15\%$ im peripheren Blut und eine zunehmende Resistenz gegenüber der Initialtherapie. Nach 12 bis 18 Monaten folgt die terminale Erkrankungsphase, die sog. Blastenkrise. Diese ähnelt klinisch einer akuten Leukämie und ist durch Vermehrung der Myeloblasten auf $> 30\%$ im peripheren Blut oder Knochenmark sowie Abfall der Thrombozyten- und Erythrozytenwerte gekennzeichnet. Sie endet nach drei bis sechs Monaten letal.

In etwa 30% der Fälle entwickelt sich eine lymphatische Blastenkrise. Ca. 20-25% der CML-Patienten weisen einen zweiphasigen Krankheitsverlauf auf mit direktem Übergang in die Blastenkrise, ohne die intermediäre akzelerierte Phase zu durchlaufen. Der pathogenetische Hintergrund für die Krankheitsprogression der relativ indolenten, chronischen Phase in die aggressiveren Verlaufsformen akzelerierte Phase und Blastenkrise sind sekundäre zytogenetische und molekulare Veränderungen. Solche zytogenetische Veränderungen umfassen chromosomale numerische Aberrationen wie am häufigsten Trisomien der Chromosomen 8, 19, 21 sowie ein zusätzliches Philadelphia-Chromosom, aber auch Monosomien der Chromosomen Y, 17 und 7. Als strukturelle Aberrationen finden sich $i(17q)$ und $t(3;21)(q26;q22)$. Zu den molekularen Veränderungen, die vor oder während des Übergangs zur Blastenkrise auftreten, gehören eine Überexpression des Bcr-Abl – Transkriptes, eine Hochregulation des EVI1 – Gens sowie Mutationen der Tumorsuppressor-Gene RB1, TP53 und CDKN2A. Das zytogenetische Entwicklungsmuster variiert dabei signifikant in Abhängigkeit von dem Behandlungs-Regime während der chronischen Phase. So findet sich eine Trisomie 8 beispielsweise häufiger nach Busulfan- als nach Hydroxyurea-Therapie. Ferner lassen sich leichte signifikante Unterschiede zwischen myeloischer und lymphatischer Blastenkrise finden mit einer höheren Inzidenz von $i(17q)$ und TP53-Mutation bei der myeloischen Blastenkrise bzw. von Monosomie 7 und CDKN2A-Deletion bei der lymphatischen Blastenkrise (Johansson *et al.*, 2002; Klucher *et al.*, 1998, Mitelman, 1993; Ahuja *et al.*, 1991).

1.3.1.2 Therapie

Die Therapie der CML hat in jüngster Zeit eine Änderung ihrer Strategie erfahren. Bislang galt die Suppression oder Elimination der Ph^+ - CML - Zellen durch IFN- α in Kombination mit Cytosin-Arabinosid als Therapie der Wahl in der chronischen Phase der CML. Mit dem Beweis eines direkten kausalen Zusammenhangs zwischen dem Fusionsonkogen Bcr-Abl und der Induktion dieser myeloproliferativen Erkrankung im Jahre 1990 (Daley *et al.*, 1990) und dem Wissen um die essentielle Bedeutung der hochregulierten Bcr-Abl-Tyrosinkinase

für das transformierende Potential des Bcr-Abl-Proteins (Lugo *et al.*, 1990), hat sich jüngst die selektive Inhibition der Bcr-Abl-Kinase - die schon länger im Zentrum des Interesses molekularer und klinischer Forschungsstudien war - als effektiver neuer therapeutischer Ansatz herauskristallisiert. Wie die Ergebnisse der kürzlich veröffentlichten Studie der IRIS (International Randomized IFN vs STI571) Study Group zur Verbesserung des Therapieerfolgs durch den Abl-Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib mesylate (frühere Bezeichnung STI 571) (Druker *et al.*, 2002) bei der Behandlung der CML in der neudiagnostizierten chronischen Phase zeigen, erzielten die Patienten, die in den STI 571-Behandlungsarm randomisiert worden waren, signifikant bessere Ergebnisse als die Patienten, die nach dem konventionellen Behandlungsregime mit IFN plus niedrig dosiertes Cytosin-Arabinosid (Ara-C) behandelt worden waren. Vergleichene Parameter umfaßten u.a. komplette hämatologische Remission, partielle und komplette zytogenetische Remission, wobei sich gerade in Bezug auf letztere eine deutliche Überlegenheit der Imatinib-Gruppe zeigte. Dies ist gerade deshalb von besonderer Bedeutung, da im Unterschied zu den anderen genannten Parametern das Erreichen einer kompletten zytogenetischen Remission von prognostischer Relevanz ist im Hinblick auf Überlebensverlängerung und längeres krankheitsfreies Überleben. Auch in der Behandlung der bislang konventionell mit Chemotherapie behandelten und generell hochgradig therapierefraktären Blastenkrise verbucht Imatinib einen Therapievorteil mit einem medianem Überleben von 6.9 vs drei Monaten (Sawyers *et al.*, 2002). Das Auftreten von Resistenzen gegenüber Imatinib hat den anfänglichen Enthusiasmus sicherlich gebremst, wobei vornehmlich Patienten in fortgeschrittenen Erkrankungsphasen mit per se ungünstiger Therapieprognose davon betroffen sind (Druker, 2002). Neben einer primären Resistenz, bei der zusätzliche zytogenetische chromosomale numerische oder strukturelle Aberrationen als Bcr-Abl-unabhängige Resistenzmechanismen vorherrschen (Hochhaus *et al.*, 2002), kommt es bei der Mehrzahl der rezidierten Fälle, die initial auf Imatinib ansprechen, zu einer Reaktivierung der Bcr-Abl-Kinase. Dabei spielen Mutationen in der Abl-Kinase-Domäne die führende Rolle (Branford *et al.*, 2002; Hochhaus *et al.*, 2002; Roche-Lestienne *et al.*, 2002; Shah *et al.*, 2002; von Bubnoff *et al.*, 2002). In einigen anderen Fällen liegt eine Amplifikation des Bcr-Abl-Gens oder Bcr-Abl-Proteins vor (Hochhaus *et al.*, 2002). Trotzdem behält die molekular ausgerichtete Therapie mit Inhibition der Abl-Kinase auch bei Rezidiven ihren Stellenwert. Beispielsweise in der Kombination mit synergistisch wirksamen Substanzen wie niedrig dosiertem Ara-C. Denkbar ist ferner die Kombination von unterschiedlich spezifischen Abl-Kinase-Inhibitoren im Sinne eines Inhibitor-Cocktails, dessen Zusammensetzung vom individuellen molekularen Mutationsprofil eines Patienten abhängt. Ein entscheidender Vorteil ergäbe sich dabei daraus, basierend auf dem Wissen um das Spektrum auftretender Mutationen, ebensolche bereits vor Auftreten eines klinischen Rezidives oder gar vor

Behandlungsbeginn mit Imatinib zu identifizieren und damit die klonale Selektion okkult vorhandener (primär) resistenter CML-Zellen zu verhindern.

Nach den Ergebnissen einer kürzlichst veröffentlichten Studie (Hughes *et al.*, 2003) wird eine vollständige molekulare Remission allerdings auch durch Imatinib nicht erreicht und bleibt damit weiterhin der allogenen Knochenmarkstransplantation vorbehalten, bei der die Patienten eine Aussicht auf molekulare Heilung haben (sofern sie die Behandlung überleben) und die bis dato auch die alleinige kurative Therapieform der CML darstellt. Sie ist daher vor allem bei jungen Patienten mit verfügbarem HLA-identischem Familienspender trotz hoher therapieassoziierter Mortalität (bis 30%) nach wie vor die Therapie der Wahl.

1.3.2 c-Abl

C-Abl ist ein Proto-Onkogen, dessen Proteinprodukt - das Abl-Protein - zusammen mit den Bcr-Sequenzen (siehe Kapitel 1.3.3) wesentlich zum onkogenen Potential des Bcr-Abl-Proteins beiträgt. Von herausragender Bedeutung ist hierbei die Abl-Tyrosinkinase, die essentiell ist für die transformierende Wirkung von Bcr-Abl. Die Abl-Kinase zählt zur Familie der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen, wird ubiquitär exprimiert und ist als einziger Vertreter dieser Gruppe im Zellkern und im Zytoplasma nachweisbar (Wang, 1993). Die exakte Funktion ist unbekannt. C-Abl wurde ursprünglich als das zelluläre Homolog des v-Abl-Gens, des transformierenden Onkogens des Retrovirus Abelson-Maus-Leukämie-Virus (A-MuLV) identifiziert (Goff *et al.*, 1980, Wang *et al.*, 1984). Es handelt sich somit um eine der spektakulären Verbindungen zwischen retroviralem Onkogen (v-Onk) und zellulärem (Proto-) Onkogen (c-Onk). Insgesamt sind bis dato vier in der Natur vorkommende c-Abl-Onkogene bekannt. Neben dem bereits genannten v-Abl-Onkogen des A-MuLV zählen hierzu das v-Abl-Onkogen des Hardy-Zuckerman-2-Feline-Sarkom-Virus (HZ2-FSV) (Bergold *et al.*, 1987), das chimäre Bcr-Abl-Onkogen der Ph⁺ - Leukämie (Kurzrock *et al.*, 1988) und das chimäre Tel-Abl-Onkogen, welches mit akuter lymphoblastischer und myeloischer Leukämie assoziiert ist (Papadopoulos *et al.*, 1995, Golub *et al.*, 1996).

Die Kinaseaktivität von c-Abl ist in der Zelle streng reguliert und weist normalerweise in allen Phasen des Zellzyklus bis auf die S-Phase eine sehr geringe Aktivität auf. Nukleäres Abl wird als negativer Regulator des Zellwachstums angesehen, während die zytoplasmatische Form in aktiviertem Zustand als proliferativer Stimulus agiert. Dabei wird Abl im Zellkern durch Assoziation mit dem Tumorsuppressorprotein RB (Retinoblastoma-Protein) inhibiert (Welch u. Wang, 1993). Ein weiterer Regulationsmechanismus von c-Abl wird durch Zelladhäsion vermittelt, wodurch die Kinaseaktivität und subzelluläre Lokalisation von c-Abl gesteuert werden. So wird c-Abl nach Zelladhäsion an Fibronectin der extrazellulären Matrix aus dem Zellkern ins Zytoplasma rekrutiert, dort aktiviert und in diesem Zustand wieder in den Zellkern zurückverteilt (Lewis *et al.*, 1996). Man nimmt daher an, daß aktives nukleäres

Abl aus dem Zytoplasma kommt und als Vermittler extrazellulärer Signale in den Zellkern fungierend auf diese Weise den Zellzyklus beeinflusst. In der Regulation der Kinaseaktivität wird auch der Abl-SH3-Domäne (Abb. 3, 4) eine regulierende Funktion zugeschrieben.

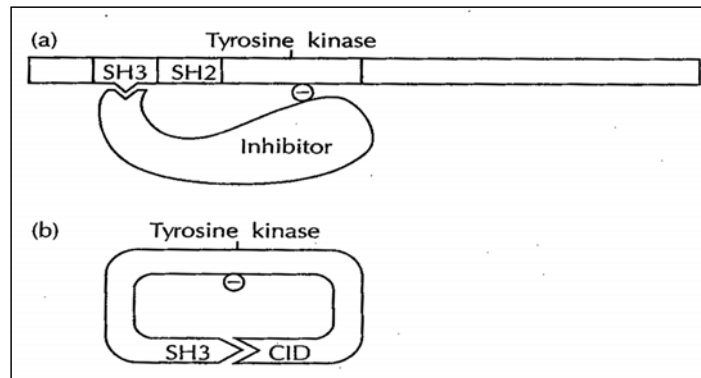


Abb. 3

Inhibitionsmechanismen (-) der c-Abl Tyrosinkinase (nach Wang, 1993)

a: Trans-Inhibition. Ein intrazellulärer Inhibitor bindet an die c-Abl SH3-Domäne und vermittelt den inhibitorischen Effekt.

b: Cis-Inhibition. Ein im C-terminalen Segment von c-Abl gelegenes Bindungsmotiv (Cis-inhibitorische Domäne, CID) interagiert mit der SH3-Domäne und ruft eine inaktive Proteinkonformation hervor.

Man geht davon aus, daß durch intramolekulare Bindung der SH3-Domäne an eine prolinreiche Region im C-terminalen Segment von c-Abl die Kinaseaktivität des Proteins gehemmt wird (Cis-Inhibition); alternativ wäre die Bindung eines zellulären Inhibitors an die SH3-Domäne denkbar (Trans-Inhibition) (Abb. 3) (Wang, 1993). Auch die Tatsache, daß der Austausch der SH3-Domäne durch die virale Gag-Sequenz im retroviralen v-Abl-Gen die Deregulation und konstitutive Aktivierung der Abl-Kinase bewirkt (Wang *et al.*, 1982) sowie Deletion und Mutation der SH3-Domäne zur Kinase-Aktivierung führen (Franz *et al.*, 1989), unterstreicht eine regulierende Funktion der Abl-SH3-Domäne für die Kinaseaktivität.

Zur komplexen Proteinstruktur von c-Abl gehören neben der zentralen Tyrosinkinase-Domäne (SH1), SH3-Domäne und prolinreicher Region noch eine SH2-Domäne sowie die C-terminale Region, die von einem einzigen Exon kodiert wird (Abb. 4). Sie weist eine DNA- und Aktin-bindende Domäne (Kipreos u. Wang, 1992; McWhirter u. Wang, 1993) sowie ein nukleäres Translokationssignal auf, das für die Lokalisation von c-Abl im Zellkern verantwortlich ist (van Etten *et al.*, 1989). SH3- und SH2-Domäne sind charakteristisch für Moleküle, die in Signaltransduktionswege involviert sind, indem sie an der Bildung stabiler Signalmolekül-Komplexe und wie für die SH3-Domäne gezeigt auch Regulation der Proteinfunktion beteiligt sind. Insbesondere die SH2-Domäne ist essentiell für die Substratspezifität

von c-Abl. So bindet Abl über die SH2-Domäne z.B. an Phosphotyrosin der CTD (carboxyl-terminal repeated domain) der RNA-Polymerase II und ermöglicht dadurch die prozessive Phosphorylierung der CTD. Durch Deletion oder Mutation der SH2-Domäne hingegen verliert c-Abl die Fähigkeit, seine spezifischen Substrate zu binden und damit auch seine biologische Funktion (Duyster *et al.*, 1995). Auch für das transformierende Potential von Bcr-Abl scheint die Abl-SH2-Domäne von essentieller Bedeutung zu sein, da ein Bcr-Abl-Protein mit mutierter SH2-Domäne nicht mehr in der Lage ist, eine CML-ähnliche Erkrankung in Mäusen zu induzieren (Ilaria *et al.*, 1998).

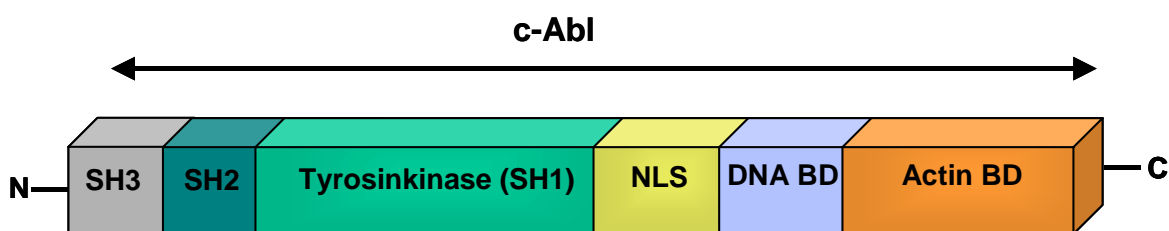


Abb. 4

Schematische Darstellung der Domänenstruktur von c-Abl

SH3: Src-homologe Domäne 3; SH2: Src-homologe Domäne 2; NLS: Nukleäres Lokalisationssignal; DNA BD: DNA bindende Domäne; Actin BD: Actin bindende Domäne

Eine sehr wichtige Funktion von c-Abl liegt in der Regulation des programmierten Zelltodes (Apoptose) als zelluläre Antwort auf DNA-Schädigung durch z.B. Chemotherapeutika wie Cisplatin oder ionisierende Strahlung. Diese(s) führt nach DNA-Schädigung über Aktivierung der c-Abl-Kinase zur quantitativen und funktionellen Verstärkung des Apoptose induzierenden Proteins p73, was ein funktionelles/strukturelles Homolog des Tumorsuppressor-Proteins p53 darstellt (Gong *et al.*, 1999; Agami *et al.*, 1999; Yuan *et al.*, 1999). Zu den Reaktionen, die infolge DNA-Schädigung die nukleäre Abl-Kinase aktivieren, gehört die Phosphorylierung eines Serin-Restes von Abl durch die Kinase des Ataxia-Telangiectasia-Mutations-Protein (ATM) (Baskaran *et al.*, 1997).

Die genaue biologische Funktion von c-Abl ist noch nicht völlig geklärt. Untersuchungen mit c-Abl *knock-out*-Mäusen zeigten Entwicklungsstörungen mit neurologischen Defekten, Lymphopenie sowie eine hohe neonatale Mortalität der Tiere (Schwartzberg *et al.*, 1991;

Tybulewicz *et al.*, 1991). Alles in allem legen die geschilderten Erkenntnisse eine Funktion von c-Abl bei der Regulierung von Vorgängen der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose nahe.

1.3.3 Bcr-Abl

Bcr-Abl ist ein Fusionsgen, das infolge einer reziproken Translokation zwischen Chromosom 9 und Chromosom 22 entsteht (Kap. 1.3.1.1). Im Zuge der Translokation werden variable Sequenzen des Bcr- (*breakpoint cluster region*) Gens auf Chromosom 22 jeweils mit dem zweiten Exon des c-Abl-Gens von Chromosom 9 fusioniert. Die Bruchstelle auf Chromosom 9 ist dabei derart positioniert, daß nur die vom ersten Exon des Abl-Gens kodierten Sequenzen verloren gehen, so daß das chimäre Protein die Mehrheit der strukturellen/funktionellen Domänen von c-Abl (Kap. 1.3.2) einschließlich der SH3-Domäne und der nachgeschalteten Domänen enthält (Abb. 5).

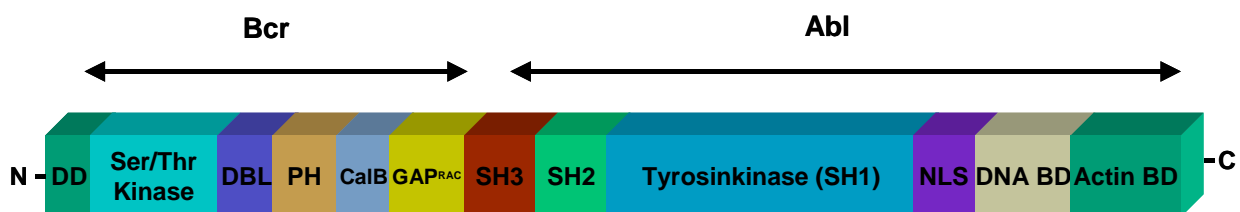


Abb. 5

Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Bcr-Abl

DD: Dimerisierungs- (bzw. Oligomerisierungs-) Domäne; DBL: DBL homologe Domäne; PH: Pleckstrin homologe Domäne; CalB: Calciumabhängige Membran-/Phospholipid-Domäne; GAP^{RAC}: Rac-GTPase aktivierende Domäne; SH3: Src-homologe Domäne 3; SH2: Src-homologe Domäne 2; NLS: Nukleäres Lokalisationssignal; DNA BD: DNA bindende Domäne; Actin BD: Actin bindende Domäne

Im Gegensatz dazu liegen die Bruchstellen im Bcr-Gen innerhalb von drei Regionen, der *M-bcr* (*major breakpoint cluster region*), der *m-bcr* (*minor breakpoint cluster region*) und der *μ-bcr* am 3'-Ende des Bcr-Gens. Die entstehenden Hybridgene kodieren je nach Anteil der Bcr-Sequenzen in Abhängigkeit von der Lage der Bruchstelle in der *m-bcr*, *M-bcr* oder *μ-bcr* drei unterschiedliche Transkripte und deren entsprechende Proteinprodukte, die jeweils als p185, p210 und p230 bezeichnet werden (Abb. 6).

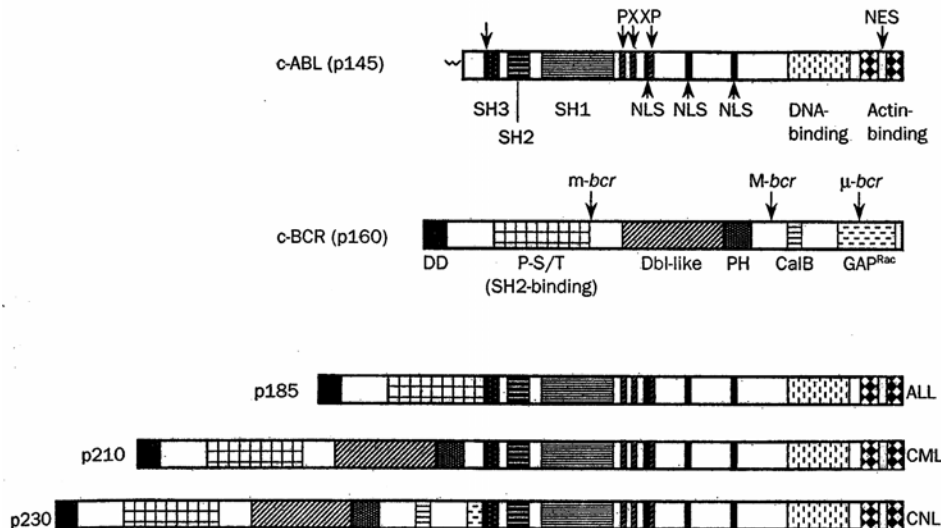


Abb. 6

Schematische Darstellung der Domänenstruktur von c-Abl, c-Bcr und Bcr-Abl (nach Pendergast, 2001)

DD: Dimerisierungsdomäne; P-S/T: Prolin-, Serin-, Threonin-reiche Domäne; DbI-like: DbI homologe Domäne; PH: Pleckstrin homologe Domäne; CalB: Calciumabhängige Membran-/Phospholipid-Domäne; GAP^{Rac}: Rac-GTPase aktivierende Domäne; SH3: Src-homologe Domäne 3; SH2: Src-homologe Domäne 2; SH1: Abl-Tyrosinkinase; NLS: Nukleäres Translokationssignal; DNA-binding: DNA bindende Domäne; NES: Nukleäres Exportsignal; Actin-binding: Actin bindende Domäne

Dabei korreliert die Struktur der unterschiedlichen Bcr-Abl-Proteine mit einem unterschiedlichen klinischen und biologischen Phänotyp der durch sie hervorgerufenen Erkrankung. Das kleinere p185 Bcr-Abl (auch bekannt als p190 Bcr-Abl) ist vornehmlich mit der ALL (Melo, 1996), p210 Bcr-Abl vornehmlich mit der CML (Rowley, 1973; Klein *et al.*, 1982) und p230 Bcr-Abl hauptsächlich mit der CNL (chronisch neutrophile Leukämie) assoziiert. Die CNL ist eine myeloproliferative Erkrankung, die charakterisiert ist durch einen milderen klinischen Verlauf und hämatologischen Phänotyp mit nur geringer Tendenz zur akuten blastischen Transformation (Pane *et al.*, 1996).

Die Fusion von Bcr-Sequenzen an das zweite Exon von Abl führt zur konstitutiven Aktivierung der Abl-Tyrosinkinase, die essentiell ist für die onkogene Wirkung von Bcr-Abl (Cortez *et al.*, 1995; Pendergast *et al.*, 1993). Dies wird auch durch die erfolgreiche Behandlung der CML durch die selektive Inhibition der Bcr-Abl-Tyrosinkinase mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib verdeutlicht (Kap. 1.3.1.2) (Druker *et al.*, 2002). Die Kinaseaktivierung resultiert aus der Bildung von Bcr-Homotetrameren vermittelt durch ein sog. „coiled coil“ – Motiv einer N-terminalen Oligomerisierungsdomäne, die von den ersten 63 Aminosäuren von Bcr gebildet wird (McWhirter *et al.*, 1993; McWhirter u. Wang, 1991). Darüberhinaus ist eine intakte Oligomerisierungsdomäne neben der Aktivierung der Abl-

Kinase und des transformierenden Potentials auch für die zytoplasmatische Lokalisation und Assoziation von Bcr-Abl mit Aktin-Filamenten verantwortlich, indem die tetramere Konformation von Bcr-Abl eine bessere Zugänglichkeit der Aktin-bindenden Domäne des C-terminalen Segmentes von Bcr-Abl eröffnet und dadurch die zytoplasmatische Lokalisation fördert (McWhirter u. Wang, 1991; McWhirter u. Wang, 1993; McWhirter u. Wang, 1997). Außer der N-terminalen Oligomerisierungsdomäne verfügen die Bcr-Sequenzen noch über eine Serin-Threonin-reiche Region, die phosphotyrosinunabhängig an SH2-Domänen bindet (Pendergast *et al.*, 1991), eine Serin/Threonin-Kinase, eine Domäne homolog zu Dbl (Dbl-like), einem Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor für GTPasen der Rho-Familie, eine Pleckstrin-homologe Domäne (PH) (Kap. 1.2.2), eine Calcium-abhängige Membran/Phospholipid (CalB)-Domäne und eine aktivierende Domäne für die Rac-GTPase (GAP^{Rac}). Während die eindeutige Funktion dieser Domänen im Kontext mit Bcr-Abl nicht klar ist, legt das Vorkommen von diesen verschiedenartigen Domänen innerhalb eines einzelnen Polypeptids den Schluß nahe, daß Bcr als Schnittstelle fungiert für eine Vielzahl intrazellulärer miteinander kommunizierender Signalwege. Eine große Zahl von Proteinen ist bekannt, die mit Bcr-Abl assoziieren, durch die Bcr-Abl-Tyrosinkinase phosphoryliert werden oder durch Bcr-Abl induziert/aktiviert werden (Abb. 7).

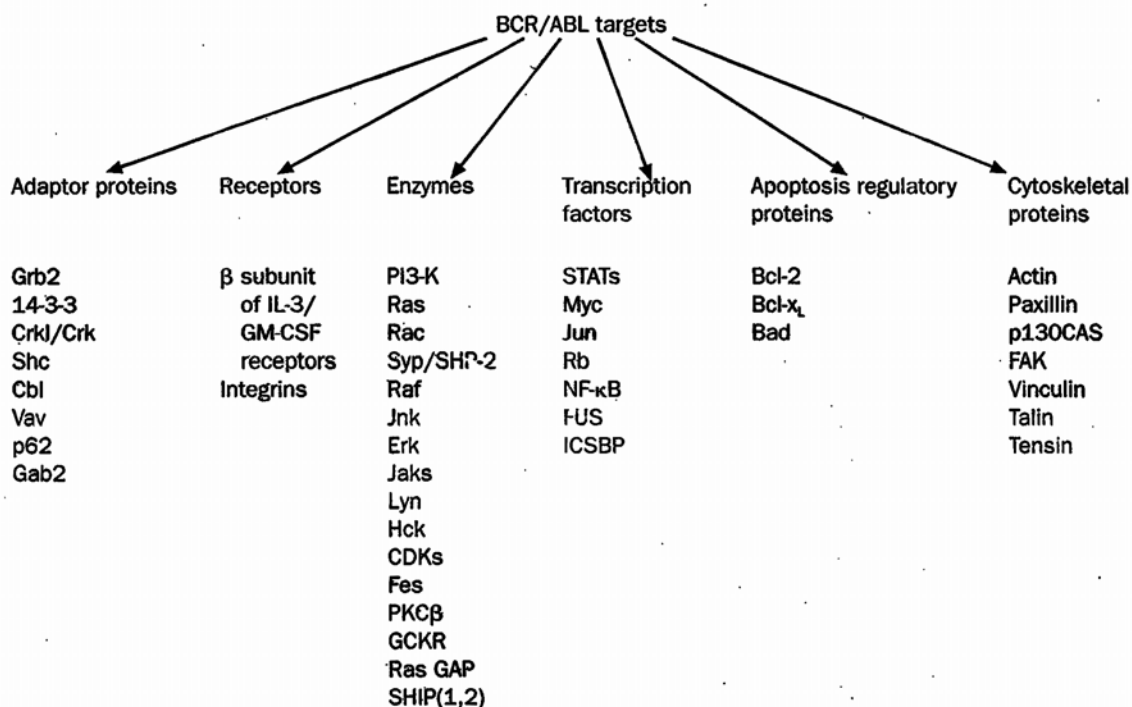


Abb. 7

Zielproteine der Bcr-Abl-Tyrosinkinase (nach Pendergast, 2001)

Dargestellt sind Interaktionspartner von Bcr-Abl wie Adaptor-Proteine, Rezeptoren, Enzyme, Transkriptionsfaktoren, Apoptose regulierende Proteine und zytoskelettale Proteine, die durch Bcr-Abl reguliert u./o phosphoryliert werden.

Im Anschluß folgt eine knappe Abhandlung der wichtigsten gegenwärtig bekannten Signalwege über die Bcr-Abl seine onkogene Wirkung entfaltet.

Darunter ist der Ras-Signalweg, der absolut erforderlich ist für die transformierende Wirkung von Bcr-Abl (Cortez *et al.*, 1996, Million u. van Etten, 2000). Ras-Aktivierung wird reguliert durch die gegenläufigen Aktionen von GTPase-aktivierenden Proteinen (GAP), die als negative Regulatoren der Ras-Aktivität fungieren, und von Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktoren (engl.: guanine nucleotide exchange factors, GEFs), die Ras durch Austausch von GDP gegen GTP in die aktive Form überführen. Bcr-Abl aktiviert Ras über die Regulation von sowohl GAPs als auch GEFs. So inhibiert Bcr-Abl das Ras-spezifische p120GAP, das als Haupt-Negativregulator der Ras-Signalgebung bekannt ist (Kashige *et al.*, 2000). Auf der anderen Seite aktiviert Bcr-Abl Ras durch direkte Interaktion der Autophosphorylierungsstelle Tyrosin 177 im Bcr-Segment von Bcr-Abl mit der SH2-Domäne des Adaptormoleküls Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2). Dieses ist über seine beiden SH3-Domänen mit dem GEF SOS (son of sevenless) assoziiert, der dadurch an den Ras-Signalweg gekoppelt wird (Pendergast *et al.*, 1993; Puil *et al.*, 1994). Eine Unklarheit besteht hierbei jedoch darin, daß das vorwiegend mit Aktinfilamenten assoziierte Bcr-Abl nur zu einem sehr geringen Anteil an Stellen lokalisiert ist, wo die membranlokalisierte Ras-Aktivierung letztlich erfolgt (van Etten *et al.*, 1994; Skourides *et al.*, 1999). Eine mögliche Erklärung läge in der neuerlich nachgewiesenen Rekrutierung des Adaptorproteins Gab2 an die SH3-Domäne von Grb2 im Bcr-Abl:Grb2-Komplex, wodurch Ras aktiviert wird (Sattler *et al.*, 2002). Außer Tyrosin 177 existieren noch mögliche andere Wege, die Bcr-Abl an den Ras-Signalweg koppeln wie beispielsweise die Interaktion von Bcr-Abl mit dem Adaptorprotein SHC (SRC homology 2-containing protein) (Tauchi *et al.*, 1994) oder mit der Phosphotyrosin-Phosphatase SHP-2 (Tauchi *et al.*, 1994), die beide stabile Komplexe mit Grb2 bilden.

Aktiviertes Ras löst seinerseits die Aktivierung von weiter distal im Signalweg geschalteten Proteinen wie Raf-1, Erk und Jnk aus (Cortez *et al.*, 1997; Skorski *et al.*, 1995; Raitano *et al.*, 1995). Der Signalweg endet im Zellkern mit der Phosphorylierung und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren.

Desweiteren wird der PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase)-Akt-Signalweg von Bcr-Abl aktiviert; er vermittelt sowohl mitogene wie antiapoptotische Effekte von Bcr-Abl. Dafür sprechen die Aktivierung der antiapoptotisch wirkenden Serinkinase Akt infolge Interaktion von Bcr-Abl mit PI3K, und die Herabregulation von c-myc, einem Transkriptionsfaktor mit proliferativer Wirkung, sowie von dem Antiapoptose-Molekül Bcl-2 (B cell lymphoma 2) nach Koexpression einer dominant negativen Form von Akt mit Wildtyp-Bcr-Abl (Skorski *et al.*, 1997). Der exakte Mechanismus der PI3K-Aktivierung durch Bcr-Abl ist nicht bekannt und erfolgt am ehesten über eine indirekte Assoziation von Bcr-Abl mit PI3K vermittelt durch Adaptorproteine wie SHC, SHP-2 oder Cbl (casitas B-lineage lymphoma protein).

Ein weiterer Signalweg, der durch Bcr-Abl aktiviert wird, ist der JAK-STAT (janus kinase signal transducer and activator of transcription) - Signalweg. JAK-Kinasen spielen eine bedeutende Rolle bei der Signalübertragung durch Zytokin-Rezeptoren (Briscoe *et al.*, 1994). Bcr-Abl induziert die Phosphorylierung und transkriptionelle Aktivierung von STAT-Transkriptionsfaktoren und imitiert damit deren physiologische Aktivierung durch Zytokine wie Interleukin 3 (IL3), was zum Wachstumsfaktor-unabhängigen Wachstum der Bcr-Abl exprimierenden Zellen führt und als ursächlicher Mechanismus für das Wachstums-Faktor-unabhängige Wachstum von CML-Zellen angesehen wird (Carlesso *et al.*, 1996; Shuai *et al.*, 1996).

Die Interaktion mit dem Adaptorprotein Crkl (Crk-oncogene-like protein) befähigt Bcr-Abl zur Bindung des zytoskelettalen Proteins Paxillin. Paxillin ist Teil sog. fokaler Adhäsionskomplexe in besonderen Bereichen des Zytoskeletts und vermittelt die Adhäsion einer Zelle an die extrazelluläre Matrix. Der Assoziation von Bcr-Abl mit Paxillin wird eine mögliche Ursache für die veränderten adhesiven Eigenschaften von CML-Zellen zugeschrieben (Salgia *et al.*, 1995). Eine Reihe weiterer Proteine, die direkt oder indirekt mit Bcr-Abl interagieren, sind wichtig für die onkogene Aktivität von Bcr-Abl. Dazu gehören der bereits erwähnte Transkriptionsfaktor c-myc (Sawyers *et al.*, 1992) und Rac, eine GTPase, die zur Ras-Protein-Superfamilie gehört und die wesentlich an der Regulation des Migrationsverhaltens einer Zelle beteiligt ist (Skorski *et al.*, 1998), ferner die Adaptorproteine Grb4 und Grb10 (Coutinho *et al.*, 2000; Bai *et al.*, 1998). Die eindeutige biologische Funktion dieser Interaktionen ist letztlich nicht bekannt. Um umfassendere Kenntnisse über die biologisch relevanten Signalwege von Bcr-Abl zu erhalten, ist es daher insbesondere wichtig, die Verbindung zwischen Tyrosinphosphorylierung von zytoskelettalen Proteinen und der Veränderung des Adhäsions- und Migrationsverhaltens von Zellen zu verstehen sowie weitere Informationen zu gewinnen über die Vernetzung von proliferativen/mitogenen Signalwegen mit solchen, die Zelladhäsion und Migration steuern.

1.4 Aufgabenstellung

Die konstitutiv aktive Tyrosinkinase Bcr-Abl wird als molekulare Ursache in der Leukämogenese Ph⁺ - Leukämien angesehen. Intensive Forschungsanstrengungen der letzten Jahre ermöglichten die Identifikation einer Vielzahl potentieller Bindungspartner und Substrate von Bcr-Abl (Kap. 1.3.3). Trotzdem konnte eine entscheidende Rolle für die biologische Funktion von Bcr-Abl in der Leukämieentstehung für keines dieser Moleküle klar nachgewiesen werden. Mit dem Ziel, neue und biologisch relevante Interaktionspartner von

Bcr-Abl zu identifizieren, wurde mit Hilfe eines *Yeast-two-hybrid screens* eine c-DNA-Bibliothek der CML-Zelllinie K562 bezüglich neuer Interaktionspartner von Bcr-Abl untersucht. Dabei wurde die phosphotyrosinunabhängige Interaktion von Bcr-Abl mit dem Klon F6 nachgewiesen. Erste Analysen ergaben, daß es sich um eine bisher nicht charakterisierte und neue Proteinsequenz handelte, die eine 60-prozentige Homologie zur SH3-Domäne von HEF1 (human enhancer of filamentation 1) aufwies, dem eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Zelladhäsion zugeschrieben wird (Law *et al.*, 1998).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Klonierung der kompletten cDNA des identifizierten Klons F6, die Bestimmung seiner Proteinstruktur und Gewebeexpression sowie die Charakterisierung der Interaktion mit Bcr-Abl.

Bevor die gesamte cDNA vorlag, sollten zunächst GST-Bindungsstudien mittels in Bakterien exprimiertem GST-Fusionsprotein von F6 und Zellysat der Bcr-Abl-positiven Zelllinie K562 durchgeführt werden, um zu zeigen, daß sich die in Hefen beobachtete Interaktion von F6 und Bcr-Abl *in vitro* (i.e. semi *in vivo*) reproduzieren läßt. Dies war als grundlegendes Experiment Voraussetzung für eine weitere Bearbeitung des Klons F6. In transienten Expressionsstudien in leicht transfizierbaren Zellen (z.B. 293; Cos) sollten dann Präzipitationsexperimente durchgeführt werden, um zu untersuchen, ob die Komplexbildung von F6 mit Bcr-Abl auch *in vivo* stattfindet. Der Einsatz von kinaseaktiven und kinaseinaktiven Bcr-Abl- Mutanten sollte die Bedeutung der Bcr-Abl-Tyrosinkinase für die Interaktion zeigen. Darüberhinaus sollte durch diese Experimente festgestellt werden, ob F6 ein Substrat von Bcr-Abl ist.

Die komplette cDNA des Klons F6 sollte durch die RACE (Rapid amplification of cDNA ends) - Methode kloniert werden. Zur Analyse des Gewebeverteilungsmusters von F6 sollte dann ein Northern Blot mit einer radioaktiv markierten Sonde komplementär zur Domäne, die für die Interaktion in Hefen verantwortlich war, durchgeführt werden. Für Zwecke von Bindungsstudien sollte ein polyklonaler Antikörper generiert werden. Dazu sollte ein auf dem Klon F6 basierendes rekombinantes Protein, welches in Bakterien als GST-Fusionsprotein hergestellt und aufgereinigt wurde, an eine externe Firma verschickt werden.

2. Material

2.1 Chemikalien und Biochemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agar	Difco, Detroit, USA
Agarose, Ultra Qualität	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Antibiotische, antimykotische Lösung	Gibco/BRL, Eggenstein
Aqua destillata	Delta-Pharma, Pfullingen
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Bromophenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
BSA Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Complete™ Protease Inhibitor Cocktail	Boehringer, Mannheim
Coomassie Brilliantblau	Sigma-Aldrich, Chemie, Deisenhofen
dNTP Mix, 10 mM	Gibco/BRL, Eggenstein
DMEM, Zellmedium	Gibco/BRL, Eggenstein
DOTAP®, Transfektionsreagenz	Boehringer, Mannheim
DTT	Fluka, Deisenhofen
ECL-Reagenzien	Amersham-Buchler, Braunschweig
EDTA	Fluka, Deisenhofen
Essigsäure (Eisessig)	Roth, Karlsruhe
Ethanol, abs.	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
ExpressHyb Hybridization Solution	Clontech, Heidelberg
FCS	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
G418, Antibiotikum	Invitrogen, De Schelp, Niederlande
GenePorter™, Transfektionsreagenz	Gene Therapy Systems, (GTS), USA
Glutathion-Sepharose	Pharmacia Biotech, Freiburg
Glycerin	Fluka, Deisenhofen
Glycin	Merck, Darmstadt
HCL, 1 N	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
HEPES, freie säure, 1 M	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
IPTG	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Fluka, Deisenhofen
Lachssperma-DNA	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
L-Glutamin	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Lysozym	Boehringer, Mannheim
Methanol	J. T. Baker, Deventer (NL)
Naphtol Blauschwarz	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Fluka, Deisenhofen
Natrium-Orthovanadat	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Natriumpyrophosphat	Fluka, Deisenhofen
Nonidet P 40	Fluka, Deisenhofen
PBS, 10x, steril	Gibco/BRL, Eggenstein
PMSF	Boehringer, Mannheim
Protein A-Sepharose CL-4B	Pharmacia Biotech, Freiburg
Rnasin, Ribonuklease Inhibitor	Promega, Heidelberg
RPMI 1640 Medium ohne Glutamin	Seromed, Berlin
Salzsäure, rauchend	Merck, Darmstadt
SDS	Fluka, Deisenhofen
Skim Milk Powder	Fluka, Deisenhofen
Superfect, Transfektionsreagenz	Quiagen, Heidelberg
SuperSignal® Chemiluminescent Substrate	Pierce, Rockford, USA
TEMED	Fluka, Deisenhofen
Tris	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Trypanblau, 0,5%-ige Lösung, 10-fach	Gibco/BRL, Eggenstein
Trypsin-EDTA-Lösung, 10-fach	Gibco/BRL, Eggenstein
Tryptone	Difco, Augsburg
Tween 20	Fluka, Deisenhofen
Zeozin®, Antibiotikum	Invitrogen, De Schelp, Niederlande

2.2 Enzyme

CIAP, 20-30 U/μl	Gibco/BRL, Eggenstein
DNA Polymerase I Large Fragment (Klenow)	Promega, Heidelberg

Pfu-DNA Polymerase	Stratagene, Heidelberg
Restriktionsendonukleasen	Boehringer, Gibco/BRL, New England Biolabs, Stratagene
T4-DNA Ligase	Boehringer, Mannheim
T7-DNA Polymerase	Stratagene, Heidelberg

2.3 Radiochemikalien

^{32}P -ATP	Amersham, Braunschweig
----------------------	------------------------

2.4 Zelllinien

Adhärente Zellen:

293-Zellen	humane Nierenkarzinom-Zell-Linie
Cos-1	Nierenzellen (african green monkey)

Suspensionszellen:

BaF3	murine pro-B-Zell-Linie
K-562	humane CML-Zellen der Blastenkrise
M-07e	humane Zelllinie bei akuter megakaryoblastischer Leukämie

2.5 Prokaryotische und eukaryotische Zellstämme

Epicurian Coli™ XL1-Blue Supercompetent Cells	Stratagene, Heidelberg
Escherichia Coli DH5α	Gibco/BRL, Eggenstein
Saccharomyces cerevisiae-Stamm Y 190	Clontech laboratories, Heidelberg
Top10F' One Shot™ Chemically Competent cells	Invitrogen, Groningen, Niederlande

2.6 Vektoren

Name	Resistenzen	Firma
Bluescript	Ampicillin, Puromycin	Invitrogen, Leek, Niederlande
pAKT2	Ampicillin	Clontech, Palo Alto, USA
PCDNA 3.1	Ampicillin, Neomycin	Invitrogen, Leek, Niederlande
PCDNA 3.1 Zeo(+)	Ampicillin, Zeocin	Invitrogen, Leek, Niederlande
PCMV-Tag 2 B	Kanamycin, G418	Stratagene, La Jolla, USA
PGEX-KG	Ampicillin	Pharmacia, Freiburg
PSLX	Ampicillin, Neomycin	-

2.7 Antikörper

Anti Abl, 8e9, monoklonal, Maus IgG	Pharmingen, San Diego, USA
Anti Abl, Ab-3, monoklonal, Maus IgG	Calbiochem, La Jolla, USA
Anti EGFP, polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz Biotech, Heidelberg
Anti Flag, M2, monoklonal, Maus IgG	Stratagene, Heidelberg
Anti GST (12), monoklonal, Maus, IgG	Santa Cruz Biotech, Heidelberg
Anti HEFL, Kaninchen, polyklonal IgG	Dauids Biotechnology, Regensburg
Anti Kaninchen IgG, HRP-gekoppelt, Esel IgG	Amersham, Braunschweig
Anti Maus IgG, HRP-gekoppelt, Esel IgG	Amersham, Braunschweig
Anti Maus IgG, monoklonal, Kaninchen IgG	Jackson Immuno Research
Anti Phospho-Tyrosin, 4G10, monoklonal, Maus IgG	Upstate Biotechnology, New York, USA
Anti Phospho-Tyrosin, PY20, monoklonal, Maus IgG	Pharmingen, San Diego, USA
Anti Xpress™, Maus, monoklonal	Invitrogen, Leek, Holland

2.8 Molekularbiologische Kits

Human MTN™ Blot II	Clontech, Heidelberg
Marathon™ cDNA Amplification Kit	Clontech, Heidelberg
Plasmid Maxi Kit	Quiagen, Hilden
Plasmid Mini Kit	Quiagen, Hilden
Prime-IT™ Random Primer Kit II	Stratagene, Heidelberg

QIAquick Gel Extraction Kit	Quiagen, Hilden
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Quiagen, Hilden
QIAprep Spin Plasmid Mini Kit	Quiagen, Hilden
QIAquick Spin Purification Kit	Quiagen, Hilden
QuickChange™ Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg
Rapid DNA Ligation Kit	Boehringer, Mannheim
TOPO TA Cloning®, Version H	Invitrogen, Groningen, Niederlande

2.9 Molekulargewichtsmarker für Proteine und Nukleinsäuren

1 kbp DNA-Molekulargewichtsmarker	Bibco/BRL, Eggenstein
100 bp DNA-Molekulargewichtsmarker	Gibco/BRL, Eggenstein
<i>Rainbow</i> Protein-Molekulargewichtsmarker	Amersham, Braunschweig
<i>Prestained</i> SDS-PAGE Standard, <i>broad range</i>	Biorad, München

2.10 DNA-Konstrukte

Abl SH3 in PGEX	Dr. J.Y.J. Wang, UC San Diego, USA
TS-Bcr (1-509) Abl	
(Temperatur-sensitive Mutante TS) in PSLX	Dr. J.Y.J. Wang, UC San Diego, USA
Bcr (1-509) Abl (Kinase Defekt) in PSLX	Dr. J.Y.J. Wang, UC San Diego, USA
Bcr/Abl (Wild Typ) in PCDNA 3.1 Zeo (+)	Dr. J.Y.J. Wang, UC San Diego, USA

2.11 Standard-Geräte

Agarosegel-Elektrophoresekammer Biomax HR 2025	Kodak, New Haven, USA
Analysenwaage BP 221 S	Satorius, Göttingen
Automatic Speed Vac AES 100	Savant
CO ₂ -Inkubator SW J 500 TV BB	Nunc, Wiesbaden
Entwickler Hyperprocessor	Amersham, Braunschweig
Gefrierschränke -20° C, Premium; -80°C	Liebherr; Sanyo
Gel-Integrier-Gerät Integration Control Unit	Biorad, München
Gelphotoapparat P90	Mitsubishi
Geltrockner SG 200	Savant

Heizblock 5436	Eppendorf, Hamburg
Incubator-Shaker Innova 4000	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Kühlzentrifuge J2-HS	Beckman, Fullerton, USA
Kühlzentrifugen 5417 R, 5810 R	Eppendorf, Hamburg
LKB Ultraspec III, Spektralphotometer	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Magnetrührgerät IKAMG RH	Janke & Kunkel, Staufen
Mikroskop V 200	Hund, Wetzlar
Mini Gel Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Multi Gel Long Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
PCR-Thermocycler Primus	MWG-Biotech, Ebersberg
pH-Meter Φ 32	Beckman, Fullerton, USA
Photo-System Eagleye II™	Stratagene, Heidelberg
Refrigerated Incubator-Shaker Innova 4230	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Schüttelinkubator Certomat® BS-1	Biotech International
Schüttler WT 12; Mini-Rocking-Plattform	Biometra, Göttingen
Sterile Werkbank, Laminar Flow 1.8	Holten, Gydevang, Dänemark
Stromgenerator, Powerpack P25	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Transphor Electrophoresis Unit	Hoefer, San Francisco, USA
Tri-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Tube-Rotor SB1	Stuart Scientific
Ultraschall Gerät Sonifier 250	Branson, Danbury, USA
UV-Lampe TI 2	Biometra, Göttingen
Vortex REAX-Top	Heidolph, Nürnberg
Wasserbad 1083	GFL, Burgwedel
Zentrifuge GS-6K	Beckman, Fullerton, USA

2.12 Kulturmedien, Lösungen, Puffer

Amidoschwarz-Färbelösung	0.2% Naphtol Blauschwarz, 25% Isopropanol 10% Essigsäure
--------------------------	--

Amidoschwarz-Entfärbelösung	25% Isopropanol 10% Essigsäure
Coomassie-Färbelösung	0,25% Brilliant Blue 45 % Methanol 10% Eisessig
Coomassie-Entfärbelösung	45% Methanol 10% Eisessig
DNA Präparationspuffer	
Puffer 1 (Resuspension)	50 mM Tris HCL 10 mM EDTA, pH 8.0 100 µg/ml RNase A
Puffer 2 (Bakterien-Lyse)	200 mM NaOH 1% SDS
Puffer 3 (Neutralisation)	3 M K-Acetat, pH 5.5
DNA-Probenpuffer (10x)	50% Glycerin 0,5% Bromophenol Blau 0,5 M EDTA
Dropout-Lösung (10x)	L-Isoleucin 300 mg/l; L-Valin 1500 mg/l L-Adeninhemisulfatsalz 200 mg/l; L- Tryptophan 200 mg/l L-Arginin 200 mg/L; L-Histidin 200 mg/l; L-Leucin 1000 mg/l; L-Lysin 300 mg/l;L-Methionin 200 mg/l; L- Phenylalanin 500 mg/l;L-Threonin 2000 mg/l;L-Tyrosin 300 mg/l;L-Uracil 200 mg/l
Dropout-Lösung (-TL, 10x)	ohne Tryptophan und Leucin
Dropout-Lösung (-THULL, 10x)	ohne Tryptophan, Leucin, Histidin, Uracil und Lysin
Hefe-Lysis-Puffer	2% Triton X-100; 1% SDS; 100 mM NaCl

	10 mM Tris/HCl (pH 8.0); 1 mM EDTA
Laemmli-Puffer (2x)	1 M Tris HCL, pH 6.8 200 mM DTT 4% SDS 0.2% Bromphenol Blau 20% Glycerin
LiAc (10x)	1 M Lithiumacetat, autoklaviert
Luria-Bertani (LB)-Medium (flüssig)	1% Tryptone 0.5% Hefeextrakt 1% NaCl, pH 7.0
Luria-Bertani (LB)-Medium (fest)	1.5% Agar in LB-Medium (flüssig)
Lysis-Puffer (5x)	10 mM Tris-Hcl [pH 7.5] ; 130 mM NaCl ; 5 mM EDTA [pH 8.0]; 1% Triton X-100 <i>Für Zellysis:</i> Lysis-Puffer(1x);50mM NaF;Protease- Inhibitor-Cocktail (1x) ; 1 mM PMSF; 20 mM Na-Phosphat [pH 7.5]; 10 mM Na- Pyrophosphat [pH 7.0]; 1mM Na-Ortho- vanadat
M9-Lösung (5x)	6.4% Na ₂ HPO ₄ •7H ₂ O; 1.5% KH ₂ PO ₄ ; 0.25% NaCl, 0.5% NH ₄ CL in H ₂ O ; autoklaviert
M9-Medium	M9-Lösung; 2% Glucose; 40 mg/l Prolin; 337 mg/l Thiamin in H ₂ O; autoklaviert
NETN-Puffer (1x)	0.5% (V/V) NP-40, 20 mM Tris [pH 8.0] 100 mM NaCl; 1 mM EDTA

PEG/TE/LiAc-Lösung	112 ml 50% PEG 14 ml TE-Puffer (10x) 14 ml LiAc (10x)
Sammelpuffer für SDS-Gele (4x)	5% Acrylamid/Bisacrylamidgemisch(19:1) 0.5 M Tris/HCl [pH 6.8] ;0.4% SDS 0.1% APS 0.1% TEMED
SD-Medium (10x)	6.7% "Yeast Nitrogen Base" (Difco) in H ₂ O; autoklaviert
SOC-Medium:	2% Tryptone 0.55% Hefeextrakt 0.5% 1 M NaCl 0.5% 1M KCL; mit 1M NaOH auf pH 7.0 einstellen; frisch zugeben: 1% 2 M Glukose; 1% 2 M MgCl ₂
SSC (20x)	3 M NaCl 0.3 M Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ [pH 7.0]
TAE-Puffer (10x)	0.4 M Tris 1.1% Essigsäure 0.5 M EDTA
TE-Puffer (10x)	0.1 M Tris/HCl [pH 7.5] 10 mM EDTA
Transfer-Puffer (10x)	250 mM Tris 2.5 mM Glycin 0.5% SDS 20% (V/V) Methanol
Trennpuffer für SDS-Gele (4x)	7-14% Acrylamid/Bisacrylamidgemisch(19 :1) 1.5 M Tris/HCl [pH 8.8] 0.4% SDS 0.1% APS

	0.1% TEMED
Tris-Glycin-Elektrophorese-Puffer (10x)	250 mM Tris 2.5 mM Glycin 0.5% SDS
YPD-Medium	1% „Yeast Extract“ (Difco) 2% “Bacto Peptone” (Difco) in H ₂ O [pH 5.8]; autoklaviert; für die Kultivierung von Hefen zusätzlich: 50 µg/ml Ampicillin; 12 µg/ml Tetracyclin 2% Dextrose

3. Methoden

3.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren

3.1.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Um DNA in definierte Abschnitte zu zerlegen, wird sie mit einer geeigneten Restriktionsendonuclease im optimale Reaktionsbedingungen gewährenden und für das entsprechende Enzym spezifischen Puffer bei optimaler Reaktionstemperatur des jeweiligen Enzyms für zwei Stunden inkubiert. In der Regel wurden 3-5 U Enzym/ μg DNA eingesetzt. Sollten die Restriktionsfragmente für Klonierungszwecke verwendet werden, mußte zuvor das Restriktionsenzym wieder aus dem Reaktionsansatz entfernt werden (üblicherweise erfolgte dies im Rahmen der Isolierung der Fragmente aus dem Agarosegel [Kap. 3.1.4] oder im Sinne einer Deaktivierung durch Inkubation bei 65°C über 20 Minuten).

3.1.2 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Sollen die Restriktionsfragmente in Vektor-DNA eingebaut werden, verwendet man die gleiche Restriktions-Nuclease(n) für die Restriktion der DNA und für das Schneiden der Vektor-DNA. Um eine Wiedervereinigung der Enden geschnittener Vektor-DNA zu verhindern und den Einbau der Restriktionsfragmente zu fördern, wurde die Vektor-DNA nach ihrer Linearisierung mit dem Enzym Phosphatase zur Entfernung der 5'-Phosphat-Reste behandelt. Dazu wurde der Restriktionsansatz mit CIAP (2-5 U) versetzt und für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend zusammen mit den Restriktionsendonuclease wieder inaktiviert (Kap. 3.1.1).

3.1.3 Agarosegelelektrophorese

Die Elektrophorese in Agarose-Gelen ist ein Standardverfahren zur Analyse von DNA. Die Geschwindigkeit mit der DNA-Stücke im elektrischen Feld durch Agarose-Gele wandern hängt dabei am meisten von der Größe der DNA ab, wird aber auch durch Stromstärke, Pufferbedingungen und vor allem die Agarosekonzentration bestimmt. Gerade die letzte Eigenschaft nutzt man zur Trennung von DNA-Fragment-Gemischen verschiedener Größenklassen aus. Gele mit 0.5% Agarose dienen gut zur Auftrennung von DNA-Fragmenten im Bereich von 1000 bis 15000 Basenpaaren. Höhere Agarosekonzentrationen

eignen sich zur Auftrennung von DNA-Fragmenten zwischen 100 und 2000 Basenpaaren. Ein Gel wird durch Kochen von Agarose in TAE-Puffer (1x) hergestellt. Um die DNA-Banden anzufärben, wird Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0.5 µg/ml zugegeben. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basenpaare der DNA, die dann im ultravioletten Licht aufleuchtet. Das Ethidiumbromid enthaltene Agarose-Puffer-Gemisch wird bei einer Temperatur von ca. 50°C in einen Gelträger gegossen und polymerisiert innerhalb von 45 bis 60 Minuten aus. Die

DNA-Fragmente werden dann durch Anlegen einer Spannung (20-120 V) in einer TAE-Puffer enthaltenden Elektrophoresekammer aufgetrennt.

3.1.4. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung eines DNA-Fragments aus einem Agarose-Gel wird die korrelierende DNA-Bande unter UV-Licht identifiziert und mit einem sauberen, scharfen Skalpell ausgeschnitten. Um DNA-Strangbrüche zu vermeiden, wurde eine UV-Lichtquelle mit geringer Bestrahlungsstärke verwendet. Nach Anleitung des *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen GmbH, Hilden) wird die DNA dann mit Hilfe einer Mikrozentrifuge vollständig aus dem Agarose-Stückchen extrahiert und in 30 µl EB-Puffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) aufgenommen. In dieser Präparation kann die DNA direkt für nachfolgende Reaktionen wie Ligation und Sequenzierung verwendet oder bei -20°C aufbewahrt werden.

3.1.5 Ligation von DNA

Der Einbau eines mittels des *QIAquick Gel Extraction Kit* aus einem Agarose-Gel extrahierten Restriktionsfragmentes in Vektor-DNA wurde gemäß des Standard-Protokolls des *Rapid DNA Ligation Kit* (Boehringer, Mannheim) durchgeführt. Es wurden 150 ng Insert-DNA und 50 ng linearisierte, dephosphorylierte Vektor-DNA benötigt. Das molare Verhältnis von Insert und Vektor sollte idealerweise 3:1 betragen. Die Konzentration von Insert- und Vektor-DNA wurde daher zuvor durch Agarose-Gelelektrophorese mit Mengenstandards bekannter Konzentration bestimmt (Kap. 3.1.8). Für die Ligationsreaktion wurden dann die Insert-DNA und Vektor-DNA mit *DNA dilution buffer* und *DNA ligation buffer* zu einem Gesamtvolumen von 20 µl vermischt und zusammen mit 1 µl *T4 DNA Ligase* (5 U/µl) für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das entstehende rekombinante Vektorplasmid konnte nun für die Hitzeschocktransformation von Bakterien verwendet werden (Kap. 3.2.2) oder bei -20°C gelagert werden. Zur Kontrolle wurde ein Ligationsansatz unter gleichen Bedingungen aber ohne Insert-DNA durchgeführt.

3.1.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Das Prinzip der PCR ist die enzymatische Vermehrung eines beliebigen DNA-Abschnitts zwischen zwei Oligonucleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind (Mullis *et al.*, 1986). Voraussetzung ist die Kenntnis über die Nukleotidsequenzen beiderseits des DNA-Abschnitts und die Verfügbarkeit von geeigneten Oligonukleotiden. Die Oligonukleotide werden als sog. *Primer* im Überschuß zu einer DNA-Präparation gegeben. Nach einem sich zyklisch wiederholenden Schema (Denaturierung der Matrizen-DNA, Hybridisierung der Primer, DNA-Synthese) werden in einer Kettenreaktion winzige Mengen einer gegebenen DNA-Sequenz um das Millionenfache amplifiziert. Als Enzym wird gewöhnlich die thermostabile DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) eingesetzt. In der Medizin dient die PCR-Technik als wichtiges diagnostisches Hilfsmittel bei genetischen Krankheiten sowie viralen/bakteriellen Infektionen. In der Molekularbiologie erweist sie sich als nützlich bei der Isolierung von DNA-Klonen aus cDNA-Bibliotheken (Kap. 3.1.8) und kann bei entsprechender Gestaltung der Primer helfen, an einem interessierenden DNA-Abschnitt Punktmutationen, Deletionen und Insertionen vorzunehmen (ortsspezifische PCR-Mutagenese).

3.1.6.1 PCR-Mutagenese

Die Firma Stratagene (Heidelberg) ermöglicht, unter Anwendung des *QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit*, mittels PCR Punktmutationen sowie den Austausch von Aminosäuren oder die Deletion und Insertion von Aminosäuren an doppelsträngiger Plasmid-DNA bei einfacher Handhabung vorzunehmen (Abb. 8). Zum Einsatz kommt hierbei die thermostabile Pfu-Polymerase, eine sog. „proofreading“ - DNA-Polymerase des Bakteriums *Pyrococcus furiosus*, die im Vergleich zur Taq-Polymerase über eine 12-fach höhere Lesegenauigkeit verfügt.

Als erster Schritt müssen die Primer gestaltet werden. Dabei ist darauf zu achten, daß beide Primer die gewünschte Mutation enthalten und komplementär zueinander sind und sich folglich an genau gegenüberliegenden Stellen der doppelsträngigen Plasmid-DNA anlagern. Beide Primer sollten zwischen 25-45 Basen lang sein - mit der Mutationsstelle in der Mitte der Sequenz - sowie nach Möglichkeit mit den Basen G oder C enden. Der GC-Gehalt mußte mindestens 40% betragen und die Schmelztemperatur sollte bei ca. 78°C liegen.

Für die PCR-Reaktion wurde die Matrizen-DNA in einer Konzentration von 50 ng in einem Reaktionsvolumen von 50 µl eingesetzt.

Präparation des PCR-Reaktionsansatzes:

5 µl	10-fach Reaktionspuffer
x µl (~50 ng)	doppelsträngige Matrizen-DNA
x µl (125 ng)	Primer I
x µl (125 ng)	Primer II
1 µl	10 mM dNTP-Mix (2.5 mM pro NTP)
1 µl	Pfu-DNA-Polymerase (2.5 U/µl)

Amplifikationsparameter:

1x	95°C, 30 sec
16x	95°C, 30 sec; 55°C, 1 min; 68°C, 2 min/kb Matrizen-DNA
1x	68°C, 5 min

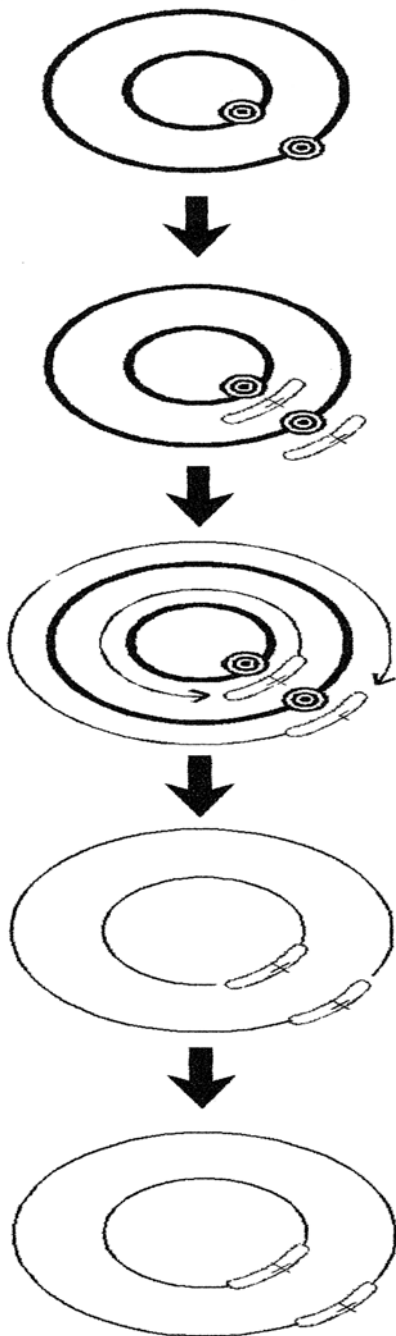
Zur Überprüfung der Funktionalität und Effektivität des *QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit* wurde ein Kontrollansatz unter gleichen Bedingungen mit einem im Kit enthaltenen Kontroll-Plasmid und Kontroll-Primern durchgeführt.

Präparation der PCR-Kontrollreaktion:

5 µl	10-fach Reaktionspuffer
2 µl (10 ng, 0.003 nM)	pWhitescript™ Kontroll-Plasmid (5.7 kb)
1.25 µl (125 ng, 22 nM)	Kontroll-Primer I (34-mer, 100 ng/µl)
1.25 µl (125 ng, 22 nM)	Kontroll-Primer II (34-mer, 100 ng/µl)

Die weiteren Komponenten wurden entsprechend den Angaben des Experimentalansatzes konzentriert.

Das PCR-Produkt wurde nach Ablauf der Reaktion mit Hilfe des *QIAquick Spin Purification Kit* (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und in 30 µl EB-Puffer aufgenommen. Hiervon wurden 25 µl mit 3 µl 10-fach Reaktionspuffer und 2 µl *DpnI* (10 U/µl) versetzt und bei 37°C für 1 h inkubiert. Dieser Schritt diente dazu, die methylierten DNA-Stränge der unmutierten Matrizen-DNA zu zerschneiden.



1.
Plasmid mit markiertem DNA-Abschnitt (ⓧ), der mutiert werden soll.

2.
Denaturierung des Plasmids und Hybridisierung der mutagenen Primer.

⌋ : mutagener Primer

X : mutierte Sequenz

3.
Synthese der neuen DNA-Stränge mit Einbau der mutagenen Primer. Die Stränge enthalten einen kurzen Einzelstrangabschnitt („Nick“).

4.
Verdau der methylierten, parentalen Matrizen-DNA mit der Restriktionsendonuklease DPN I.

5.
DNA-Präparation der mutierten Doppelsträngigen Plasmid-DNA.

— : parentales DNA-Plasmid

⌋ : mutagener Primer

— : mutiertes DNA-Plasmid

Abb. 8

Schematische Darstellung der PCR-Mutagenese mittels „Site directed mutagenesis“

Nach erneuter Aufreinigung des mutierten Plasmids erfolgte die Transformation des PCR-Ansatzes in hitzekompetente Bakterien. Da die durch die PCR-Mutagenese gewonnene DNA an der Anheftungsstelle der Polymerase einen kurzen Einzelstrangabschnitt (*nick*) aufweist, wurde der von der Firma Stratagene im Kit mitgelieferte spezielle Stamm *Epicurian Coli® XL1-Blue Supercompetent Cells* verwendet, der aufgrund seiner Enzymausstattung derartige Lücken in der DNA schließen kann.

3.1.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus einer Bakterienkultur

Von der Firma Qiagen (Hilden) stehen zwei Kits zur Verfügung, die die schnelle und einfache Aufreinigung von Plasmid-DNA aus einer flüssigen Bakterienkultur, die über Nacht bei 37°C und 225 rpm schüttelnd inkubiert worden war, ermöglicht. Je nach Fragestellung und experimentellem Ansatz wurden dabei unterschiedliche Mengen an Luria-Bertani (LB)-Medium (LB-Übernachtskultur) kultiviert, nachdem sie mit dem die interessierende Plasmid-DNA enthaltenden Klon von einer Agarfestplatten-Kultur entsprechend transformierter Bakterien angeimpft worden waren. So sind für analytische Zwecke eines Klonierungsexperimentes kleine Mengen Plasmid-DNA ausreichend, während die Transfektion von Zellen größere DNA-Mengen erfordert. Die Transformanten wurden durch Zusatz von Ampicillin (50 µg/ml) bzw. Kanamycin (10 µg/ml) selektioniert. Es wurden daher entweder 5 ml oder 200 ml LB-Übernachtskultur (+ Amp/+Kana) inkubiert und mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* bzw. *QIAGEN Plasmid Maxi Kit* aufgereinigt. Dazu wurden die Übernachts-Flüssigkulturen bei 3000 rpm und 4°C für 10 min abzentrifugiert und das Pellet anschließend analog des zugehörigen Protokolls aufgearbeitet. Die Konzentration und Reinheitsgrad wurden im Agarosegel bzw. photometrisch bestimmt (Kap.3.1.8).

3.1.8 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration einer Nukleinsäurelösung kann photometrisch durch Messung der Extinktion (E) bei 260 nm und 280 nm bestimmt werden. (Sambrook *et al.*, 1989). Der Quotient $E_{260} : E_{280}$ gibt zusätzlich Auskunft über den Reinheitsgrad der Nukleinsäurelösung und kann somit das Ausmaß etwaiger Verunreinigungen durch Pufferkomponenten oder Proteine abschätzen lassen.

Bei sehr geringen DNA-Mengen kann die Konzentration photometrisch nicht mehr erfaßt werden. In diesem Fall wurde die Nukleinsäurelösung mit einer Referenzlösung im Agarosegel verglichen. Als Maßstab wurde der 1kbp DNA-Molekulargewichtsmarker der

Firma Gibco mit bekannter DNA-Konzentration (1µg/µl) verwendet. Dessen 1636 bp-Fragment entspricht dabei 1/10 der gesamten DNA-Menge.

3.1.9 RACE (Rapid amplification of cDNA ends)

RACE ist eine Methode, die es unter Anwendung der PCR-Technik (Kap. 3.1.6) ermöglicht, fehlende Sequenzen am 3'- oder 5'- Ende eines cDNA-Fragments und damit die komplette Sequenz eines cDNA-Klons bzw. Gens zu bestimmen. Mit dem *Marathon™ cDNA Amplification Kit* (Clontech, Heidelberg) steht dabei ein effizientes Hilfsmittel zur Durchführung dieser Klonierungsmethode zur Verfügung. Einzige Voraussetzung sind die Kenntnis von mindestens 23 Nukleotiden des cDNA-Fragmentes, um geeignete Oligonukleotide als genspezifische Primer gestalten zu können, und die Verfügbarkeit einer cDNA-Bibliothek, deren einzelne cDNA-Moleküle an ihren Enden jeweils mit einem sog. *Marathon-cDNA-Adaptor* verknüpft sind (Abb. 9).

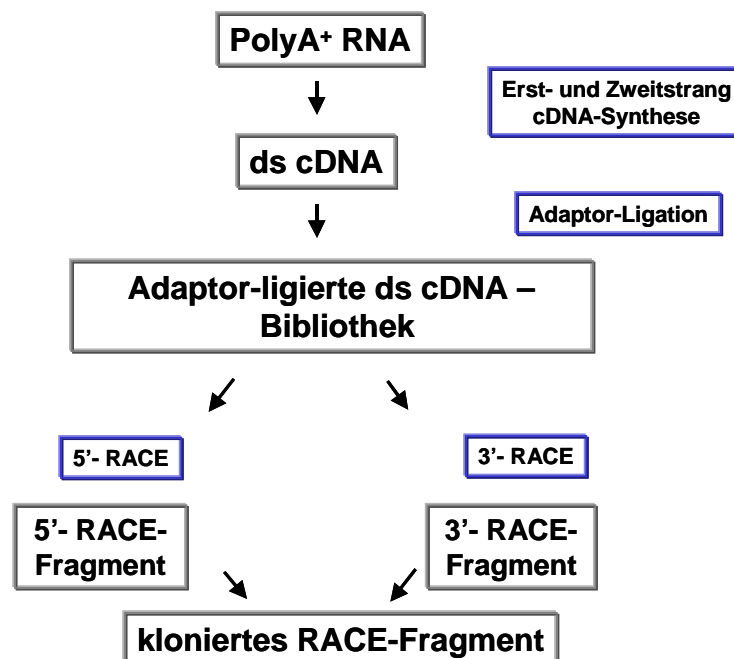


Abb. 9

Schematische Darstellung der RACE-Methode

Hierbei handelt es sich um die bekannte Basensequenz eines Oligonukleotids von 23-28 bp Länge, welches kompatibel ist mit den im *Marathon™ cDNA Amplification Kit* verwendeten Adaptor-Primern, die während der RACE-Methode zum Einsatz kommen. Zu Zwecken

dieser Arbeit wurde die RACE-Methode mit einer *Marathon-Adaptor-ligierten* Milz-cDNA-Bibliothek durchgeführt. Diese war bereits im Rahmen anderer Forschungsprojekte unserer Arbeitsgruppe hergestellt worden und mußte daher für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit nicht mehr eigens synthetisiert werden. Im Folgenden soll das Prinzip der RACE-Methode kurz erläutert werden (Abb. 10): Je nachdem, ob das 3'- oder 5'- Ende eines gegebenen cDNA-Fragmentes fehlt oder interessiert, wird ein genspezifischer Primer (GSP) in Richtung des fehlenden 3'- oder 5'- Endes hergestellt. Der GSP sollte folgende Anforderungen erfüllen:

- Länge: 23-28 Nukleotide
- Mindestgehalt der Basen Guanin **G** und Cytosin **C**: 50-70%
- Schmelztemperatur: mindestens 60°C (bei Möglichkeit 70°C oder höher)
- Keine Komplementarität zum Marathon-Adaptor-Primer 1
- Der Primer sollte keine Schnittstellen für Restriktionsenzyme im Bereich seines 5'-Endes haben

Der GSP wird zusammen mit dem cDNA-Fragment und dem *Adaptor-Primer 1* (AP1) sowie den weiteren erforderlichen Komponenten einer PCR (Kap. 3.1.6) zu einem PCR-Ansatz vermischt. Der AP1 ist komplementär zu einem Sequenzabschnitt des *Marathon-cDNA-Adaptors* am 3'- oder 5'- Endes eines cDNA-Klones, so daß mittels PCR die unbekannte, fehlende Sequenz zwischen dem GSP und der bekannten Sequenz des *Marathon-cDNA-Adaptors* am 3'- oder 5'- Ende des cDNA-Klones amplifiziert wird. Der *Marathon-Adaptor-ligierten* cDNA fehlt dabei eine Bindungsstelle für den AP1. Diese wird erst in der ersten Amplifikationsrunde durch Extension des GSP gebildet und steht ab dann für die folgenden PCR-Zyklen zur Verfügung. Dadurch wird der Anteil unspezifischer PCR-Produkte deutlich reduziert, da eine AP1-Bindungsstelle nur gebildet werden kann, wenn in der Population der cDNA-Moleküle eine Bindungsstelle für den GSP vorhanden ist.

Um im nicht seltenen Falle mehrerer verschieden großer Amplifikate unspezifische PCR-Produkte herauszuselektieren, wird eine zweite sog. „*nested*“-PCR zur Reamplifikation des primären PCR-Produktes angesetzt. Diese verwendet einen sog. „*nested*“ GSP und den Adaptor-Primer 2 (AP2), die so konstruiert sind, daß sie zu Sequenzen komplementär sind, die in Bezug auf die Ausgangssequenz des cDNA-Fragments bzw. die Sequenz des *Marathon-cDNA-Adaptors* weiter innen liegen als der GSP bzw. AP1 (Abb. 10). Es können somit nur spezifische Sequenzen der ersten PCR amplifiziert werden. Für die Synthese des „*nested*“ GSP gelten prinzipiell dieselben Anforderungen wie für den GSP, wobei darauf geachtet werden sollte, daß der „*nested*“ GSP keine Sequenzen aufweist, die mit dem weiter außen positionierten GSP hybridisieren können.

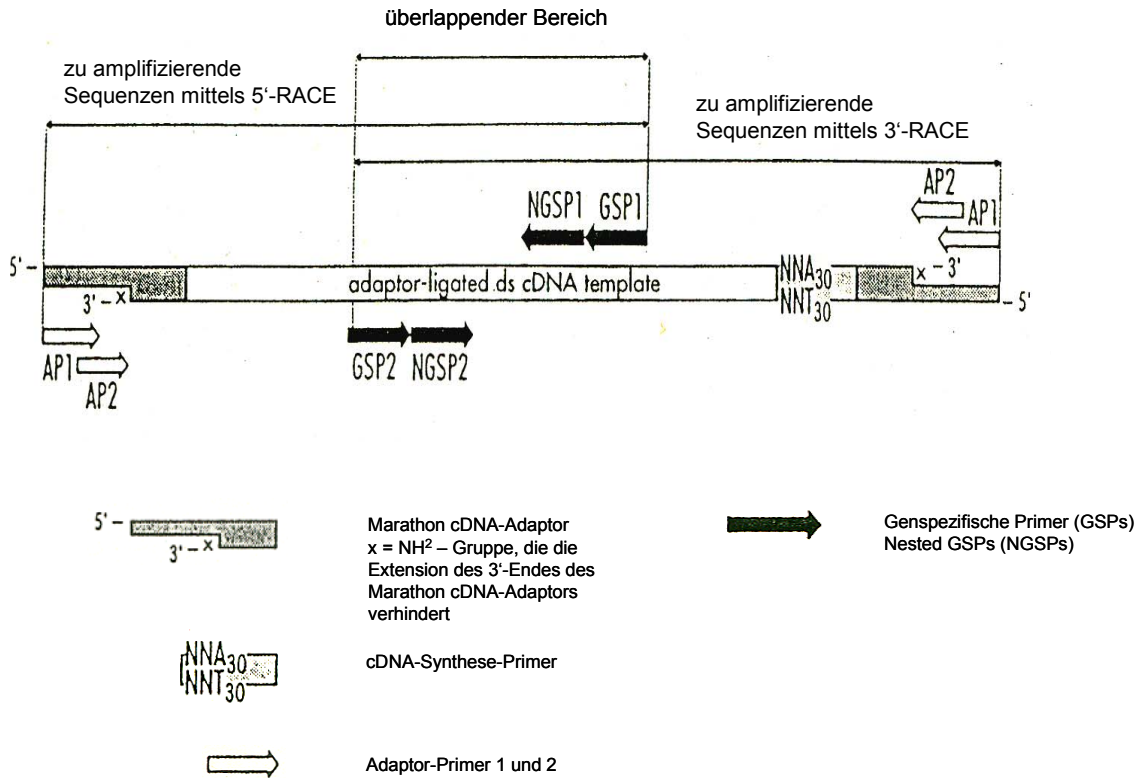


Abb. 10

Schematische Darstellung von Primern und cDNA-Matrize bei der RACE-Methode

Für diese Arbeit wurde sowohl 5'- als auch 3'- RACE mit einer nach dem Protokoll des *Marathon™ cDNA Amplification Kit* (Clontech, Heidelberg) hergestellten *Adaptor-ligierten* Milz-cDNA-Bibliothek durchgeführt. Dabei wurde nach den oben gemachten Angaben analog des Protokolls des *Marathon™ cDNA Amplification Kit* (Clontech, Heidelberg) vorgegangen. Es wurde dazu jeweils eine *touchdown*-PCR mit drei Verdünnungen (1:5, 1:50, 1:250) der *Adaptor-ligierten* Milz-cDNA-Bibliothek und bei 5'-RACE unter Einsatz des Adaptor Primer 1 (AP1) und des genspezifischen Primer GSP1 bzw. „F6RAOU“ für die primäre PCR bzw. des AP2 und des „nested“ GSP bzw. NGSP1 „F6RANE“ für die „nested“ PCR angesetzt. Bei 3'-RACE wurden die Primer AP1 und GSP2 bzw. AP2 und NGSP2 für die primäre bzw. „nested“ PCR-Reaktion verwendet. Unter *touchdown*-PCR wird dabei eine Technik verstanden, die für die initialen Amplifikationsrunden eine höhere Temperatur für Hybridisierung der Primer und ihrer Extension einsetzt als sie der T_m des AP1 entspricht. Es können somit während der initialen Amplifikationsrunden nur genspezifische Sequenzen amplifiziert werden, was wie das Fehlen einer AP1-Bindungsstelle (siehe oben) die Synthese unspezifischer Sequenzen reduzieren soll.

5'-RACE: Die Sequenz des verwendeten AP1 war 5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3'. Die Sequenz von F6RAOU war 5'-GGCACGGCCTGTCTGCAGCGACCTC-3'. Der genspezifische Primer F6RAOU hatte einen G/C-Gehalt von 72% und eine T_m von 73°C gemäß des Prinzips der *touchdown*-PCR. Der PCR-Reaktionsansatz enthielt 0.2 mM dNTP, jeweils 0.2µM der Primer AP1 und F6RAOU, 5µl *Pfu*-Puffer sowie 1.5µl *Pfu*-Polymerase in einem totalen Volumen von 50µl. Die Zykluseinstellungen für die *touchdown*-PCR waren: 94°C (1 Minute)→ 5 Zyklen mit 94°C (1 Minute), 75°C für 2.5 Minuten→ 5 Zyklen mit 94°C (1 Minute), 72°C für 2.5 Minuten→ 5 Zyklen mit 94°C (1 Minute), 70°C für 2.5 Minuten→ 20 Zyklen mit 94°C (1 Minute), 68°C für 2.5 Minuten→ 68°C (10 Minuten). Mit verschiedenen Verdünnungen der PCR-Produkte wurde anschließend eine „*nested*“ PCR zu exakt gleichen Bedingungen unter Verwendung der „*nested*“ Primer AP2 und F6RANE in einem Reaktionsvolumen von 30µl durchgeführt: AP2 war der „*nested*“ Primer für den cDNA-Adaptor und hatte die Sequenz 5'-ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3'. Der „*nested*“ GSP F6RANE hatte die Sequenz 5'-GAGGATTTGGAGGCGGTTGGCAGGGGC-3' (G/C-Gehalt: 67%; T_m : 73°C).

3'-RACE: Die Sequenz von GSP2 war 5'-GGCCTGGCCCCTGCCAACCGCCTCCAAA-3'. Der GSP2 hatte einen G/C-Gehalt von 71% und eine T_m von 75°C. Der NGSP2 hatte die Sequenz 5'-TCACGGACGTCGCTGCAGACAGGCCGTG-3' mit einem G/C-Gehalt von 68% und einer T_m von 74°C. Die Primer AP1 und AP2 sowie alle weiteren Komponenten und die Zykluseinstellungen für die *touchdown*-PCR entsprachen den zu 5'-RACE gemachten Angaben.

Zur Überprüfung der Effektivität und Funktionalität des *MarathonTM cDNA Amplification Kit* (Clontech, Heidelberg) wurde zusätzlich jeweils eine Kontroll-RACE-Reaktion mit den Positiv-Kontroll-Primern für das GP3PDH-Gen mitgemacht. Der 5'-RACE-GP3PDG-Primer hatte die Sequenz 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'. Die Sequenz des 3'-RACE-GP3PDG-Primer lautete: 5'-GACCACAGTCCATGACATCACT-3'.

Um die RACE-PCR-Produkte endgültig bezüglich Spezifität analysieren und sequenzieren zu können, wurden die „*nested*“-PCR-Produkte (Kap. 3.2; Kap. 3.3.2) anschließend nach Anleitung des *TOPO TA Cloning-Protokolls, Version H* (Invitrogen, Groningen, Holland) in den Vektor pCR 2.1-TOPO kloniert. Ungefähr je 15 ng der *nested* PCR-Produkte wurden dazu mit je 50 ng des Vektors pCR 2.1-TOPO vermischt und die Ligation nach 5 Minuten durch Zugabe von 2µl *6X TOPO Cloning Stop Solution* und Mixen für 10 Sekunden bei Raumtemperatur gestoppt. Mit jeweils 2µl der Ligationsansätze wurden anschließend je 50µl TOP10F'-Zellen, die zuvor mit je 2 µl 0.5 M β-Mercaptoethanol versetzt worden waren, transformiert. Nach 30-minütiger Inkubation der Zellen bei 37°C wurden die Zellen für 30 Sekunden bei 42°C hitzeschockiert und dann sofort auf Eis gesetzt. Zu jedem *tube* wurden daraufhin 250 µl SOC-Medium zugegeben. Nach 30 Minuten Inkubation in einem Schüttler

bei 225 rpm und 37°C wurden je 50µl der Transformationen auf bei 37°C vorgewärmten LB-Platten, die Ampicillin (50µg/ml), X-GAL und IPTG enthielten, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Je mehrere weiße oder leicht blaue Klone wurden schließlich ausgewählt und restriktionsanalytisch auf die Insertion der PCR-Produkte überprüft sowie sequenziert.

3.1.10 Northern Blot

Der Northern Blot ist eine Methode, die zur Bestimmung der Größe und Menge eines spezifischen mRNA-Moleküls aus einer Population einer totalen oder poly(A)⁺ - RNA - Präparation entwickelt wurde. Die RNA wird dabei zunächst mittels eines denaturierenden Agarose-Gels ihrer Größe nach aufgetrennt und auf ein solides Trägermaterial wie beispielsweise einen Nitrocellulose-Filter oder eine Glas- oder Nylon-Membran transferiert. Nach Inkubation des die transferierte RNA tragenden soliden Trägermaterials mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde, kann die interessierende RNA nach Hybridisierung mit der Sonde und Exposition des Trägermaterials zu einem radiosensitiven Film durch Autoradiographie visualisiert werden (Sambrook *et al.*, 1989).

Mit dem *Human MTNTM Blot II* (Clontech, Heidelberg) stand eine vorgefertigte kommerziell erwerbbar Nylon-Membran zur Verfügung, auf der ungefähr 2 µg poly A⁺ - RNA von jeweils acht verschiedenen menschlichen Geweben fixiert sind und die unmittelbar zur Hybridisierungsreaktion mit einer radioaktiv markierten Sonde benutzt werden konnte. Die Präparation der für diese Arbeit benötigten radioaktiv markierten DNA-Sonde wurde nach Anleitung des *Prime-ITTM Random Primer Kit II* (Stratagene, Heidelberg) durchgeführt. Ein 396 bp langes DNA-Fragment diente als DNA-Matrize für die Synthese der markierten Sonde. Als Radionuklid wurde [α -³²P]dATP (3000 Ci/mmol) verwendet. Für die Hybridisierungsreaktion wurde die ExpressHyb Hybridization Solution (Clontech, Heidelberg) benutzt und bei den einzelnen Reaktionsschritten dem Protokoll des Herstellers gefolgt.

3.2 Arbeiten mit dem Bakterium *Escherichia coli*

3.2.1 Kulturmedien

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium) (flüssig)

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium) (fest): zur Präparation von Festkultur-Platten = Agarplatten

Die Medien wurden nach den in Kap. 2.12 gemachten Angaben angesetzt, auf einen pH-Wert von 7.0 eingestellt und anschließend autoklaviert.

3.2.2 Hitzeschock-Transformation

Transformation von Bakterien ist definiert als die Veränderung der genetischen Eigenschaften einer Bakterienzelle durch Aufnahme von DNA aus anderen Bakterien der gleichen Art. Etwas modifiziert versteht man in der Gentechnik darunter das gezielte Einbringen von DNA - eingebaut in ein als Vektor dienendes Plasmid - in Bakterien, was als essentielle gentechnische Methode heutzutage nicht mehr wegzudenken ist. Die Fähigkeit der zu transformierenden Bakterien, DNA aufzunehmen, wird dabei zuvor durch Anwendung eines chemischen oder physikalischen Reizes erhöht. Solchermaßen behandelte Bakterien bezeichnet man dann als kompetent. Bei der Hitzeschock-Transformation wird ein physikalischer Reiz durch eine kurzfristige, schockartige Erwärmung der Bakterien angewandt. Zur Selektion der transformierten Bakterien wird dem Kulturmedium das Antibiotikum Ampicillin (50 µg/ml) oder Kanamycin (10 µg/ml) zugesetzt - je nachdem, welches Resistenzgen das eingesetzte Plasmid trägt -, so daß sich nur diejenigen Bakterien vermehren können, die die Plasmid-DNA aufgenommen haben.

Der *Escherichia coli*-Stamm DH5α ist für die Hitzeschock-Transformation gut geeignet. Für die Transformation wurden 50 µl kompetente Bakterien (DH5α) auf Eis aufgetaut und jeweils mit 5 µl eines frischen Ligationsansatzes oder 1 µl Plasmid-DNA, die schon einmal aus einer Bakterienkultur aufgereinigt worden war (Kap. 3.1.7), vermischt und anschließend für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien für 20 sec bei 37°C einem Hitzeschock ausgesetzt und wieder für zwei Minuten auf Eis gekühlt. Es wurden dann 950 µl LB-Medium *ohne* Antibiotikum zugegeben und die Bakterien bei 37°C schüttelnd (225 rpm) für eine Stunde inkubiert und vermehrt. Im Anschluß wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten *mit* Zusatz des entsprechenden Antibiotikums über Nacht (12-16 h) bei 37°C inkubiert, was bei einer funktionierenden Transformation zur Ausbildung einer Vielzahl von Einzelkolonien führte, deren jeweils 10^6 - 10^7 Bakterien genetisch identisch waren und allesamt die transformierte Plasmid-DNA enthielten.

3.2.3 Induktion von rekombinantem GST-Fusionsprotein in *E. coli*

Ein rekombinantes GST-Fusionsprotein ist ein Protein, bestehend aus dem Protein

Glutathion-S-Transferase (GST) gekoppelt an ein von einer interessierenden cDNA kodiertes Protein. Dies wird erreicht, indem die cDNA beider Proteine Teil eines Vektorplasmids ist, wobei das GST-Gen als fester Bestandteil in den Vektor integriert ist, gefolgt von einer Multiklonierungsstelle (MKS), die die Subklonierung der interessierenden zur Expression zu bringenden cDNA im passenden Leserahmen ermöglicht. Um die Expression des GST-Fusionsproteins steuern bzw induzieren zu können, ist das Vektorplasmid zusätzlich mit einem induzierbaren *lacZ*-Operon ausgerüstet, das dem GST-Gen direkt vorgeschaltet ist. Durch Zugabe des Induktors *Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid* (IPTG) läßt sich somit die Expressions des GST-Fusionsproteins auslösen.

Für Zwecke dieser Arbeit wurde die cDNA des gewünschten Proteins in die GST-Expressionsvektoren pGEX-4T-3 oder pGEX-KG subkloniert und damit anschließend der *Escherichia coli* - Stamm DH5α transformiert. Der daraus hervorgehende Klon wurde zu einer 5 ml LB-(+ Amp) Flüssigkultur angesetzt und über Nacht bei 37°C schüttelnd (225 rpm) inkubiert. Diese Übernacht-Vorkultur wurde dann mit LB -(+Amp) Medium im Verhältnis 1:10 zur Proteininduktionskultur verdünnt (das Volumen der Proteininduktionskultur betrug üblicherweise 100 ml) und bis zu einer $OD_{600nm} = 0.5 - 0.7$ bei 37°C geschüttelt. In dieser Situation befinden sich die Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase, so daß die Zugabe des Induktors IPTG in einer Endkonzentration von 0.4 mM in dieser Phase eine effektive GST-Fusionsprotein-Translation erwarten läßt. Nach einer Induktionsdauer von zwei Stunden wurden die Bakterien bei 5000 rpm für 10 min abzentrifugiert und das Pellet in NETN-Puffer resuspendiert (dabei wurde das Äquivalent von 10-100 ml Bakterienlösung in 1 ml NETN-Puffer aufgenommen) und Aliquots zu je 1 ml bei -80°C gelagert.

3.2.4 Isolierung von rekombinantem Fusionsprotein aus *E. coli*

Aliquots der in NETN-Puffer aufgenommenen Bakterienpellets wurden auf Eis aufgetaut und zum Aufbrechen der Zellmembran mit Lysozym in einer Endkonzentration von 100 µg/ml für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Probe wurde dann zur effizienten Lyse zehn Ultraschallimpulsen (bei 50%iger- Leistung des Ultraschallgerätes) unterworfen und die resultierenden Zelltrümmer anschließend durch Zentrifugation (14000 rpm; 30 min; 4°C) pelletiert. Der Überstand mit der löslichen Proteinfraction wurde aufgehoben und mit 30 µl Glutathion-Sepharose (50%-ige Lösung in PBS) für 30 min bei 4°C auf einem Rollrad inkubiert. Dabei erfolgte die Bindung der Glutathion-S-Transferase im GST-Anteils des Fusionsproteins mit hoher Affinität an ihr Substrat Glutathion als Teil der Glutathion-Sepharose. Der GST-Fusionsprotein-Glutathion-Sepharose-Komplex wurde nun abzentrifugiert (14000 rpm; 2 min; 4°C) und das Präzipitat zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine dreimal mit NETN-Puffer bei 4°C gewaschen und schließlich in 200 µl

NETN-Puffer (mit Zusatz von Benzamidin/PMSF/Proteaseinhibitor-Cocktail) resuspendiert. Aufgereinigtes Sepharose-gebundenes Fusionsprotein konnte jetzt bis zu fünf Tage bei 4°C gelagert werden.

Zur Bestimmung der Menge und Qualität des induzierten Fusionsproteins wurde 1/10 des Aufreinigungsansatzes durch SDS-PAGE (Kap. 3.4.1) aufgetrennt und die Proteinbanden mit Coomassie-Färbelösung (Kap. 3.4.2) analysiert.

3.3 Arbeiten mit eukaryoten Zelllinien

3.3.1 Kultivierung von Zelllinien

Die Suspensionszellen K562, BaF3 und Mo7e wurden in RPMI 1640-Medium mit Zusatz von 2 mM L-Glutamin, 1% antibiotischer-antimykotischer Lösung und 10% FCS kultiviert. Mo7e-Zellen benötigten zum Wachstum zusätzlich 100 U/ml rekombinanten Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden-Faktor (rGM-CSF), BaF3-Zellen Interleukin 3 (IL-3) in einer Konzentration von 0.2 ng/ml. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage im Verhältnis 1:10 gesplittet.

Die adhärennten Zelllinien Cos-1 und 293 wurden in DMEM-Medium mit Zusatz von 2 mM L-Glutamin, 1% antibiotischer-antimykotischer Lösung und 10% FCS kultiviert. Je nach Wachstumsverhalten wurden die Zellen alle 3-4 Tage mit frischem Kulturmedium im Verhältnis 1:5-1:10 verdünnt. Dazu mußten die Zellen mittels einer Trypsin/EDTA-Lösung (Gibco, Eggenstein) vom Boden der Kulturflasche gelöst werden, indem sie zunächst mit steriler PBS-Lösung gewaschen wurden und dann mit der Trypsin-Lösung versetzt und für 2-5 min bei 37°C inkubiert wurden. Die enzymatische Aktivität des Trypsins wurde danach durch Zugabe von FCS-haltigem Medium gestoppt. Anschließend wurden die Zellen zur Entfernung des Trypsins zentrifugiert (1200 rpm; 5 min; RT) und in frischem Kulturmedium im gewünschten Verdünnungsverhältnis resuspendiert.

Alle Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% inkubiert.

3.3.2 Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer (Kammerfaktor = 10⁴) (Reichert, New York, USA) verwendet. Dazu wurden die Zellen in einem kleinen Volumen Kulturmedium aufgenommen und mit einer 0.5%-igen Trypanblaulösung im Verhältnis 1:1 verdünnt und ein kleiner Tropfen davon in die Zählkammer pipettiert. Ausgezählt wurden

jeweils vier Großquadrate. Die Anzahl der Zellen pro ml erhielt man nach Errechnung des Mittelwertes pro Quadrat und Multiplikation dieser Zahl mit dem Kammerfaktor und dem Verdünnungsfaktor 2. Da Trypanblau nur von toten Zellen aufgenommen wird, konnten somit zudem vitale von toten Zellen differenziert werden.

3.3.3 Transiente Transfektion von adhärennten Zellen

Transfektion bezeichnet die Übertragung proteinfreier Plasmid-DNA in eukaryote Zellen. Unterschiedliche Techniken wie die Zellkern-Mikroinjektion oder Calcium-Phosphat-Präzipitation kommen dabei zum Einsatz. Für die transiente Transfektion hat sich die Lipofektion als sehr effiziente und gut reproduzierbare Methode bewährt. Die negativ geladenen DNA-Moleküle werden dabei mit positiv geladenen Lipidmolekülen inkubiert und von diesen umschlossen. Die Aufnahme der DNA in das Zytoplasma wird dann durch die Verschmelzung der DNA-Lipid-Komplexe mit der Zellmembran gewährleistet. Das gleichzeitige Einschleusen mehrerer Plasmid-Konstrukte wird dabei als Kotransfektion bezeichnet.

Empirisch erwiesen sich das GenePorter™ Transfektionsreagenz bei Cos-Zellen, und das liposomale Reagenz DOTAP® bei 293-Zellen als am besten geeignet.

Zum Zeitpunkt der Transfektion sollten die Zellen (Cos-1; 293) eine Konfluenz von 60-80% haben. Die Zellen wurden daher am Vortag auf beschichteten Kulturschalen ausplattiert. Je nach Experiment bzw. erforderlicher Zellzahl wurden dabei auf verschiedenen großen Kulturschalen (\varnothing : 35 mm, 60 mm, 100mm) unterschiedlich viele Zellen ausgesät (\varnothing : 35 mm:~ 1×10^5 , \varnothing : 60 mm:~ 5×10^5 , \varnothing : 100 mm:~ 1×10^6 Zellen). Es soll im Folgenden zunächst für Cos-1- und dann für 293-Zellen eine Transfektion unter Verwendung einer 100 mm-Kulturschale beispielhaft skizziert werden: 12 μ g Plasmid-DNA sowie 60 μ l GenePorter™-Reagenz wurden in 500 μ l serumfreiem DMEM-Medium verdünnt, anschließend gemischt und für 45 min bei RT inkubiert. Danach wurde serumfreies DMEM-Medium bis zu einem Gesamtvolumen von 5 ml zugegeben und das Kulturmedium der zu transfizierenden Zellen durch das verdünnte DNA-GenePorter™-Gemisch ersetzt. Nach fünfstündiger Inkubation bei 37°C wurden weitere 5 ml DMEM-Medium mit Zusatz von 20% FCS zugegeben. Für die Transfektion von 293-Zellen wurden 8-10 μ g Plasmid-DNA bzw. 45 μ l DOTAP® mit jeweils 95 μ l HEPES-Puffer versetzt. Anschließend wurden beide Ansätze vermischt und für 15 min bei RT inkubiert. Danach wurde die DNA-DOTAP®-Mischung zu 6 ml frischem DMEM-Medium zugegeben und zum Ersatz des Kulturmediums der zu transfizierenden Zellen verwendet.

24 h nach Transfektion von Cos-1- und 293-Zellen wurde das Kulturmedium durch frisches DMEM-Medium ausgetauscht und die Zellen für weitere 48 h bebrütet. 72h nach Transfektion wurden die Zellen auf Eis einmal mit eiskaltem PBS mit Zusatz von Vanadat

(1mM) gewaschen und dann abgeerntet. Abschließend wurden die Zellen zentrifugiert (1400 rpm; 4°C; 5 min) und das Pellet zur Analyse der Proteinexpression oder Immunpräzipitation (3.4.5) weiterverarbeitet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Anschluß bei -80°C aufbewahrt.

3.4 Arbeiten mit Proteinen

3.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist ein weithin angewandtes Verfahren zur Auftrennung eines Proteingemisches (Laemmli, 1970). Die Wanderungsgeschwindigkeit von Molekülen im elektrischen Feld wird normalerweise durch ihr Molekulargewicht, ihre Struktur und elektrische Ladung bestimmt. Die Besonderheit der SDS-PAGE liegt in der allein größenabhängigen Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld, vermittelt durch das starke, negativ geladene Detergens SDS. Dieses bewirkt die Denaturierung der Proteine und lagert sich gleichzeitig an die denaturierten Proteine an, wodurch diese eine negative Ladung erhalten. Je nach gewünschtem Auftrennungsbereich der Proteine werden unterschiedliche Polyacrylamidkonzentrationen (7-14%) des Trenngels eingesetzt. Das Sammelgel ist im oberen Abschnitt eines SDS-Polyacrylamidgels lokalisiert. Es hat eine geringe Konzentration (5%) und dient der Ansammlung des Proteingemisches an der oberen Grenze des Trenngels unmittelbar bevor die Proteine beginnen, in das Sammelgel zu wandern.

Zur Durchführung der SDS-PAGE wurde das Gelelektrophorese-System Multigel long G47 der Firma Biometra (Göttingen) mit Trenngelvolumina von 12 ml bzw. Sammelgelvolumina von 4 ml eingesetzt.

Für die Herstellung eines Polyacrylamidgels wurde zunächst das Trenngel in eine aus zwei sauberen Glasplatten (Multigel long, Biometra) zusammengesetzte Gelgieß-Vorrichtung gegossen und mit 500 µl Methanol beschichtet. Nach ca. 20 min war das Gel vollständig polymerisiert und gehärtet, so daß das Methanol durch Abkippen und Absaugen (Filterpapier) entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen werden konnte. Gleichzeitig wurde ein Kamm eingesteckt, der durch Aussparungen im polymerisierten Gel die Geltaschen für die Proteinproben formte. Der Kamm wurde nach Festigung des Sammelgels wieder entfernt. Die Proteinproben wurden mit 2x SDS-Gelladepuffer versetzt, 10 min bei 95°C gekocht, kurz abzentrifugiert und anschließend in die Geltaschen geladen. Die Elektrophorese erfolgte mit SDS-Elektrophorese-Puffer (1x) bei einer Spannung zwischen 25-120 Volt.

Nach dem Gellauf konnte das Gel je nach Fragestellung auf eine PVDF-Membran geblottet oder mit dem Proteinfarbstoff *Coomassie* angefärbt werden. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurde das Gel auf Filterpapier (Whatman-paper) aufgezogen und im Geltrockner bei 80°C für 2 h getrocknet.

3.4.2 Coomassiefärbung von Polyacrylamid-Gelen

Um die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine detektieren zu können, wurde das SDS-Gel im Anschluß an die Elektrophorese in einer Coomassie-Färbelösung enthaltenden Färbeschale für 30 min bei RT inkubiert. Danach wurde das Gel mit Coomassie-Entfärbelösung bei RT gewaschen. Nach 30 min Inkubationsdauer waren bereits größere Proteinmengen ($> 1\mu\text{g}$) zu detektieren, nach 24-stündiger Inkubation konnten dann Proteinmengen im Bereich der Nachweisgrenze der Coomassie-Färbung (100 ng) nachgewiesen werden.

3.4.3 Western Blot

Der Western Blot definiert sich als Transfer von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen von der Gelmatrix auf ein geeignetes solides Trägermaterial mit anschließendem immunchemischem Nachweis der dort fixierten Proteine durch Antigen-spezifische Antikörper (Sambrook *et al.*, 1989).

Als solides Trägermaterial wurde eine PVDF-Membran (Immobilon-P™, Millipore, Eschborn) verwendet. Der Transfer erfolgte elektrophoretisch in einer *Tank-Blot*-Apparatur der Firma Hoefer. Nach Beendigung des Gellaufs wurde der Sammelgelanteil des SDS-Polyacrylamidgels abgetrennt und das Gel dann in einer mit Transferpuffer gefüllten Schale auf eine zuvor mit Methanol angefeuchtete Membran gelegt. Die auf die Größe des Trenngels zurechtgeschnittene Membran wurde anschließend mit dem Gel auf ihrer Oberfläche nach der Art eines „Sandwich“ zwischen jeweils zwei Lagen ebenfalls größenangepaßter Whatman-Filterpapiere gelegt und dieser Komplex dann in ein Plastikgitter eingespannt, welches schließlich zwischen die Elektrodenplatten (Kathode und Anode) der mit 5 Liter Transferpuffer gefüllten *Tank-Blot*-Apparatur gehängt wurde. Es war besonders darauf zu achten, daß sich keine Luftblasen zwischen Gel und Membran befanden. Der Transfer erfolgte bei 1000 mA für 1 bis 3 h in Abhängigkeit von der Größe der zu transferierenden Proteine.

Unmittelbar nach dem Transfer schloß sich die immunchemische Darstellung der transferierten Proteine an. Dazu wurde die PVDF-Membran kurz mit PBS-T-Puffer (PBS + 0.1% Tween 20) gewaschen und dann in Blocking-Puffer (PBS-T-Puffer + 5% Trockenmilchpulver) für 30 min bei 37°C inkubiert. Dieser Schritt diente der Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen, um Hintergrundfärbung zu vermeiden. Da Milch phosphorylierte Proteine enthält wurde der Blocking-Puffer mit 5% BSA statt mit Milchpulver versetzt, falls die Detektion phosphorylierter Proteine Gegenstand der Fragestellung des Experimentes war. Auch für die weiteren Schritte wurde dann BSA anstelle von Milch verwendet. Der Erst-Antikörper, der spezifisch gegen ein Epitop des zu untersuchenden Proteins gerichtet war, wurde nun in einem für jeden verwendeten Antikörper eigens bestimmten Verhältnis in Blocking-Puffer verdünnt und die Membran darin für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C auf einem Schwenker inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal mit PBST für jeweils 10 min gewaschen und dann mit dem Zweitantikörper für 30 min bei RT inkubiert. Der Zweit-Antikörper war mit Peroxidase gekoppelt und richtete sich gegen den F_C-Teil des Erst-Antikörpers und wurde im Verhältnis 1:10000 in Blocking-Puffer verdünnt. Im Anschluß wurde die Membran nochmals dreimal mit PBST jeweils für 10 min bei RT gewaschen. Zur Darstellung der Immunkomplexe wurde die Membran letztlich kurz in einer Lösung des ECL-Systems (Amersham-Buchler) oder des Chemilumineszenz-Systems von Pierce inkubiert und dann in eine Klarsichtfolie eingelegt. Das in den Lösungen enthaltene Substrat wurde durch die an den Zweit-Antikörper gekoppelte Peroxidase umgesetzt und das dabei durch Chemilumineszenz entstehende Signal schließlich auf Hyperfilm-ECL (Amersham, Braunschweig) dokumentiert.

Um die Transfermembran für etwaige weitere Immunmarkierungen nutzen zu können, konnten die Antikörper durch Inkubation der Membran für 30 min bei 65°C in 0.2 M Glycin-/HCl-Lösung (pH 2.5) wieder abgewaschen werden.

3.4.4 Amidoschwarzfärbung von transferierten Proteinen

Nach der immunchemischen Darstellung wurde die Membran für einige Minuten in Amidoschwarzlösung inkubiert und anschließend solange entfärbt, bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Die Proteinbanden konnten zur Dokumentation fotografiert werden.

3.4.5 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation dient der gezielten Isolierung von Proteinen aus einem Zellysat durch spezifische Antikörper. Wird aufgrund einer in vivo-Komplexbildung mit einem anderen

zellulären Protein auch der Interaktionspartner des gezielt präzipitierten Proteins isoliert, so spricht man von einer Koimmunpräzipitation. Die Präzipitation an sich kommt durch die Adsorption der Antigen-Antikörper-Komplexe an Protein A zustande, welches kovalent an Sepharose gekoppelt ist. Aufgrund der hohen Masse der Sepharose-Beads lassen sich die Komplexe schnell pelletieren und vom übrigen Zellysat separieren.

Zunächst wurde das gefrorene Zellpellet zur Lyse mit je nach Pelletgröße 1.5-3 ml Lysispuffer resuspendiert und auf Eis für 20 min inkubiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (20 min; 14000 rpm, 4°C) und der Überstand mit 30 µl Protein-A-Sepharose-Lösung (50% in PBS) versetzt und für 20 min bei 4°C auf dem Rollrad inkubiert. Durch kurze Zentrifugation (2 min; 14000 rpm; 4°C) wurden die Sepharose-Beads dann pelletiert und verworfen. Dadurch sollten unspezifisch an die Protein-A-Sepharose-Beads bindende Proteine aus dem Lysat entfernt werden (*Preclear*). Dieser Schritt wurde dreimal durchgeführt. Danach erfolgte die Inkubation des Zellysats mit 2 µg des spezifischen Antikörpers auf dem Rollrad bei 4°C für 2-4 h oder über Nacht. Parallel wurde ein Kontrollansatz mit der Hälfte des Lysats und unspezifischem Kaninchen-Antiserum mitgeführt. Im Anschluß wurden den Lysaten 30 µl der Protein-A-Sepharose-Lösung zugegeben und eine weitere Inkubation auf dem Rollrad für 1 h bei 4°C angesetzt. Schließlich wurden die an die Sepharose gebundenen Immunkomplexe abzentrifugiert (14000 rpm, 4°C; 1 min), das Pellet dreimal mit 500 µl eiskaltem Lysispuffer gewaschen und dann mit 20 µl Lämmli-Puffer für 10 min bei 95°C gekocht. Dieser Schritt diente der Denaturierung der präzipitierten Proteine und der Lösung ihrer Bindung an die Sepharose-Beads. Die einzelnen Ansätze wurden dann kurz zentrifugiert (14000 rpm; 1 min; 4°C) und die Immunkomplexe anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert.

3.4.6 Bindungsassay mit GST-Fusionsprotein

Der Bindungsassay mit GST-Fusionsprotein und Zellysaten dient dem Nachweis des Bindungsverhaltens von Proteinen. Zunächst wurde das Zellysat mit 30 µl einer Glutathion-Sepharose-Lösung (50% in PBS) für 30 min bei 4°C inkubiert und die Glutathion-Sepharose-Beads anschließend abzentrifugiert und verworfen. Damit sollten unspezifische Bindungen an Sepharose vermieden werden (*Preclear*). Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Im Anschluß folgte der eigentliche Bindungsassay. Dazu wurde das Zellysat mit dem zuvor aufgereinigten GST-Fusionsprotein (Kap. 3.2.3, 3.2.4) bei 4°C für 3 h auf dem Rollrad inkubiert. Ein Kontrollansatz mit einer vergleichbaren Menge an GST wurde mitgeführt. Die Inkubationsansätze wurden anschließend abzentrifugiert (1 min; 4°C; 14000 rpm) und das Pellet dreimal mit Lysispuffer gewaschen. Abschließend wurde das Pellet in 20 µl Lämmli-

Puffer aufgenommen und für 10 min bei 95°C gekocht. Dies diente der Denaturierung der Proteine und der Lösung der GST-Glutathion-Sepharose-Bindung. Die gebundenen Proteine wurden dann nach Auftrennung durch SDS-PAGE im Western-Blot nachgewiesen.

3.4.7 Generierung eines polyklonalen Antikörpers

Ungefähr 9 Milligramm rekombinantes GST-Fusionsprotein - bestehend aus GST und der SH3-Domäne von HEFL - wurden in 4.5 Liter einer Flüssigkultur des Bakterienstamms DH5 α induziert und anschließend aufgereinigt (Kap. 3.2.3, 3.2.4). Nachdem der GST-Fusionsprotein-Glutathion-Sepharose-Komplex abzentrifugiert und drei- bis viermal mit NETN-Puffer gewaschen worden war (Kap. 3.2.4), mußte das GST-Fusionsprotein von den Glutathion-Sepharose-Beads separiert werden. Dazu wurde der Ansatz dreimal mit Elutionspuffer (20 mM Glutathion, 100 mM Tris/HCl [pH 8.0], 120 mM NaCl) für 5-10 min auf dem Rollrad bei 4°C inkubiert und die kompetitiv durch den Überschuß Glutathion im Elutionspuffer aus der GST-Bindung verdrängten Glutathion-Sepharose-Beads jeweils abzentrifugiert (14000 rpm; 2 min; 4°C) und verworfen. Die aus den einzelnen Elutionsrunden erhaltenen Eluate wurden anschließend gepoolt und über Nacht in 5 Litern PBS/Azid unter Verwendung des Dialysesystems *Slide-a-Lyzer* (Pierce, Rockford, USA) dialysiert, um freies, nicht an Glutathion gebundenes GST-Fusionsprotein zu erhalten. Aliquots von dialysiertem GST-Fusionsprotein wurden anschließend an einen kommerziellen Anbieter zur Antikörperproduktion (Davids Biotechnologie, Regensburg, Germany) geschickt, der die dazu weiter erforderlichen Schritte wie Abspaltung des GST-Anteils, Gewinnung von Präimmunserum, Immunisierung und Affinitätsreinigung durchführte. Die Schritte im einzelnen knapp dargestellt waren wie folgt:

1. Thrombinspaltung mit 10 cleavage units per mg protein (23°C für 16 Stunden).
2. Glutathion Entfernung durch Verwendung einer G10 Säule.
3. GST Entfernung mit Glutathion-Sepharose.
4. Aus 3. erhaltenes freies Protein im Durchfluss wurde zur Immunisierung verwendet
5. New Zealand White Kaninchen wurde Preimmunserum entnommen und am gleichen Tag wurde mit der Injektion von Antigen begonnen. Das Antigen wurde 3 x im Abstand von 14 und 21 Tagen injiziert.
6. 10 Tage nach der letzten Injektion wurde das Immunserum gewonnen.
7. Zur Isolierung von spezifisch gebildetem Antikörper aus dem Kaninchen-Immunserum wurde das zur Immunisierung eingesetzte Peptid an aktivierte Matrix gebunden und damit das Immunserum bei Normal-pH = 7.0 mehrmals gewaschen um unspezifisch gebundene Proteine daraus zu entfernen. Anschließend wurde durch pH- „shift“ auf pH = 2.5 die spezifische polyklonalen Antikörper enthaltende affinitätsgereinigte

Fraktion gewonnen.

3.5 Das *Yeast-Two-Hybrid*-System

3.5.1 Funktionsprinzip und Arbeitsschema

Das *Yeast-Two-Hybrid*-System ist eine Methode, die die sehr effiziente Identifizierung und Klonierung von Proteinen erlaubt, die in einem eukaryotischen System miteinander interagieren. Dabei können sowohl Interaktionen zwischen bekannten Proteinen analysiert werden als auch bislang unbekannte Interaktionspartner eines bekannten Proteins aus einer cDNA-Bibliothek isoliert werden.

Eukaryotische Transkriptionsfaktoren konstituieren sich üblicherweise aus zwei Domänen, einer DNA-Bindungs-Domäne, die an Sequenzen im Promotorbereich eines Gens bindet, und einer Transaktivierungs-Domäne, die die RNA-Polymerase II zur Transkription eines Gens aktiviert. Dabei ist die konzertierte Aktion beider Domänen für die Funktion des Transkriptionsfaktors erforderlich. Das Prinzip des *Yeast-Two-Hybrid*-Systems liegt nun in der Aufteilung der beiden Domänen eines Transkriptionsfaktors, von dem die Transkription eines bestimmtem Reportergens abhängt, auf zwei Proteine, die jeweils als Fusionsprotein entweder mit der DNA-bindenden Domäne oder der Transaktivierungs-Domäne fusioniert sind. Im Falle einer Interaktion zweier solcher Fusionsproteine, die in Hefe kotransfiziert wurden, werden die beiden Domänen wieder in räumliche Nähe gebracht und können die Transkription eines Reportergens in Hefe initiieren. In unserer Arbeitsgruppe sollten neue Bindungspartner von Bcr-Abl in einer K562-cDNA-Bibliothek identifiziert werden. Da beim klassischen *Yeast-Two-Hybrid*-System ein Transkriptionsfaktor verwendet wird, der als Monomer an DNA bindet, war allerdings mit diesem System die regelrechte Phosphorylierung von Bcr-Abl nicht gewährleistet, das als Monomer nicht in der Lage ist, sich zu autophosphorylieren. Da Hefen zudem selbst keine Tyrosinkinasen besitzen, wurde eine Modifikation des klassischen *Yeast-Two-Hybrid*-Systems vorgenommen, welche die Dimerisierung und Phosphorylierung von Kinasen auch in Hefen ermöglicht (Weidner *et al.*, 1996). Bei diesem System wurde der dimerisierende, DNA-bindende Transkriptionsfaktor LexA im Hefeexpressionvektor BTM 116 mit Bcr-Abl und die cDNA einer K562-cDNA-Bibliothek mit der Aktivierungsdomäne im Vektor pAKT2 fusioniert. Dadurch wurde eine Dimerisierung und Phosphorylierung des LexA-Bcr-Abl-Fusionsproteins erreicht (Abb. 11).

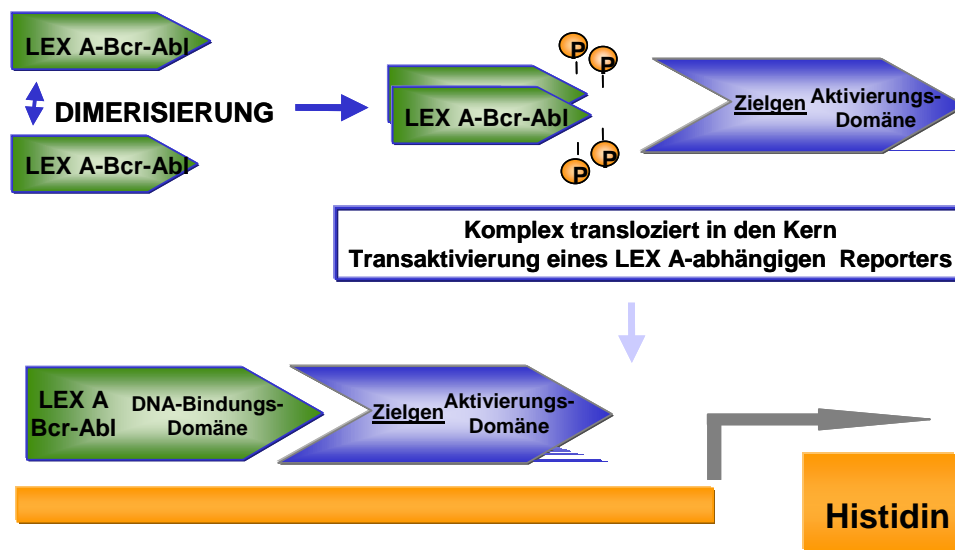


Abb. 11

Schematische Darstellung des modifizierten Yeast-Two-Hybrid-Systems

Die Fusionierung der Tyrosinkinase Bcr-Abl an den dimerisierenden Transkriptionsfaktor Lex A führt zur Dimerisierung und Phosphorylierung von Kinasen auch in Hefen, die selbst keine Tyrosinkinasen besitzen. Dies ermöglicht die Detektion phosphotyrosinabhängiger und phosphotyrosinunabhängiger Interaktionen.

Es wurde der His-Trp-Leu-defiziente Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* L40 mit den integrierten Reportergenen His3 und LacZ verwendet. Da die eingesetzten Vektor-Plasmide pBTM116 und pAKT2 mit der cDNA für Trp bzw. Leu ausgestattet waren, konnte die Effizienz der Kotransfektion beider Konstrukte in Hefen auf Trp-Leu-defizientem Nährboden überprüft werden. Die Hefen wurden dann auf Nährmedium ausgestrichen, dem die Aminosäuren His, Trp und Leu fehlten. Folglich konnten nur die Hefeklonen wachsen, bei denen es zu einer Interaktion zwischen einem Protein der cDNA-Bibliothek und dem Köder-Protein (Bcr-Abl) gekommen war. Die auf den Platten gewachsenen Kolonien konnten zusätzlich durch einen β -Galaktosidase-Assay bestätigt werden.

Die Arbeiten mit dem *Yeast-Two-Hybrid*-System wurden freundlicherweise von T. Jahn und S. Schrem durchgeführt.

3.5.2 Verwendeter Hefestamm, cDNA-Bibliothek und Plasmide

Bcr-Abl^{Sal} wurde in den Vektor pBTM116 subkloniert und war an seinem N-Terminus mit einer LexA-Sequenz fusioniert, um eine bessere Dimerisierung und Autophosphorylierung in Hefen zu erreichen (Weidner *et al.*, 1996). Bcr-Abl^{Sal} ist ein Konstrukt, bei dem die Actin-

bindende Domäne von Bcr-Abl deletiert ist, um Bindungen mit Actin zu vermeiden. Die eingesetzte cDNA-Bibliothek war aus der CML-Zelllinie K562 hergestellt worden und wurde in den Hefektor pAKT2 kloniert (Clontech, Heidelberg). Es wurde der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* L40 verwendet.

3.5.3 Amplifikation der cDNA-Bibliothek

Um eine ausreichende Menge der cDNA-Bibliothek zu erhalten, wurde eine Amplifikation in *E. coli* durchgeführt. Da Plasmide mit längeren cDNA-Inserts bei Vermehrung in flüssigem Medium einen Selektionsnachteil erfahren, wurden die Bakterien auf 80 Platten (15x15 cm) gleichmäßig ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien mit LB(+Amp)-Medium von den Platten abgespült und die DNA präpariert.

3.5.4 Herstellung und Transformation von kompetenten Hefen

Eine einzelne Hefe-Kolonie wurde von einer YPD-Platte (YPD-Medium mit 1.6% „Bacto Agar“ [Difco]) in 20 ml YPD-Medium überführt und bei 30°C über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Die Hefe-Kultur wurde als nächstes auf ein Gesamtvolumen von 300 ml YPD-Medium verdünnt und wieder bei 30°C schüttelnd inkubiert. Bei einer $OD_{600nm} = 0.6$ wurde die Kultur zentrifugiert (2300 rpm; 5 min) und mit H₂O in einem Volumen von 50 ml gewaschen. Das Hefe-Pellet wurde anschließend in 1.5 ml TE/LiAc-Lösung resuspendiert.

In einem Reaktionsgefäß wurden 100 µg Lachssperma-DNA (Sigma) mit 0.1 µg der Plasmid-DNA vermischt. Es wurden dann 0.6 ml PEG/TE/LiAc-Lösung zugegeben und dieser Ansatz bei 100 rpm für 30 min schüttelnd inkubiert. Im Anschluß wurden 70 ml DMSO zugegeben und die Zellen einem Hitzeschock über 15 min bei 42°C ausgesetzt. Danach wurden die Zellen unmittelbar auf Eis gesetzt und kurz (5 sec) bei 10000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 µl H₂O resuspendiert und auf Platten ausgestrichen.

3.5.5 Kotransformation

Die Hefe L40 wurde zunächst mit pBTM116-Bcr-Abl durch Hitzeschock transformiert und auf einer SD-Platte (SD-Medium mit 1.6% „Bacto Agar“) (-Trp) ausgestrichen. Anschließend wurden Einzelklone in 5 ml YPD-Medium vermehrt und nach zwei Verdünnungsschritten in 1000 ml bei 30°C kultiviert. Als nächstes erfolgte eine Kotransformation von 100 µg DNA der cDNA-Bibliothek und 20 mg Lachssperma-DNA. Die Hefen wurden auf 80 Platten (-THULL) (Dropout-Lösung ohne Trp, Leu, Lys, His, Ura mit 1.6% „Bacto Agar“ [Difco]) und einer Platte

(-TL) ausgestrichen und bei 30°C für 3-4 Tage inkubiert. Die Transformationseffizienz wurde anhand des Wachstums auf der -TL-Platte analysiert.

3.5.6 Isolierung von DNA aus Hefen

Die Kolonien auf den Platten (-THULL) wurden in 5 ml Dropout-Lösung (-THULL) über Nacht bei 30 °C inkubiert und anschließend bei 2500 rrpm für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 0.2 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und 0.2 ml Hefe-Lysis-Puffer resuspendiert und dann mit 0.3 g Glass-Beads (Sigma) versetzt. Dieser Ansatz wurde 2 min gevortext und dann zentrifugiert (14000 rpm; 5 min; RT). Anschließend wurde der Überstand mit 0.1 Vol% 3 M NaAc und 2.5 Vol% Ethanol präzipitiert. Nach zwei Waschstritten mit Ethanol (70%ig) wurde das Pellet luftgetrocknet und dann in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

3.5.7 Transformation von DNA in E. coli

40 µl des kompetenten E.coli-Stammes (Hb101, Leu⁻) wurden mit 100 ng Hefe-DNA gemischt und anschließend bei 2500 V, 21 µF und 200µs elektroporiert. Danach wurden 500 µl LB-Medium zugegeben und die Bakterien zweimal mit M9-Lösung gewaschen und anschließend die Bakteriensuspension auf M9-Platten (M9-Lösung mit 1.6% „Bacto Agar“ [Difco]) ausgestrichen und für 2-3Tage bei 37°C inkubiert. Da der verwendete E.coli-Stamm Leucin-defizient ist, konnten die erfolgreich mit dem pAKT2-Vektor transformierten Klone selektiert werden. Diese Einzelklone wurden in einer 5ml-Kultur vermehrt und anschließend die Plasmid-DNA präpariert.

3.5.8 Rücktransformation von DNA in Hefen

Um sicherzugehen, daß die Interaktion zwischen dem Köder-Protein (Bcr-Abl) und dem Protein der cDNA-Bibliothek spezifisch war, wurde eine Kontrolle mit dem Protein *Lamin* durchgeführt. Dazu wurde die präparierte Plasmid-DNA eines interessierenden Klones in Hefe rücktransformiert, die zuvor mit Lamin-Plasmid-DNA transfiziert worden war. Im Falle eines Wachstums der solchermaßen transfizierten Hefe auf einer (-THULL)-Platte, war von einer unspezifischen Interaktion zwischen dem Köder-Protein (Bcr-Abl) und dem Protein der cDNA-Bibliothek auszugehen.

4. Ergebnisse

4.1 Identifikation von F6/HEFL als Interaktionspartner von Bcr-Abl mittels des *Yeast-Two-Hybrid-Systems*

Das modifizierte *Yeast-Two-Hybrid* System ist eine Methode, die sehr effizient die Identifizierung und Klonierung von Proteinen erlaubt, die an phosphorylierte Tyrosinreste von Tyrosinkinase binden (Weidner *et al.*, 1996). Da das Konzept dieses Systems prinzipiell auf der Interaktion von zwei Proteinen beruht und nicht von dem Mechanismus der Interaktion abhängt, ermöglicht es diese Methode selbstverständlich auch, Moleküle zu klonieren, deren Komplexbildung mit Tyrosinkinase nicht an die Phosphorylierung von Tyrosinresten gebunden ist.

	Lamin	Bcr-Abl (WT)	Bcr-Abl (Kin ⁻)
a: Wachstum mit HEFL Keine Selektion für Interaktion	+	+	+
b: Wachstum mit HEFL Selektion für Interaktion	-	+	+

Abb. 12

Die Interaktion von F6/HEFL und Bcr-Abl ist nicht an die Tyrosinkinaseaktivität von Bcr-Abl gebunden

Die obige Tabelle ist eine Zusammenfassung der Hefedaten der Interaktion von HEFL und Bcr-Abl. Bei guter Transfektionseffizienz (reflektiert durch Wachstum auf Agar-Platten ohne die Aminosäuren Trp und Leu, a:) interagierte HEFL sowohl mit Bcr-Abl-Wildtyp (Wt) als auch Bcr-Abl-Kinasedefekt (Kin⁻) (reflektiert durch Wachstum auf Agar, dem neben Trp und Leu auch die Aminosäure His fehlt, Zeile, b:). Keine Interaktion erfolgte mit Lamin, einem unspezifischen Kontrollprotein (b:).

Wie in Kap. 3.5.1 beschrieben, ist es das Ziel unserer Arbeitsgruppe, mit Hilfe dieser modifizierten Hefetechnik neue Interaktionspartner für Bcr-Abl zu identifizieren, die für die

Pathogenese der CML von Bedeutung sind. So ist es auf diese Weise bereits gelungen, neue Adaptormoleküle für Bcr-Abl zu klonieren (Coutinho *et al.*, 2000; Bai *et al.*, 1998).

Durch die Verwendung einer cDNA-Bibliothek aus K562-Zellen wurde der Klon F6/HEFL identifiziert. Die Interaktion mit Bcr-Abl war spezifisch, da F6/HEFL nicht mit Lamin, einem unspezifischen Kontrollprotein, interagiert (Abb.12). Versuche mit einer kinasedefekten Mutante von Bcr-Abl offenbarten zudem, daß die Komplexbildung von F6/HEFL mit Bcr-Abl phosphotyrosinunabhängig war (siehe oben) (Abb. 12).

Nach einer ersten Sequenzierung von 400 Basenpaaren des Klons F6 ergab ein Vergleich mit Sequenzen, die über eine *Blast homology search* in den über NCBI (*National Center of Biotechnological Information*) zugänglichen Genbanken erhalten wurden, schließlich, daß es sich hierbei um eine bisher nicht charakterisierte und neue Proteinsequenz handelte, die im Vergleich mit der SH3-Domäne von HEF1 eine Sequenzhomologie von > 60% aufwies (Abb. 13).

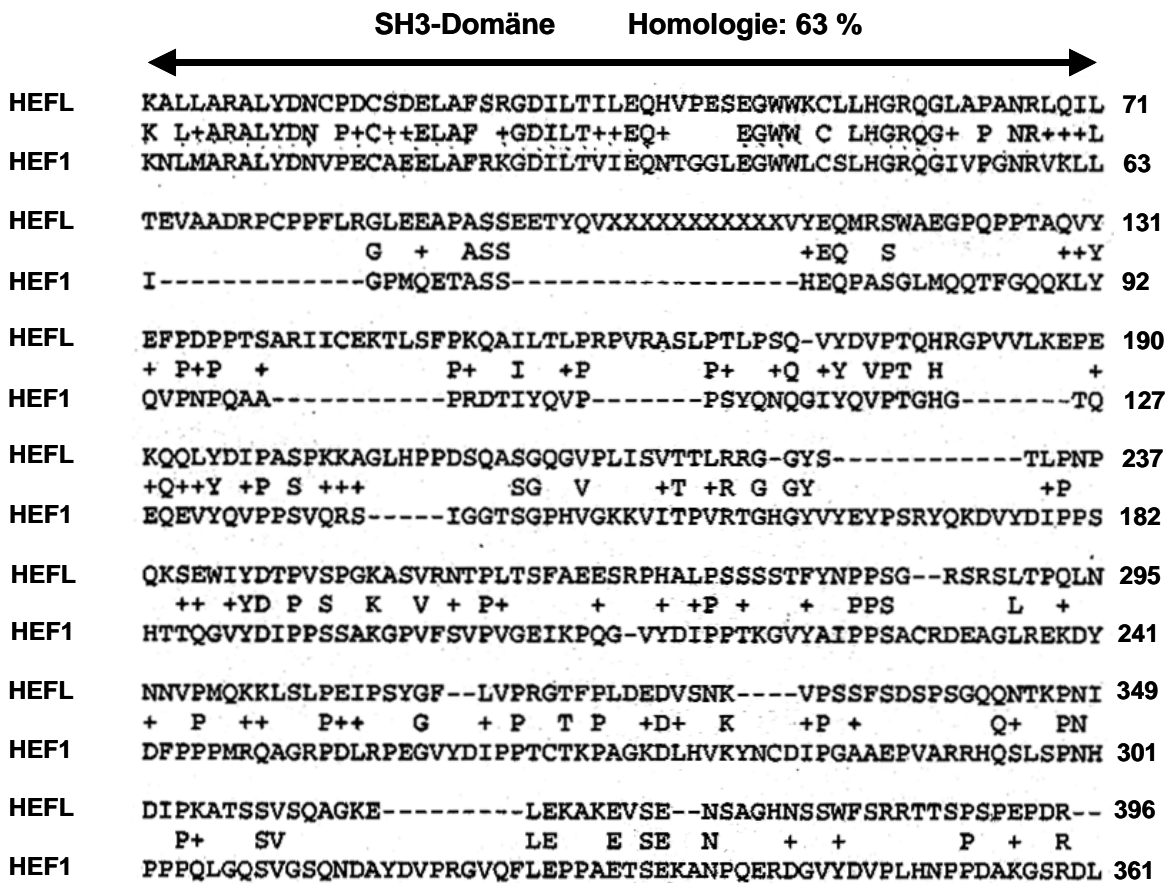


Abb. 13

Vergleich der ersten knapp 400 bp der Sequenz von HEFL mit der Sequenz von HEF1
HEFL kodiert eine SH3-Domäne, die 63% homolog ist zu der SH3-Domäne von HEF1.

Letzteres bildet zusammen mit p130^{Cas} und Efs/Sin eine Familie von „Multidomänen“-Adaptor-Proteinen, denen eine bedeutende Rolle bei der Regulation von Zelladhäsion

zugeschrieben wird (Law *et al.*, 1998). Das Klonieren der kompletten cDNA dieser neuen Proteinsequenz, was als wesentlicher Teil der Aufgabenstellung dieser Arbeit im Anschluß noch im einzelnen geschildert werden wird, erbrachte eine cDNA-Sequenz, die im Abgleich mit den Sequenzen der Cas-Proteine HEF1/Cas-L, p130^{Cas} und Efs/Sin die höchste Homologie wiederum zu HEF1/Cas-L zeigte (Abb. 20 und nicht gezeigte Daten). Das kodierende Gen nannten wir daher HEFL (HEF1-Like).

4.2 Klonierung der kompletten cDNA von F6/HEFL

4.2.1 3'-RACE erbringt das Stop-Codon einer kleineren Spleiß-Variante von HEFL

3'-RACE (siehe Kap. 3.1.9) wurde durchgeführt, um das 3'-Ende von F6 zu bestimmen. Die *Nested-PCR-Reaktion* produzierte drei DNA-Fragmente, welche ca. 1.0 sowie 0.4 und 0.3 Kilo-Basenpaare groß waren (Abb.14).

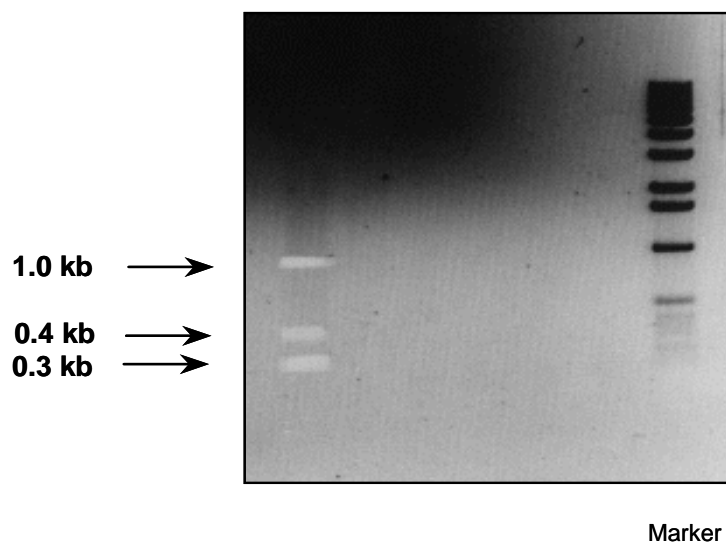


Abb. 14

3'-RACE

RACE wurde durchgeführt unter Verwendung einer Milz - cDNA - Bibliothek und Adaptor - sowie genspezifischen Primern (Kap. 3.1.9). Die hier abgebildete *nested* PCR-Reaktion erbrachte 3 Fragmente, die 1.0, 0.4 und 0.3 kb groß waren. Abb. 14 zeigt ein Foto von dem Gel aus dem diese Fragmente bereits für nachfolgende Analytik mit einem Skalpell ausgeschnitten worden sind. T/A-Klonieren und Sequenzieren ergaben weitere Sequenzen des 3'-Endes von HEFL sowie Sequenzen einer kleineren Spleiß-Variante von HEFL einschließlich des Stop-Codons. Dies zeigte, daß es zwei Spleißvarianten von HEFL gibt.

Die Fragmente wurden dann in einen *T/A-Cloning-Vektor* kloniert und sequenziert. Das Sequenzierergebnis des 1.0 kb großen Fragments erbrachte die uns bereits bekannten 400 sequenzierten Basenpaare sowie nach zusätzlichen 130 Basenpaaren ein Stop-Codon. Die

übrigen Basenpaare des RACE-Produkts waren nicht translatierte Regionen des 3'-Bereichs von F6/HEFL. Bemerkenswert war, daß die letzten 72 Basenpaare (bp 458-530) vor dem Stop-Codon der RACE-Sequenz von der Sequenz des in Hefe identifizierten Klons F6 divergierten. Letztere war wiederum ab bp 458 annähernd 100% identisch zu einem *sequence tag* in der Genbank. Das bedeutete, daß von F6/HEFL als Folge alternativen Spleißens des primären Transkriptes zwei Produkte existieren mußten, wobei wir durch 3'-RACE das Stop-Codon der kleineren Variante bestimmt hatten (Abb. 15 b, c). Die zugehörige mRNA hat eine Größe von ungefähr 3 kb (siehe Kap. 4.3.1). Die 0.4 kb- und 0.3 kb-Fragmente erbrachten keine weiteren Informationen.

4.2.2 Sequenzanalytik des 3'-Endes des ursprünglich in Hefe identifizierten Klons F6/HEFL erbringt das Stop-Codon der größeren Spleißvariante von HEFL

Nachdem in einzelnen Schritten 3006 Basenpaare des in Hefe identifizierten Klons F6 in Richtung des 3'-Endes sequenziert waren, fand sich bei Base 2354 das Thymidin eines TGA-Stop-Codons.

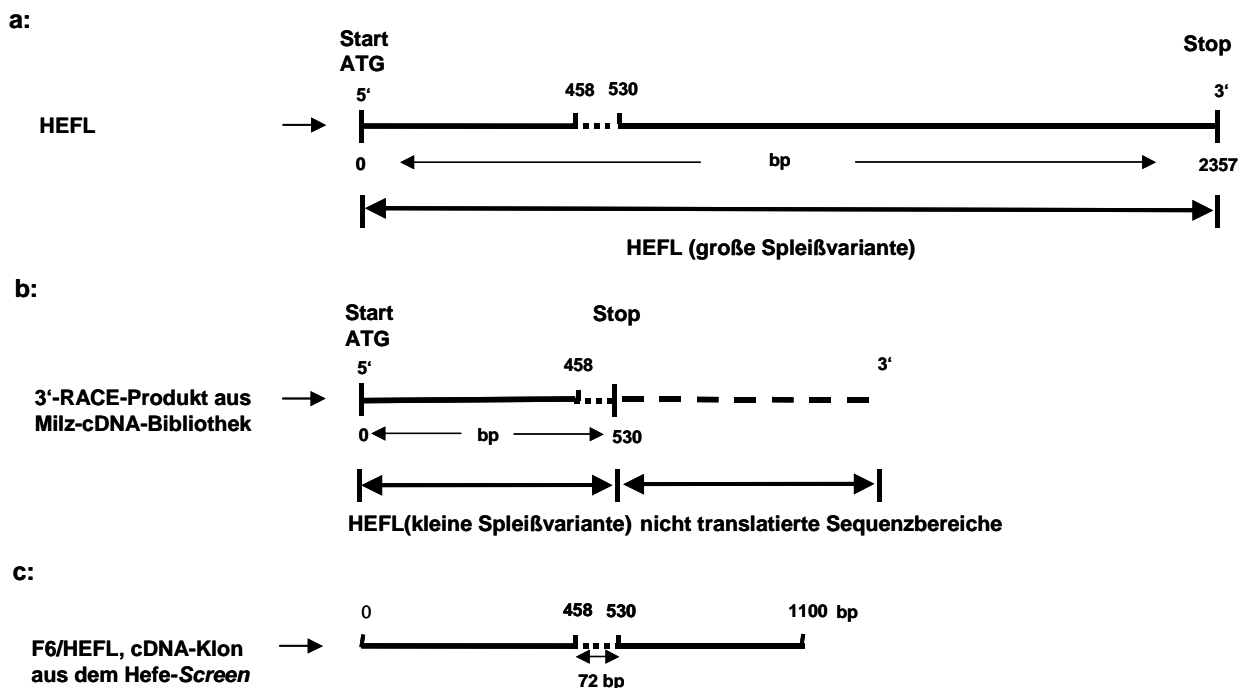


Abb. 15

Schematische Darstellung der DNA-Sequenz der beiden Spleißvarianten von HEFL

- a: Darstellung der kompletten cDNA von HEFL. Der 5'-Anfang des Gens wurde mithilfe von 5'-RACE definiert. Das 3'-Ende des Gens wurde durch schrittweise Sequenzanalytik des ursprünglich in Hefe identifizierten Klons F6 bestimmt.
- b: Schematische Darstellung der kleineren Spleißvariante von HEFL. Der 5'-Anfang wurde mithilfe von 5'-RACE (Kap. 4.2.3) definiert. Das 3'-Ende konnte durch 3'-RACE kloniert werden.
- c: ...: Für HEFL und F6/HEFL, cDNA-Klon aus dem Hefe-Screen, identischer Sequenzbereich, der von der Sequenz der kleineren Spleißvariante von HEFL divergiert. Der Sequenzbereich der ersten 458 N-terminalen Basenpaare ist identisch für beide Spleißvarianten von HEFL.

Durch eine Sicherheitssequenzierung in entgegengesetzter Richtung sowie das zahlreiche Auftreten von Stop-Codons in den beiden anderen möglichen Leserahmen über den gesamten Bereich der sequenzierten 3006 Basen, konnte ein Sequenzierfehler ausgeschlossen und das TGA-Triplett der Basenpaare 2354-2356 als authentisches Stop-Codon des kodierenden Bereichs von HEFL verifiziert werden. Damit war das Ende der größeren Spleißvariante des Transkripts des HEFL-Gens gefunden (Abb. 15a).

4.2.3 Bestimmung des Start-Codons von F6/HEFL durch 5'-RACE

5'-RACE, rapid amplification of cDNA ends (siehe Kap. 3.1.9) wurde durchgeführt, um das Start-Codon von HEFL zu identifizieren. Nachdem sich nach der initialen PCR-Reaktion kein Amplifikationsprodukt nachweisen ließ, konnten nach der *nested*-PCR-Reaktion drei Banden von 0,3, 0,4 und 0,8 kb Größe über gelelektrophoretische Analyse aufgetrennt und isoliert werden (Abb. 16).

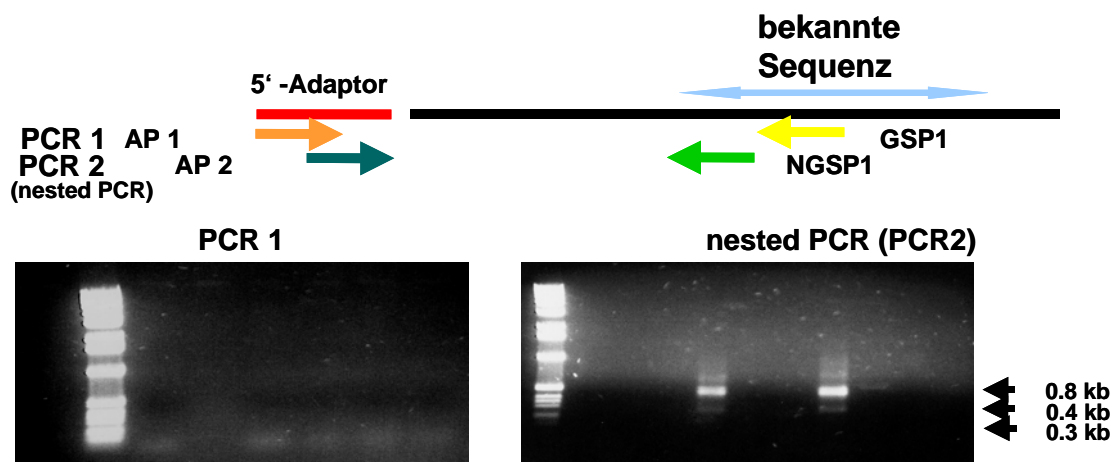


Abb. 16

5'-RACE verifiziert das Start-Codon von HEFL

RACE, rapid amplification of cDNA ends wurde durchgeführt mit einer Milz-cDNA-Bibliothek und dem Adaptor-Primer AP1 sowie dem genspezifischen Primer GSP1. Eine nested PCR-Reaktion mit den Primern AP2 und NGSP1 produzierte drei DNA-Fragmente, die 0,8, 0,4 und 0,3 kb groß waren. T/A-Klonieren und Sequenzieren der Amplifikate erbrachten jeweils ein ATG-Triplett sowie nicht translatierte Bereiche der 5'-Region von HEFL.

Die drei Fragmente wurden zum Sequenzieren in einen *T/A-Klonierungs-Vektor* kloniert (siehe Kap. 3.1.9). Das Sequenzierergebnis ergab für alle drei Amplifikate nicht

translatierte Bereiche der 5'-Region von F6/HEFL sowie ein ATG-Triplett, welches sich in 5'-Richtung unmittelbar an die im Two-Hybrid-System isolierte und die zu HEF1 homologe SH3-Domäne kodierende cDNA-Sequenz von F6/HEFL anschloß. Da sich ferner nur 36 Basenpaare weiter aufwärts ein Stop-Codon gefolgt von weiteren Stop-Codons im gleichen Leserahmen des ATG-Triplets fanden und dieses in einer als sog. Kozak-Sequenz bezeichneten Sequenzumgebung lag (Kozak, 1996), war davon auszugehen, daß es sich um das korrekte Start-Codon für die Initiation der Translation handelte. Dieses ist zugleich das Start-Codon der kleineren Spleißvariante von HEFL (siehe 4.2.1, Abb. 15), denn beide zugehörigen cDNA-Sequenzen differierten erst 458 Basenpaare abwärts des N-Terminus.

4.2.4 HEFL besitzt eine interne Eco-R1-Restriktionsstelle

Basierend auf den unter 4.2.1 geschilderten Ergebnissen ließen sich jetzt anfänglich uneindeutige Resultate von Vergleichen verschieden großer Sequenzbereiche der cDNA des Hefe-Klons F6/HEFL mit Sequenzen, die über eine *blast homology search* in den über NCBI zugänglichen Genbanken erhalten wurden, erklären. So kam es bei *blast homology search* mit einem - bezogen auf die initial zur Homologiesuche eingegebenen 400 Basenpaare von F6/HEFL - um 700 Basenpaare größeren Sequenzbereich von F6/HEFL zu einem Rückgang der Homologien zu über *NCBI blast homology search* erhältlichen Sequenzen auf < 30% (Abb. 17a). Dies war erstaunlich, da der Sequenzabschnitt, der >60% homolog war zu HEF1 - basierend auf der hohen Homologie zur SH3-Domäne von HEF1 (siehe 4.1) - mit in die Analyse eingegangen war. Es wäre daher zu erwarten gewesen, daß der Prozentwert der Homologie gleich bleibt oder sogar steigt. Eine mögliche Erklärung dafür war, daß die durch die weitere Sequenzierung entschlüsselten 700 Basenpaare nicht zu demselben Gen gehörten, welches durch die mittels der ersten Sequenzierung bestimmten 400 Basenpaare repräsentiert wurde. Unterstützt wurde diese Theorie, da im Übergangsbereich der initial sequenzierten 400 Basenpaare zu den anschließend weiter sequenzierten 700 Basenpaaren eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease EcoRI ist. Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß die im *Yeast-Two-Hybrid-System* verwendete K562-cDNA-Bibliothek mit den Restriktionsenzymen XhoI/EcoRI kloniert ist, mußten wir somit in Betracht ziehen, daß diese EcoRI-Schnittstelle nicht zu dem von den ersten 400 Basenpaaren des Klons F6/HEFL kodierten Gen gehörte, sondern Bestandteil des Adaptors der cDNA eines anderen Bibliothek-Proteins war (Abb. 17b). Voraussetzung dafür wäre, daß die Methylierung interner EcoRI-Stellen unzureichend war und folglich entsprechende Stellen nicht vor einer Restriktion durch EcoRI geschützt waren (Clontech, MATCHMAKER Library User Manual [PT1020-1], S. 16).

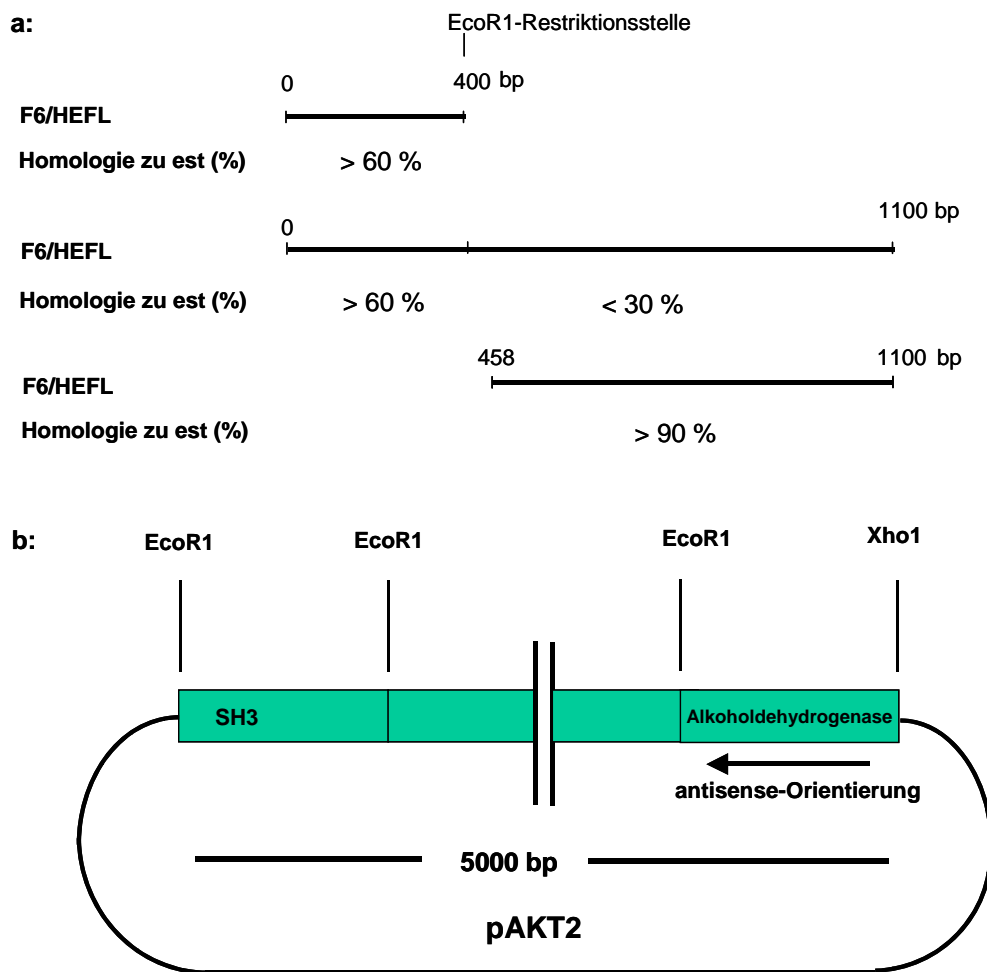


Abb. 17

Schematische Darstellung der Homologiewerte verschieden langer Sequenzanschnitte von F6/HEFL und schematische Darstellung der Klonierung der K562-cDNA-Bibliothek in den Vektor pAKT2

a: bp von F6/HEFL, cDNA-Klon aus dem Hefe-Screen und Angabe der Homologie zu einem expressed sequence tag (est) der NCBI-Genbank in Prozent. Bei *blast homology search* mit einem 400 bp großen Sequenzabschnitt von F6/HEFL fanden sich est mit einer Homologie von > 60 %, basierend auf der hohen Homologie zur SH3-Domäne von HEFL. Bei *blast homology search* mit einem um knapp 700 bp größeren Sequenzabschnitt von F6/HEFL reduzierten sich gefundene Homologien auf Werte < 30 %. *blast homology search* mit einem sich von bp 458 bis 1100 erstreckenden Sequenzabschnitt von F6/HEFL ergab hohe Homologiewerte > 90 %.

b: Die im *yeast two hybrid*-System (siehe Kap. 3.5) verwendete cDNA-Bibliothek wurde mit den Restriktionsenzymen EcoR1 und Xho1 in den Hefevektor pAKT2 kloniert. Der mittels des modifizierten *yeast two hybrid*-Systems identifizierte Klon F6 wies an seinem einem Ende die SH3-Domäne kodierende Sequenz von HEFL auf. Eine Sequenzanalyse des anderen Endes ergab die kodierende Sequenz für Alkoholdehydrogenase in antisense-Orientierung.

Durch Vergleich der durch 3'-RACE erhaltenen Sequenzen (siehe 4.2.1) mit der uns bekannten Sequenz von F6/HEFL ließ sich aber nun bestätigen, daß ein Abschnitt von 182 Basenpaaren vor bis 58 Basenpaare nach der Eco-R1-Restriktionsstelle - ab hier unterschieden sich dann die Sequenzen wieder - identisch war für RACE-Produkt und F6/HEFL (Abb. 15c). Damit war bewiesen, daß die Eco-R1-Restriktionsstelle Teil der Klon

F6/HEFL kodierenden Gensequenz war und nicht Bestandteil des Adaptors der cDNA eines anderen Bibliothek-Proteins bzw. Gens. Durch diesen Nachweis konnte letztlich die eingangs geschilderte Irritation abnehmender Homologiewerte bereinigt werden. Diese war entstanden, als Sequenzvergleiche der unmittelbar nach Durchführung des modifizierten *Yeast-Two-Hybrid-Screens* zur Verfügung stehenden F6/HEFL-cDNA mit Sequenzen der über NCBI zugänglichen Genbanken einen Rückgang der Homologiewerte erbrachten, sobald mehr als 400 bp des Klons F6/HEFL über *blast homology search* eingegeben wurden. Zudem war diese Erkenntnis essentiell für die weitere Strategie der Klonierung der kompletten cDNA von F6/HEFL. So war es nun möglich, das 3'-Ende des in Hefe identifizierten Klons F6/HEFL durch schrittweise Sequenzanalytik des Klons F6/HEFL zu bestimmen (Kap. 4.2.2).

4.3 Charakterisierung von F6/HEFL auf mRNA- und Proteinebene

4.3.1 Ein Northern Blot zeigt eine verstärkte Expression von HEFL in peripheren Blut-Leukozyten und Milz

Ein 396 Basenpaare langes DNA-Fragment von F6/HEFL, welches den die SH3-Domäne kodierenden Abschnitt umspannte, wurde mit [α - 32 P]dCTP markiert und als Sonde für einen Northern Blot (siehe Kap. 3.1.10) verwendet, um das Expressionsmuster von HEFL in verschiedenen menschlichen Geweben zu analysieren. Es konnten dadurch zwei verschieden große, spezifische Transkripte nachgewiesen werden. Zum einen hybridisierte eine mRNA von ca. 5 kb Größe spezifisch mit der radioaktiv markierten DNA-Sonde. Diese mRNA war ubiquitär in verschiedenen Geweben exprimiert wie Kolon, Ovar, Prostata und Thymus. Eine deutlich erhöhte Expression zeigte sich aber in peripheren Blut-Leukozyten und in vergleichsweise dazu etwas geringerem Ausmaß in der Milz. Des weiteren beobachteten wir eine spezifische Hybridisierung der Sonde mit einer ca. 3 kb großen mRNA. Diese wies dasselbe Gewebeexpressionsmuster auf wie die ca. 5 kb große mRNA und entspricht höchst wahrscheinlich der kleineren Transkriptionsvariante, welche aus einem alternativen Spleißvorgang des HEFL-Gens resultiert. Derselbe Blot wurde mit einer radioaktiv mit [α - 32 P]dCTP markierten Sonde spezifisch für β -Actin inkubiert, um die auf dem Northern Blot enthaltene mRNA-Menge der einzelnen Gewebe zu relativieren (Abb. 18).

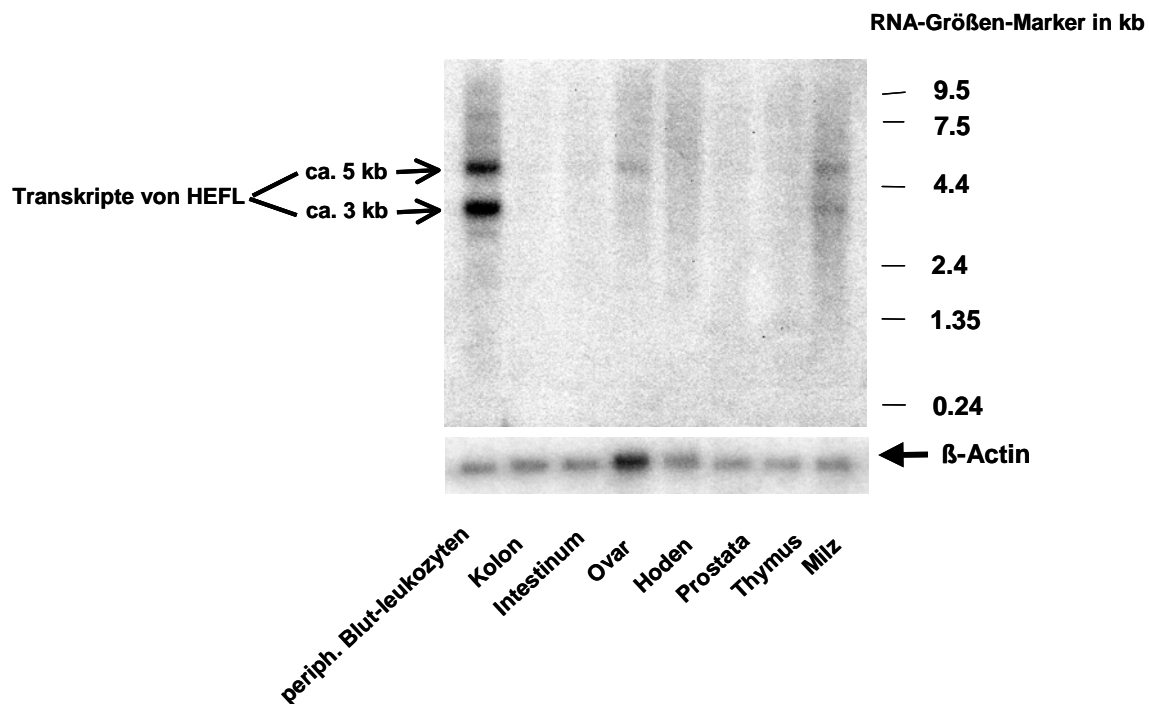


Abb. 18

Ein Northern Blot ergibt zwei Transkripte von HEFL von ca. 3 kb und 5 kb

4.3.2 Aminosäuresequenz und Domänenstruktur des HEFL-Proteins

Nach Identifikation der kompletten cDNA konnte diese mithilfe eines geeigneten Computerprogramms in die Aminosäuresequenz des HEFL-Proteins übersetzt werden. Abb.19 zeigt die Aminosäuresequenz der größeren Spleißvariante von HEFL (die kleinere Spleißvariante wurde in Hinblick auf ihre Aminosäuresequenz nicht untersucht und im Rahmen dieser Arbeit auch nicht weitergehend analysiert). Diese bestand aus 783 Aminosäuren und hatte demnach eine kalkulierte Größe von ca. 100 kD. Nach struktureller Analyse der Aminosäuren-Sequenz konnte die Domänenstruktur von HEFL bestimmt werden.


```

MKG TGIMDCAPKALLARALYDNC PDCSDELA FSRGDILTILEQH VPESEGW WKCLLH
GRQGLAPANRLQILTEVAADR PCPPFLRGL EEAPASSEETYQVPTLPRPPTPGPVYE
QMRSWAEGPQPPTAQVYEFDPPTSARIICEKTL SFPKQAILTLPRPV RASLPTLPS
QVYDVPTQHRGPVVLKEPEKQQLYVIPASPKKAGLHPPDSQASGQVPLISVTTLR
RGGYSTLPNPQKSEWIYDTPVSPGKASVRNTPLPSFASSSRPHALPSSSSTFYNPSS
GRSRSLTPQLNNNVPMQKLSLPEIPSYGFLVPRGTFPLDEDVSNKVPSSFSDSPS
GQNTKPNIDIPKATSSVSQAGKELEKAKEVSENSAGHNSSWFSRRTTSPSPEPDR
LSGSSSDSRASIVSSCSTTSTDDSSSSSSEESAKELSLDL DVAKETVMALQHKVSS
VAGLMFVSRKWRFRDYLEANIDAIHRSTDHIEASVREFLDFARGVHG TACNLTDNL
QNRIRDQMQTISNSYRILLETKESLDNRNWPLEVLTDSVQNSPDDLRFVMVARM L
PEDIKRFASIVIANGRLLFKRNCEKEETVQLTPNAEFKCEKYIQPPQRETESHQKSTP
STKQRREDEHSSSELLKKNRANICGQNPGLIPQPSSQQTPERKPRLSEHCRLYFGALF
KAISAFHGSLSSSQPAEITQSKLVIMCGQKLVDTLCMETQERDVRNEILRGSSHLCS
LLKDVALATKNAVLTYPSAALGHLQAEAEKLEQHTRQFRGTLGOPA

```

Abb. 19

Aminosäuresequenz des größeren Spleißprodukts von HEFL (785 As)

Diese setzte sich aus einer N-terminalen SH3-Domäne, einer Substrat-Bindedomäne, bestehend aus einer prolinreichen Region und einer Region mit mehreren SH2-Bindemotiven, einer serinreichen Region und einer C-terminalen Domäne zusammen. Ein Abgleich der Sequenz von HEFL mit den Sequenzen der Cas-Proteine HEF1/Cas-L, p130^{Cas} und Efs/Sin ergab die höchste Homologie zwischen HEF1/Cas-L und HEFL, was zur anfangs (Kap. 4.1) bereits erwähnten Namensgebung von HEFL (HEF-Like) motivierte.

HEFL	SH3	Substrat-Bindedomäne	Ser-reiche Region	C-termin. Domäne
	⇕	⇕	⇕	⇕
HEF1/Cas-L	SH3	Substrat-Bindedomäne	Ser-reiche Region	C-termin. Domäne
Homologie	63%	15 %	30 %	40 %

Abb. 20

Schematische Darstellung der Domänenstruktur von HEFL und HEF1/Cas-L mit Angabe der Homologiewerte entsprechender Domänen in Prozent

SH3: Src-homologe Domäne 3; Ser: Serin; C-termin. Domäne: Carboxy-terminale Domäne

Die aminoterminalen SH3-Domäne sowie die carboxyterminale Region wiesen dabei eine signifikante Homologie zu entsprechenden Aminosäure-Sequenzabschnitten von HEF1/

Cas-L auf mit einer Identität von 63% bzw. 40% (Abb. 13, 20 und nicht gezeigte Daten). Dies legte die Vermutung nahe, daß HEFL zur Familie der Cas-Proteine gehört, die sich bislang aus HEF1/Cas-L, p130^{Cas} und Efs/Sin zusammensetzt und die als „Multi-Domänen“-Adaptorproteine in die Regulation der Zelladhäsion involviert sind (Law *et al.*, 1998).

Als nächstes konnte nun die cDNA von HEFL in den Expressionsvektor pcDNA3.1/His C subkloniert werden, um mit transienten Expressionsstudien die Interaktion mit Bcr-Abl zu charakterisieren (siehe Kap. 4.5-4.7). Die Sequenz wurde unter der Accession-Nummer AJ276678 GI: 9650710 bei NCBI hinterlegt.

4.3.3 Ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen die SH3-Domäne von HEFL erkennt und präzipitiert ein 105 kD großes Protein

Ein polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen HEFL wurde hergestellt. Dazu wurde ein von den ersten 133 Aminosäuren von HEFL kodiertes GST-Fusionsprotein, welches auch die SH3-Domäne von HEFL umspannte, induziert (siehe Kap. 3.2.3) und nach entsprechender Aufreinigung zur Entfernung des GST-Anteils als immunogenes Agens einem Kaninchen injiziert. Dem folgten fünf weitere *Booster*-Immunisierungen (siehe Kap. 3.4.7). Nach einer Affinitätsreinigung des Kaninchenserums wurde der Kaninchen-Antikörper auf Funktionalität und Spezifität für Western Blot und Immunpräzipitation getestet. Der Antikörper erkannte im Western Blot mit EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) fusioniertes HEFL, welches als Positiv-Kontrolle in Cos1-Zellen überexprimiert worden war.

Die Spezifität war vergleichbar mit dem anti-EGFP-Antikörper (Abb. 21). Darüber hinaus detektierte der Kaninchen-Antikörper denaturiertes endogenes HEFL im Western Blot in einer Vielzahl verschiedener Zelllinien darunter M-07e, Ba/F3, K562 und in Zellen von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (Abb. 22, 23).

Die erkannte Bande war 105 kD groß. Da der Antikörper gegen die SH3-Domäne von HEFL gerichtet war, die eine hohe Homologie zu der SH3-Domäne von HEF1 aufwies, war eine Kreuzreaktion mit HEF1 nicht auszuschließen.

Es wurden daher nachfolgende Studien zur Fragestellung der Spezifität des polyklonalen HEFL-Antikörpers durchgeführt. Dadurch gelang der Nachweis, daß der polyklonale HEFL-Antikörper EYFP-fusioniertes und endogenes HEFL spezifisch erkannte, aber nicht HEF1 (Daten nicht gezeigt; entsprechendes Experiment wurde von G. Bresolin aus unserer Arbeitsgruppe durchgeführt). Der polyklonale Antikörper war auch hervorragend dazu geeignet, EGFP-HEFL aus Cos1-Zellysaten zu präzipitieren (Abb. 24).

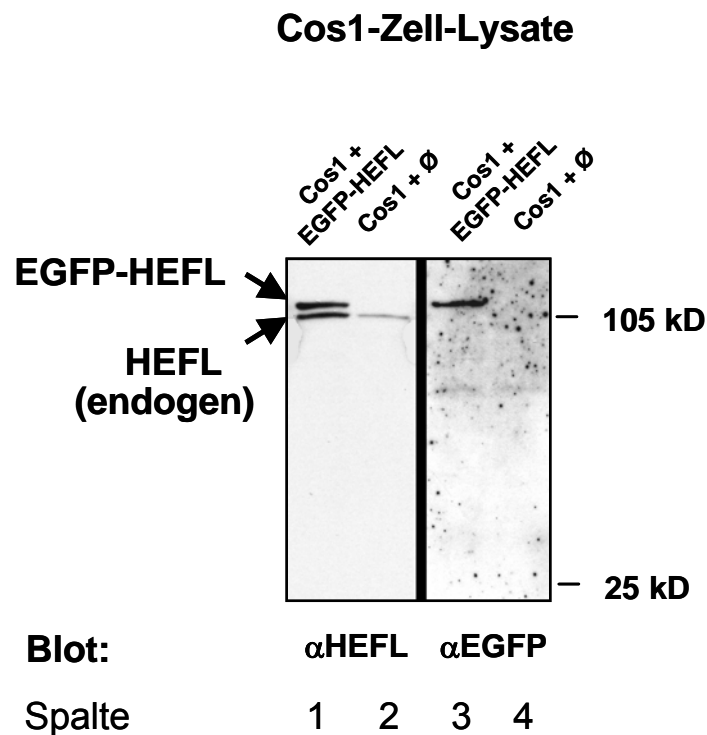


Abb. 21

Ein polyklonaler Kaninchen-HEFL-Antikörper erkennt HEFL im Western Blot

1×10^7 Cos1-Zellen (transient transfiziert mit EGFP (N-terminal) fusioniert an HEFL) wurden lysiert und mit dem polyklonalen Antikörper aus einem affinitätsgereinigten Serum eines immunisierten Kaninchens geblotted (Spalte 1, 2). Die Spezifität war vergleichbar mit einem α -EGFP-Blot (Spalte 3, 4). Endogenes HEFL wandert schneller durch das SDS-Gel (siehe Markierung). Spalten 2 und 4 enthalten nicht transfiziertes Cos1-Lysat.

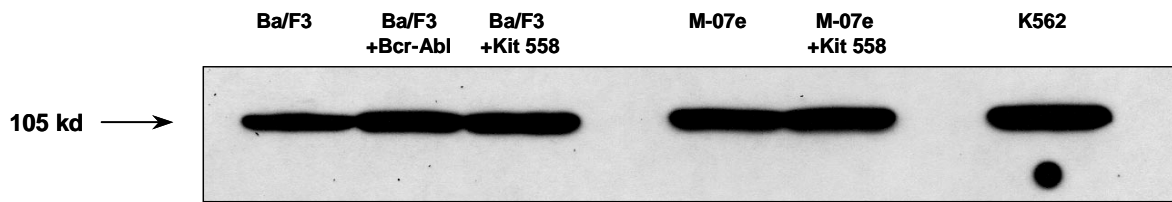


Abb. 22

Der polyklonale Kaninchen-HEFL-Antikörper erkennt HEFL als 105 kd großes Protein im Western Blot verschiedener Zell-Lysate

Jeweils 1.7×10^6 Ba/F3-Zellen, Ba/F3-Zellen +Bcr-Abl (Ba/F3-Zellen, die Bcr-Abl exprimieren), Ba/F3-Zellen + Kit 558 (Ba/F3-Zellen, die die konstitutiv aktive Tyrosinkinase-Mutante von c-Kit exprimieren), M-07e-Zellen, M-07e-Zellen + Kit 558 (M-07e-Zellen, die die konstitutiv aktive Tyrosinkinase-Mutante von c-Kit exprimieren) und K562-Zellen wurden lysiert. Je gleiche Mengen der Lysate wurden durch ein 8%iges SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit dem Kaninchen -HEFL - Antikörper geblotted. Endogenes HEFL ist durch den Pfeil markiert.

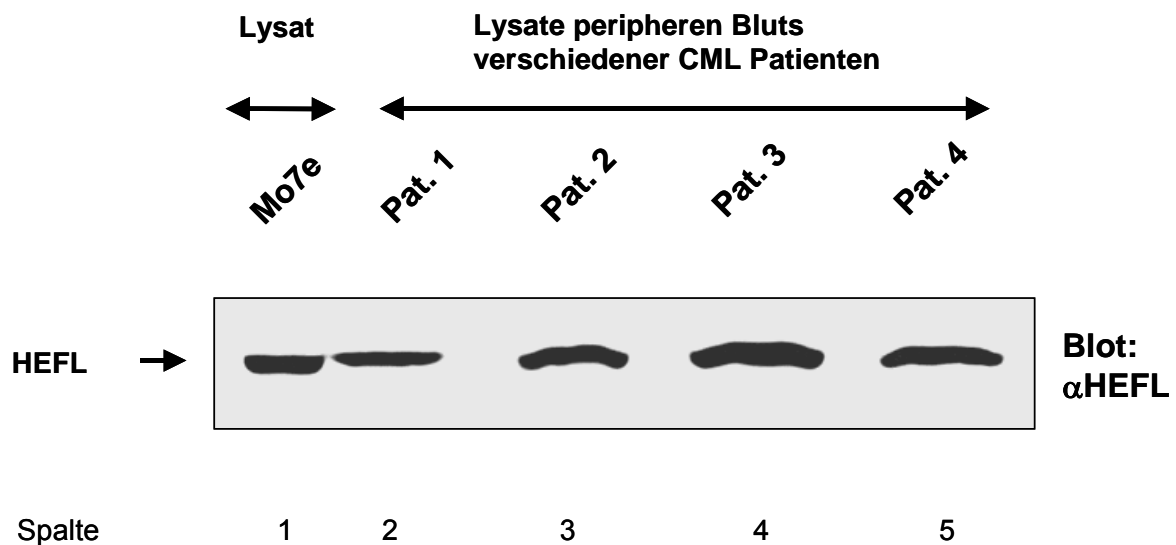


Abb. 23

Der HEFL-Antikörper detektiert HEFL in Zellen von Patienten mit CML

2×10^7 Zellen der Leukämiezelllinie Mo7e und von Patienten mit CML wurden lysiert und die Lysate mittels eines SDS-Gels aufgetrennt (Spalten 1 und 2-5). Anschließend wurde ein Western Blot unter Verwendung des HEFL-Antikörpers durchgeführt.

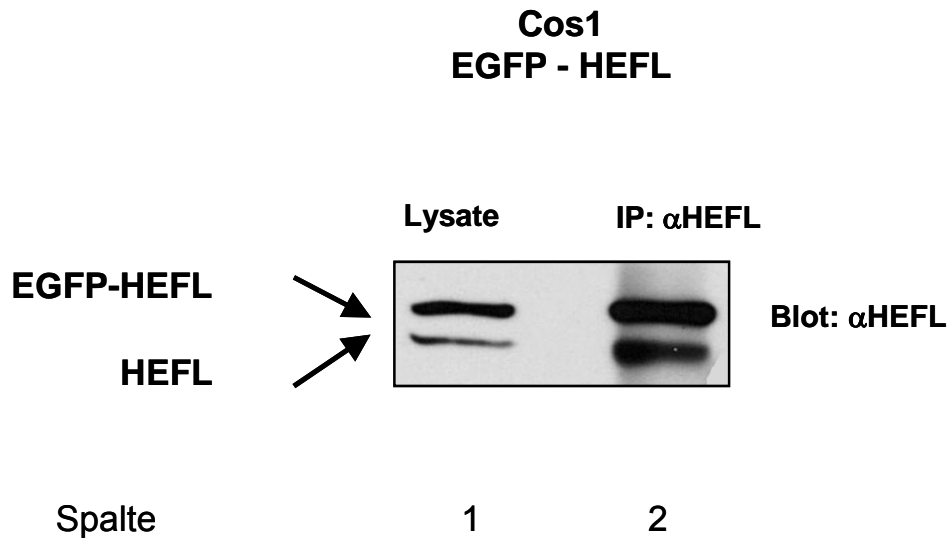


Abb. 24

Der αHEFL-Antikörper präzipitiert HEFL in Cos1-Zellysaten

1×10^7 Cos1-Zellen (transient transfiziert mit (N-terminal) an HEFL fusioniertem EGFP) wurden lysiert und einer αHEFL-Immünpräzipitation unterzogen. Die gebundenen Proteine wurden mittels eines SDS-Gels aufgetrennt und im Western Blot mit dem αHEFL-Antikörper analysiert (Spalte 2). Spalte 1: Cos1-Lysat, welches EGFP-HEFL exprimiert, wurde auf einem SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit dem αHEFL-Antikörper untersucht.

4.4 Untersuchung der Protein-Interaktion zwischen F6/HEFL und Bcr-Abl**4.4.1 F6/HEFL interagiert mit Bcr-Abl im humanen Zellysat (semi-in-vivo)**

Nachdem im Hefesystem die spezifische Interaktion von Bcr-Abl als Köderprotein mit HEFL als Zielprotein einer cDNA-Bibliothek aus K562-Zellen gezeigt worden war, mußte in einem nächsten Schritt überprüft werden, ob sich die in Hefe beobachtete Bindung im humanen Zellsystem (semi-in-vivo) reproduzieren ließ und ob es sich nicht um eine indirekt durch ein Hefeprotein vermittelte Interaktion handelte. Zur genauen Untersuchung dieses Sachverhalts sollten GST-Bindungsexperimente mit Lysaten der humanen Bcr-Abl-exprimierenden CML-Zelllinie K562 durchgeführt werden (siehe Kap. 3.4.6). Dazu wurde der Klon F6/HEFL in den Vektor pGEX-4T-3 subkloniert, um die Expression von GST-Fusionsprotein in Bakterien zu ermöglichen (siehe Kap. 3.2.3). Dann wurden 4×10^7 K562-Zellen lysiert und das Lysat bei 4°C über Nacht mit GST-HEFL und GST alleine inkubiert. Die Lysate wurden dann abzentrifugiert und die GST-Proteine gewaschen, um mögliche unspezifisch gebundene Moleküle zu entfernen. Daraufhin wurden die Proben auf einem 8%igem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt (siehe Kap. 3.4.1) und auf eine PVDF-Membran transferiert. Anschließend wurde ein Western Blot durchgeführt (siehe Kap. 3.4.3), wobei der Maus-Antikörper 8e9 verwendet wurde, der spezifisch die Abl-SH2-Domäne erkennt (McWhirter *et al.*, 1993b). Es

konnte schließlich gezeigt werden, daß sowohl Bcr-Abl aber auch c-Abl mit GST-HEFL interagierten, wobei GST alleine weder mit Bcr-Abl noch mit c-Abl interagierte, was die Spezifität der Bindung zwischen Bcr-Abl/c-Abl und GST-HEFL bewies (Daten nicht gezeigt und Abb. 25).

Ausgehend von der beobachteten Komplexbildung zwischen c-Abl und GST-HEFL, und weil der Klon F6/HEFL für eine SH3-Domäne kodierte, wurde untersucht, ob letztere dazu in der Lage ist, mit c-Abl und entsprechend auch Bcr-Abl zu interagieren. Da SH3-Domänen die Eigenschaft haben, an prolinreiche Sequenzabschnitte wie das Prolin-Motiv im C-Terminus von c-Abl zu binden (Feller *et al.*, 1995; Lowenstein *et al.*, 1992), war es durchaus naheliegend, daß die Interaktion zwischen GST-HEFL und Bcr-Abl und c-Abl auf einem solchen Mechanismus beruhte. Dazu wurde das die HEFLSH3-Domäne kodierende cDNA-Fragment in den GST-Vektor pGEX-KG subkloniert, um ein Ablesen der Sequenz im zugehörigen Leserahmen zu gewährleisten. GST-HEFL-SH3 wurde dann wie für GST-HEFL beschrieben auf seine Fähigkeit getestet, Bcr-Abl und c-Abl in K562-Lysaten zu binden. Als Ergebnis zeigte sich, daß die SH3-Domäne von HEFL ausreichend ist für eine Komplexbildung mit Bcr-Abl und c-Abl, und daß c-Abl mit einer stärkeren Affinität an die HEFL-SH3-Domäne bindet als Bcr-Abl (Abb. 25).

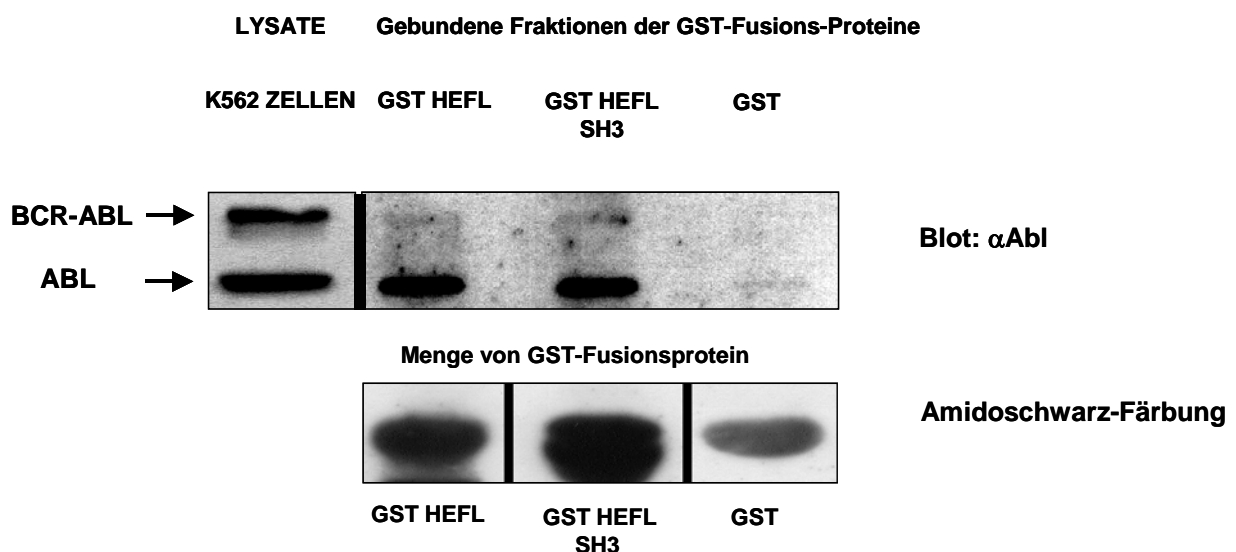


Abb. 25

Die SH3-Domäne von HEFL vermittelt die Bindung an Bcr-Abl und cAbl

1×10^7 K562-Zellen wurden lysiert und die Lysate mit jeweils $5 \mu\text{g}$ GSTHEFL, GSTHEFLSH3 und GST inkubiert. Die gebundenen Fraktionen wurden über ein 8%iges SDS-Gel separiert. Anschließend wurde ein Western Blot mit dem Anti-Abl-Antikörper 8e9 durchgeführt. Die Menge an eingesetztem GST-Protein wurde durch Amidoblack-Färbung der Blotting-Membran sichtbar gemacht.

4.4.2 In-vivo-Koimmunpräzitationsstudie von HEFL mit Bcr-Abl im Cos1-Zellsystem

Die GST-Bindungsstudie im humanen Zellysat hatte die spezifische Interaktion von HEFL mit c-Abl und Bcr-Abl nachgewiesen. Als nächstes mußte nun gezeigt werden, daß die Assoziation von HEFL und Bcr-Abl auch *in-vivo* erfolgt. Vor dem Hintergrund der unter 4.4.1 dargestellten Ergebnisse war zu vermuten, daß die Interaktion von HEFL und Bcr-Abl nicht an dessen Tyrosinkinaseaktivität gebunden war. Daher wurde Bcr-Abl(Kin⁻) - eine kinasedefekte Mutante von Bcr-Abl - im Cos1-Zellsystem auf eine Komplexbildung mit HEFL getestet.

Cos1-Zellen

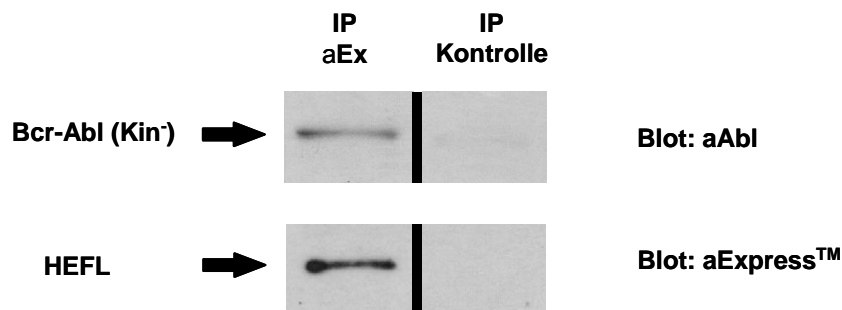


Abb. 26

HEFL interagiert mit Bcr-Abl (Kin⁻) in einem Koimmunpräzipitationsexperiment

1.5 x 10⁶ Cos1-Zellen wurden transient kotransfiziert mit Bcr-Abl (Kin⁻) und HEFL, das im verwendeten Expressionsvektor pcDNA3.1 mit der Express™-Sequenz gekoppelt war. Nach 48 Stunden Inkubation bei 37°C wurden die Zellen abgeerntet, lysiert und mit den Lysaten eine anti-Express™ - Koimmunpräzipitation durchgeführt. Die gebundenen Molekülkomplexe wurden auf einem 9%igen SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot unter Verwendung des Abl-Antikörpers 8e9 und des anti-Express™ - Antikörpers analysiert.

Cos1-Zellen wurden dazu mit HEFL im Expressionsvektor pcDNA3.1/His C und Bcr-Abl (Kin⁻) im Expressionsvektor pcDNA3.1/Zeo (-) transient kotransfiziert und für 48 h kultiviert, um eine ausreichende Expression der Proteine zu ermöglichen. Danach wurden die Zellen abgeerntet und in 1x Lysis-Puffer lysiert. Mit den Lysaten wurde dann unter Verwendung des anti-Express™-Antikörpers ein Koimmunpräzipitationsexperiment (siehe Kap. 3.4.5) durchgeführt, um HEFL, das N-terminal seiner Sequenz mit dem „anti-Xpress™-Antikörper-Epitop“ fusioniert war, und mit ihm interagierende Proteine zu isolieren.

Nach Auftrennung der immunpräzipitierten Komplexe durch SDS-PAGE wurde ein Western Blot durchgeführt. Zur Detektion von HEFL bzw. Bcr-Abl wurden der anti-ExpressTM-Antikörper bzw. der Abl-Antikörper 8e9 verwendet. Dabei konnte festgestellt werden, daß HEFL mit Bcr-Abl(Kin⁻) kopräzipitierte, was die vermutete Kinaseunabhängigkeit der Interaktion bestätigte (Abb. 26).

4.5 Bedeutung der HEFL-SH3-Domäne für die Interaktion von HEFL und Bcr-Abl

4.5.1 Die Interaktion von HEFL und Bcr-Abl scheint über Bindung der HEFL-SH3-Domäne an ein Poly-Prolin-Motiv im C-terminalen Segment des Abl-Teils von Bcr-Abl vermittelt

Mittels der GST-Bindungsstudien konnte gezeigt werden, daß die SH3-Domäne von HEFL ausreichend ist für eine Komplexassoziation mit Bcr-Abl und c-Abl (Kap. 4.4.1). Wie in Abb. 27 schematisch dargestellt besitzt HEFL C-terminal seiner SH3-Domäne unter anderem mehrere PXXP-Motive, die bekanntlich von SH3-Domänen erkannt und gebunden werden (Alexandropoulos *et al.*, 1996).

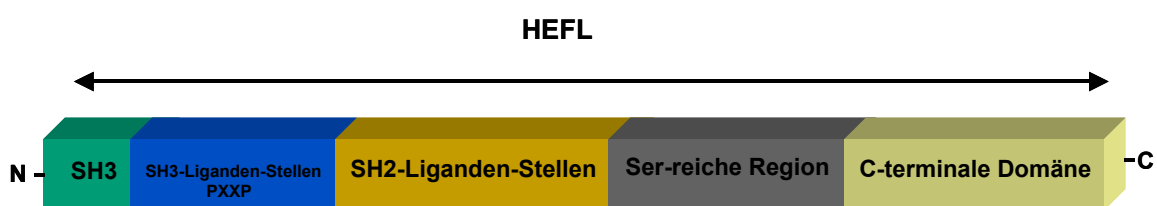


Abb. 27

Schematische Darstellung der Domänenstruktur von HEFL

SH3: Src-homologe Domäne 3; PXXP: Poly-Prolin-Motiv; SH2: Src-homologe Domäne 2; Ser: Serin ; C-terminale Domäne: Carboxy-terminale Domäne

Da auch Abl über eine SH3-Domäne verfügt, bestand prinzipiell die Möglichkeit, daß die Interaktion von HEFL und Bcr-Abl über die Bindung von HEFL an die SH3-Domäne von Abl erfolgt. Um diese Möglichkeit genauer zu untersuchen, sollte eine GST-Bindungsstudie im Cos1-Zellysat durchgeführt werden. Dabei wurde eine SH3-Mutante von HEFL (N-Y-HEFLSH3-Mut, genaue Beschreibung siehe Kap. 4.5.2) verwendet. Diese war N-terminal mit einer für EYFP (*enhanced yellow fluorescent protein*) kodierenden Sequenz fusioniert, die Träger eines antigenen Epitops für einen kommerziell erhältlichen Antikörper (anti-EGFP-Antikörper) ist.

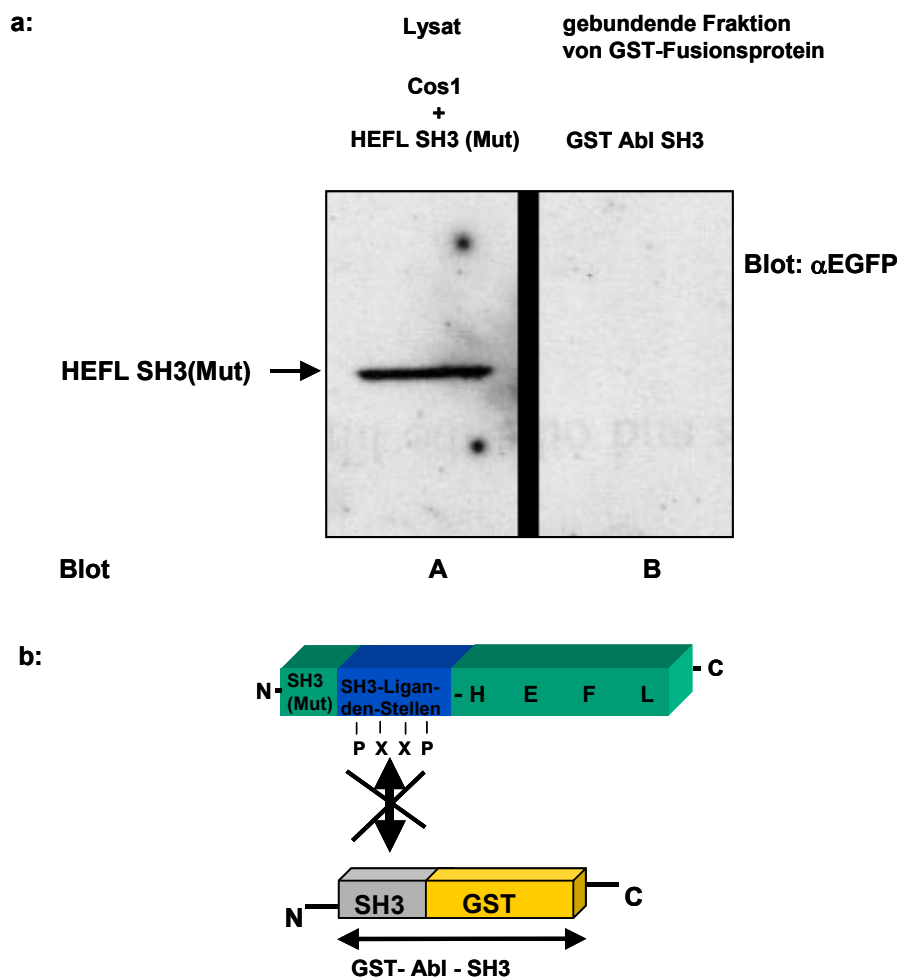


Abb. 28

HEFL interagiert nicht mit der Abl-SH3-Domäne in einem GST-Bindungsexperiment (Pull down)

a: 1×10^7 Cos1-Zellen (transient transfiziert mit N-Y-HEFLSH3 (Trp>51Lys)-Mut) wurden lysiert und mit $5 \mu\text{g}$ GSTAblSH3 inkubiert. Die gebundene Fraktion wurde mittels eines 8%igen SDS-Gels aufgetrennt und im Western Blot mit dem Anti-EGFP-Antikörper analysiert (Blot B). Mit N-Y-HEFLSH3(Trp>51Lys)-Mut transient transfiziertes Cos1-Zellysat wurde durch ein 8%iges SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit dem Anti-EGFP-Antikörper analysiert (Blot A).

b: Schematische Darstellung des Ergebnisses der in Abb. 28a dargestellten GST-Bindungsstudie. SH3: Src-homologe Domäne 3; PXXP: Poly-Prolin-Motiv; GST: Glutathion-S-Transferase. Die Abl-SH3-Domäne bindet nicht an ein Poly-Prolin-Motiv von HEFL.

Zur Durchführung der GST-Bindungsstudie wurden letztlich Cos1-Zellen mit der SH3-Mutante von HEFL transfiziert und eine Proteininduktion von GST-Abl-SH3 im entsprechenden Vektor vorgenommen. Daraufhin wurde ein GST-Bindungsexperiment mit dem Cos1-Zellysat durchgeführt. Durch den beim anschließend durchgeführten Western Blot verwendeten anti-EGFP-Antikörper ließ sich eine Interaktion von N-Y-HEFLSH3-Mut mit GST-Abl-SH3 nicht nachweisen, weshalb eine Involvierung der Abl-SH3-Domäne in die Komplexbildung zwischen HEFL und Bcr-Abl/c-Abl ausgeschlossen werden konnte (Abb. 28). Basierend auf der durch eine GST-Bindungsstudie nachgewiesenen Assoziation der SH3-Domäne von HEFL mit Bcr-Abl und c-Abl ließ sich nun konstatieren, daß die Interaktion von Bcr-Abl und c-Abl mit HEFL am ehesten über dessen SH3 Domäne und ein Poly-Prolin-Motiv im C-terminalen Segment des Abl-Teils von Bcr-Abl vermittelt wurde (Abb. 29).

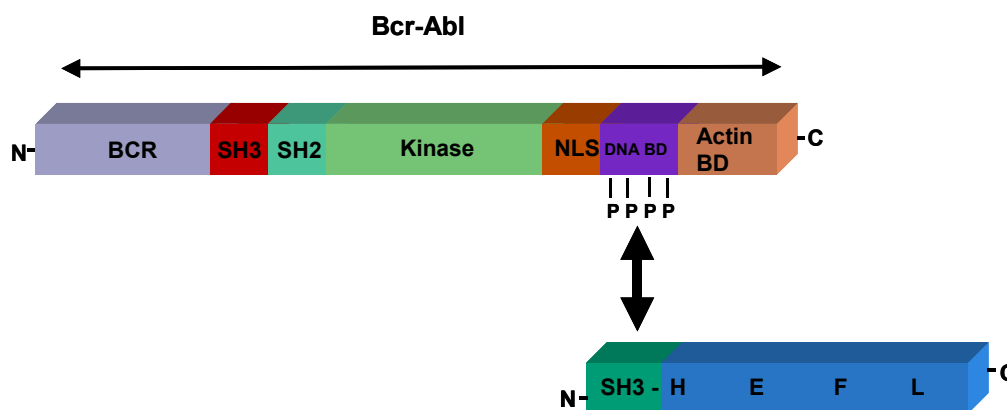


Abb. 29

Schematische Darstellung des Bindungsmechanismus der Interaktion von HEFL und Bcr-Abl

SH3: Src-homologe Domäne 3; PXXP: Poly-Prolin-Motiv; SH2: Src-homologe Domäne 2; Ser: Serin ; C-terminale Domäne: Carboxy-terminale Domäne;BCR: Breakpoint Cluster Region;NLS: Nukleäres Lokalisationssignal;DNA BD: DNA bindende Domäne;-P-P-P-P: Poly-Prolin-Motiv; Actin-BD: Actin bindende Domäne. HEFL bindet mit seiner SH3-Domäne an ein Poly-Prolin-Motiv im C-terminalen Segment des Abl-Teils von Bcr-Abl.

4.5.2 Die HEFL-SH3-Domäne ist nicht alleine für die Interaktion mit Bcr-Abl verantwortlich

GST-Bindungsstudien hatten gezeigt, daß der SH3-Domäne von HEFL bei der Interaktion von HEFL und Bcr-Abl eine bedeutende Funktion zukommt. In Anbetracht dieser Erkenntnis stellte sich aber die Frage, in welchem Ausmaß die SH3-Domäne von HEFL an der Ausbildung des Komplexes zwischen Bcr-Abl und HEFL beteiligt war. Zur Abklärung dieser Fragestellung wurde eine SH3-Mutante von HEFL kloniert, um eine Interaktion über die SH3-Domäne auszuschließen. Zur Konstruktion der SH3-Mutante wurde zunächst mit Hilfe der PCR-Mutagenese (siehe Kap. 3.1.6.1) eine Punktmutation in die die SH3-Domäne

kodierende cDNA-Sequenz eingefügt, was zur funktionellen Inaktivierung der SH3-Domäne führt. Als Matrizen-DNA diente die c-DNA von HEFL im Vektor pcDNA 3.1, wobei sich bei dem in diesem Experiment eingesetzten Konstrukt von HEFL N-terminal eine für EYFP (*enhanced yellow fluorescent protein*) kodierende Sequenz befand. Diese war zum Zweck später geplanter (durch Frau Geraldine Bresoline in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte) Studien zum intrazellulären Verteilungsmuster von HEFL mit der Methode der Fluoreszenzmikroskopie eingefügt worden und brachte bereits jetzt den Vorteil mit sich, daß sie ein antigenes Epitop zu einem kommerziell erhältlichen Antikörper (anti-EGFP) enthielt. Unter Zuhilfenahme eines entsprechend gestalteten mutagenen PCR-Primers wurde das Basen-Triplett TGG (AS 51 der HEFL-cDNA), welches für die Aminosäure Tryptophan kodiert, zum Basen-Triplett AAG mutiert, das für die Aminosäure Lysin kodiert. Die HEFL-SH3-Mutante wurde dann im Bakterienstamm DH5 α exprimiert und aufgereinigt. Wildtyp-HEFL und HEFLSH3(Trp51>Lys)-Mut wurden daraufhin jeweils mit Bcr-Abl(Kin⁻) in Cos1-Zellen kotransfiziert und exprimiert. Hierauf wurde eine anti-ExpressTM - Koimmunpräzipitation mit anschließendem Western Blot durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß Bcr-Abl auch mit der SH3-Mutante von HEFL präzipitierte (Abb. 30).

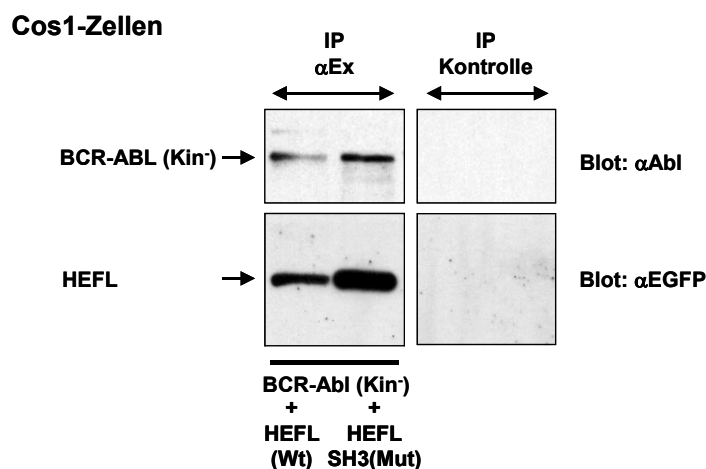


Abb. 30

Eine SH3-Mutante von HEFL interagiert mit Bcr-Abl (Kin⁻)

1.5 x 10⁶ Cos1-Zellen wurden transient kotransfiziert mit entweder HEFL (Wt) oder HEFLSH3(Trp51>Lys)-Mut und Bcr-Abl (Kin⁻). Nach 48 Stunden Inkubation bei 37°C wurden die Zellen abgeerntet und lysiert. Das Lysat wurde einer anti-ExpressTM-Koimmunpräzipitation unterzogen. Die präzipitierten Komplexe wurden mittels eines 8%igen SDS-Gels aufgetrennt und im Western Blot mit dem Abl-Antikörper 8e9 und dem anti-EGFP-Antikörper analysiert.

Dies bedeutete, daß die Interaktion zwischen HEFL und Bcr-Abl nicht direkt und ausschließlich über die HEFL-SH3-Domäne vermittelt wurde, sondern eher auf einem indirekten Mechanismus beruhte, der eventuell weitere Moleküle involviert. Letzteres wäre eine Parallele zum Bindungsmechanismus von Bcr-Abl und dem HEFL-Homolog HEF1, welches über das Adaptormolekül Crkl mit Bcr-Abl assoziiert (de Jong *et al.*, 1997).

4.6 Die Interaktion von HEFL mit Bcr-Abl (Wt) führt zur Phosphorylierung von HEFL

Um herauszufinden, ob die Assoziation von Bcr-Abl mit HEFL zur Phosphorylierung von HEFL führt, wurden Wildtyp-HEFL sowie HEFLSH3(Trp51>Lys)-Mut (s. Kap. 4.5.2), jeweils mit Bcr-Abl(Wt) und Bcr-Abl(Kin⁻) in Cos1-Zellen koexprimiert. Beide HEFL-Konstrukte waren im Expressionsvektor pcDNA3.1 zugleich mit der anti-ExpressTM- Sequenz gekoppelt. Unter Einsatz des anti-ExpressTM- Antikörpers wurden die gebildeten Molekülkomplexe bestehend aus den HEFL- und Bcr-Abl-Konstrukten aus den Zellysaten isoliert und über SDS-PAGE aufgetrennt. Im Western Blot wurde dann Bcr-Abl mit dem Antikörper 8e9 sichtbar gemacht (Daten nicht gezeigt). Die HEFL-Konstrukte wurden durch den Kaninchen-HEFL-Antikörper detektiert (Daten nicht gezeigt) bzw. mit dem gegen phosphorylierte Tyrosine gerichteten Antikörper PY20 auf Phosphorylierung untersucht. Dabei ließ sich zeigen, daß sowohl Wildtyp-HEFL als auch die SH3-Mutante in Gegenwart von Bcr-Abl(Wt) phosphoryliert waren. Im Gegensatz dazu konnte eine Phosphorylierung nicht nachgewiesen werden, wenn HEFL(Wt)/HEFLSH3(Trp51>Lys)-Mut mit Bcr-Abl(Kin⁻) koexprimiert waren (Abb. 31). Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, daß HEFL/HEFLSH3(Trp51>Lys) mit Bcr-Abl kopräzipitierten und zugleich phosphoryliert wurden. Ob die Phosphorylierung direkt erfolgt oder die Involvierung einer anderen Kinase impliziert, muß in weiteren Experimenten gesondert untersucht werden.

Cos1-Zellen

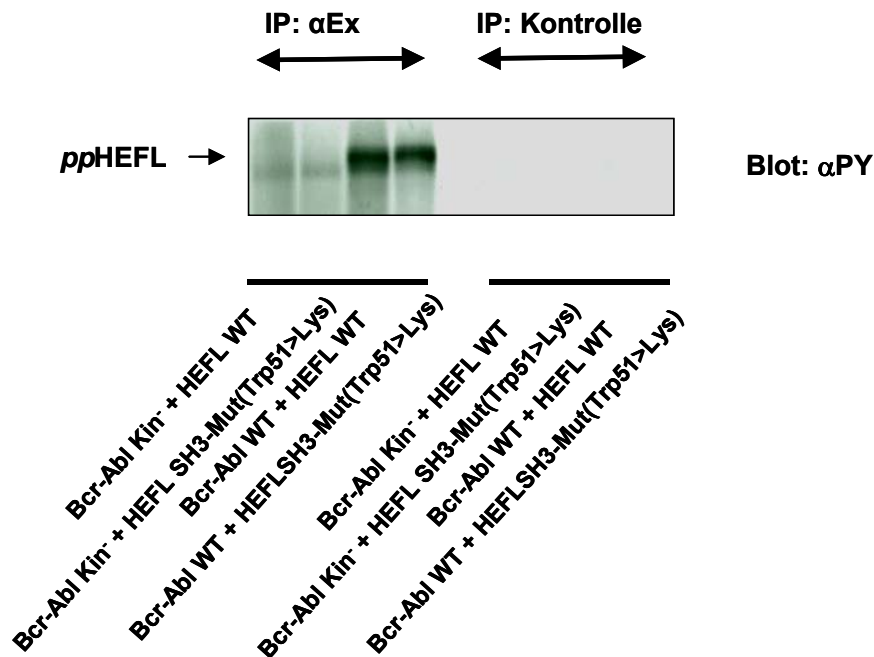


Abb. 31

Die Interaktion von HEFL mit Bcr-Abl (Wt) führt zur Phosphorylierung von HEFL

1.5x10⁶ Cos1-Zellen wurden transient kontransfiziert mit HEFL (Wt) oder HEFLSH3(Trp51>Lys)-Mut (beide Konstrukte waren im verwendeten Expressionsvektor pcDNA3.1 mit der ExpressTM - Sequenz gekoppelt) und Bcr-Abl Kin⁻ oder Bcr-Abl (Wt). Nach 48 Stunden Inkubation bei 37°C wurden die Zellen abgeerntet und lysiert. Mit dem Lysat wurde ein Koimmunpräzipitationsexperiment mit dem anti-ExpressTM (Ex) - Antikörper durchgeführt. Die präzipitierten Komplexe wurden mittels eines 8%igen SDS-Gels aufgetrennt und im Western Blot mit dem Abl-Antikörper 8e9 und dem Kaninchen-HEFL-Antikörper (Daten nicht gezeigt) sowie dem gegen Phosphotyrosin gerichteten Antikörper PY20 analysiert.

5. Diskussion

5.1 Klonierung des HEFL-Gens

Das Bcr-Abl-Onkogen wurde als erstes Beispiel einer spezifischen Chromosomen-Translokation in weißen Blutzellen identifiziert. Es resultiert aus der reziproken chromosomalen Translokation von Stücken der Chromosomen 9 und 22 und wird bei über 95% der CML-Patienten sowie bei 10-20% der akuten lymphatischen Leukämie des Erwachsenenalters und in 2-5% der akuten lymphatischen Leukämie des Kindesalters exprimiert. Die Arbeit in unserem Labor ist daher darauf ausgerichtet, neue Interaktionspartner zu identifizieren, die mit Bcr-Abl interagieren. Es wurde zu diesem Zweck ein modifiziertes *Yeast-two-hybrid*-System etabliert, mithilfe dessen aus einer K562-Genbibliothek eine Vielzahl bereits bekannter Zielproteine von Bcr-Abl wie Grb2, p85 PI3K und Crk identifiziert wurde (Bai *et al.*, 1998), aber auch neue Bindungspartner von Bcr-Abl mit bekannter oder unbekannter Aminosäuresequenz wie Grb 10, Grb4 und p95/Vav, deren Interaktion mit Bcr-Abl von einzelnen Mitarbeitern unseres Labors charakterisiert werden konnte (Bai *et al.*, 1998, Coutinho *et al.*, 2000, Bassermann *et al.*, 2002).

Als ein spezifisch und phosphotyrosinunabhängig mit Bcr-Abl interagierender Klon wurde der Klon F6 identifiziert. Nach ersten Sequenzanalysen zeigte sich eine > 60-prozentige Homologie von F6 zur SH3-Domäne von HEF1/Cas-L, dem zusammen mit p130^{Cas} eine koordinierende Funktion der Signalkomplexe an fokalen Adhäsionsstellen zugesprochen wird im Rahmen von Zelladhäsion und Regulation des Aktin-Zytoskeletts (Manie *et al.*, 1997, Law *et al.*, 1996 u. 1998).

Klonierung der kompletten cDNA:

Durch die Anwendung der RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) - Methode und Sequenzanalytik gelang es, die komplette cDNA des die SH3-Domäne von Klon F6 kodierenden Gens zu klonieren. Sequenzvergleiche zeigten wiederum eine hohe Homologie zu dem Cas-Protein HEF1. Das kodierende Gen nannten wir daher HEFL (HEF-Like).

Mittels der 5'-RACE-Methode konnte das 5'-Ende von HEFL mit dem ATG-Startcodon bestimmt werden. Dieses befand sich nur sechs Codons *upstream* des uns bis zu diesem Zeitpunkt bereits zur Verfügung stehenden 5'-Endes des Klons F6. Mit dem Vorhandensein einer Purinbase an Position -3 war auch die Forderung nach einem für ein Translations-Initiator-ATG erforderlichen sogenannten starken Sequenz-Kontext erfüllt. Demnach lautet die optimale Konsensussequenz für die Initiation der Translation von mRNA bei Vertebraten *GCCACCatgG*, wobei das G an Position +4 und das A an Position -3 hoch konserviert sind und entsprechend den stärksten Effekt ausüben. Dabei sollte das den Start der mRNA-

Translation bei Vertebraten definierende ATG zumindest mit einer dieser zwei Schlüsselpositionen der Konsensussequenz übereinstimmen. Weiter *upstream* des ATG-Startcodons fanden sich zudem fünf *in-frame* Stopcodons. Damit war auch das Postulat nach mindestens einem *upstream in-frame* Terminations-Codon als weiteres positives Merkmal für ein glaubwürdiges Translations-Initiator-ATG erfüllt. Da zudem das als Negativ-Merkmal geltende Vorkommen von mehreren *upstream* ATG-Codons am 5'-Ende einer cDNA-Sequenz nicht nachweisbar war, konnten wir bei dem durch 5'-RACE erhaltenen ATG auf das echte Start-Codon des HEFL-Gens schließen (Kozak, 1996).

Mittels 3'-RACE konnte das Stop-Codon einer kleineren Spleißvariante von HEFL bestimmt werden. Dabei zeigte sich, daß der Großteil der Sequenz bereits durch die im Hefesystem identifizierte cDNA des Klons F6 kloniert worden war. Lediglich 72 Basenpaare fehlten bis zum Ende dieser Spleißvariante und konnten durch 3'-RACE gefunden werden. Da die letzten 72 Basenpaare (bp 458-530) vor dem Stop-Codon der durch RACE isolierten Sequenz von der Sequenz des in Hefe identifizierten Klons F6 divergierten und letztere aber wiederum ab bp 458 annähernd 100% identisch war zu einem *sequence tag* in der Genbank, bedeutete dies, daß von F6/HEFL als Folge alternativen Spleißens des primären Transkriptes zwei Produkte existieren mußten, wobei wir durch 3'-RACE das Stop-Codon der kleineren Variante bestimmt hatten. Daher wurde die ursprünglich im *yeast two-hybrid screen* identifizierte cDNA-Sequenz von Klon F6 schrittweise in 3'-Richtung sequenziert. Schließlich konnte so das 3'-Ende mit dem Stop-Codon der langen Spleißvariante des HEFL-Gens definiert werden (s. 4.2). Diese wurde in den beschriebenen Experimenten verwendet.

Bestimmung der mRNA-Größe und des Gewebeexpressionsmusters von HEFL durch Northern Blot:

Ein Northern Blot wurde durchgeführt, um das Expressionsmuster von HEFL in verschiedenen menschlichen Geweben zu analysieren. Es konnten dadurch zwei verschieden große, spezifische Transkripte nachgewiesen werden. Zum einen hybridisierte eine mRNA von ca. 5 kb Größe spezifisch mit der radioaktiv markierten DNA-Sonde. Diese mRNA war ubiquitär in verschiedenen Geweben exprimiert wie Kolon, Ovar, Prostata und Thymus. Eine deutlich erhöhte Expression zeigte sich aber in peripheren Blut-Leukozyten und in vergleichsweise dazu etwas geringerem Ausmaß in der Milz. Damit weist HEFL ein anderes Verteilungsmuster auf als HEF1, welches vornehmlich in epithelialen Zellen aus Lungen- und Brustgewebe exprimiert wird (Law *et al.*, 1998). Des weiteren wurde eine spezifische Hybridisierung der Sonde mit einer ca. 3 kb großen mRNA beobachtet. Diese wies dasselbe Gewebeexpressionsmuster auf wie die ca. 5 kb große mRNA und entspricht höchst wahrscheinlich der kleineren Transkriptionsvariante, welche aus einem alternativen

Spleißvorgang des HEFL-Gens resultiert. Die Größendifferenz zwischen mRNA und cDNA der kleineren Spleißvariante erklärt sich über das zahlreiche Vorkommen von hochrepetitiven DNA-Abschnitten in der nichtkodierenden 3'-Region des Gens. Dabei handelt es sich um repetitive Sequenzen der *Alu*-Familie. Die Mitglieder der *Alu*-Familie bestehen aus ca. 300 bp nicht identischer, aber ähnlicher Sequenzen und gehören zur Gruppe sog. SINE (*short interspersed repetitive elements*), die zwischen 100-500 bp groß sind und einen Großteil der genfreien DNA ausmachen. Fast eine Million Kopien davon sind über das Mensch- oder Mausgenom verteilt. Man schätzt, daß bis zu 20% eines Säugetier-Genoms aus SINE-Abschnitten bestehen (Knippers, 1997).

Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen das HEFL- Protein:

Ein polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen HEFL wurde hergestellt. Der Antikörper richtete sich gegen die ersten 133 Aminosäuren von HEFL, welche auch die SH3-Domäne von HEFL umspannten (s. Kap. 3.4.7). Der Kaninchen-Antikörper wurde auf Funktionalität und Spezifität für Western Blot und Immunpräzipitation getestet. Der Antikörper erkannte im Western Blot mit EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) fusioniertes HEFL, welches als Positiv-Kontrolle in Cos1-Zellen überexprimiert worden war. Die Sensitivität war vergleichbar mit dem anti-EGFP-Antikörper. Die erkannte Bande war 105 kD groß und paßte zur kalkulierten Größe basierend auf der Aminosäuresequenz von HEFL. Im Rahmen nachfolgender molekularbiologischer Studien konnte die Spezifität des polyklonalen HEFL-Antikörpers nachgewiesen werden. Eine Kreuzreaktivität mit dem HEFL-Homolog HEF1 war damit ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt; entsprechendes Experiment wurde von G. Bresolin aus unserer Arbeitsgruppe durchgeführt). Der polyklonale Kaninchen-Antikörper wurde weiter auf seine Eignung für molekularbiologische Experimente getestet. So konnte er auch sehr gut denaturiertes endogenes HEFL im Western Blot verschiedener Zelllinien wie den Leukämiezelllinien M-07e und K562 sowie in Zellen von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie detektieren. Der Nachweis der Expression von HEFL in Leukämiezelllinien und in Zellen von CML-Patienten unterstrich dabei eine mögliche Rolle von HEFL in der Pathogenese der CML.

Der polyklonale Antikörper war auch hervorragend dazu geeignet, EGFP-HEFL aus Cos1-Zellysaten zu präzipitieren und war daher in in-vivo-Koimmunpräzipitationsstudien einsetzbar.

Nachdem mit der Identifikation von Start und Ende die komplette cDNA-Sequenz von HEFL kloniert war, konnte die von ihr kodierte Aminosäuresequenz bestimmt werden.

5.2 HEFL hat die Domänenstruktur eines Multi-Adaptor-Proteins der Cas-Protein-Familie

Strukturanalysen erbrachten strukturelle Charakteristika von Proteinen der Cas-Familie, darunter eine N-terminale SH3-Domäne, eine prolinreiche Region, eine Region mit SH2-Liganden-Stellen, eine Serin-reiche Region sowie einen konservierten C-Terminus. Im direkten Sequenzvergleich mit den Cas-Proteinen p130^{Cas}, HEF1/Cas-L und Efs/Sin war die Homologie zwischen der HEFL-cDNA und HEF1/Cas-L am deutlichsten, mit den höchsten Homologiewerten für die N-terminale SH3-Domäne und die C-terminale Domäne (Abb. 13, 20 und nicht gezeigte Daten). Die SH3-Domäne von HEFL weist eine Ähnlichkeit von 83% auf zur SH3-Domäne von HEF1. Dieser auf dem Vergleich der Aminosäuresequenz beruhende hohe Grad der Konservierung spiegelt sich in den funktionellen Eigenschaften der beiden Proteine wider. So konnte in weiterführenden Experimenten gezeigt werden, daß - wie für HEF1 und p130^{Cas} bereits gezeigt - auch HEFL mit FAK interagiert und im Zuge dessen phosphoryliert wird (Bresolin, 2000). Der Assoziation der Cas-Proteine mit FAK, insbesondere der des an fokalen Adhäsionsstellen lokalisierten Proteins p130^{Cas}, wird dabei zusammen mit anderen zytoskelettalen Proteinen wie Paxillin, Talin und Tensin eine Bedeutung im Rahmen der Kontrolle der Zellmorphologie zugeschrieben als Reaktion auf die Integrin-vermittelte Zelladhäsion an extrazelluläre Matrix. Eine Beeinflussung der Regulation der Funktion von p130^{Cas} durch konstitutive Phosphorylierung infolge maligner Transformation könnte daher an der Ausbildung der charakteristischen morphologischen Eigenschaften transformierter Zellen mitwirken (Petch *et al.*, 1995, Polte *et al.*, 1995, Law *et al.*, 1998). HEF1/Cas-L und p130^{Cas} binden dabei direkt mit ihrer SH3-Domäne an jeweils unterschiedliche Poly-Prolin-Sequenzmotive im Bereich des C-Terminus von FAK (Polte *et al.*, 1995, Law *et al.*, 1996). Im Unterschied dazu konnte für HEFL eine Interaktion mit FAK aber ebenso mit einer SH3-Deletionsmutante von HEFL gezeigt werden. Allerdings konnte für p130^{Cas} auch eine Assoziation mit der SH3-Domäne von FAK nachgewiesen werden (Polte *et al.*, 1995). Da HEFL wie p130^{Cas} über eine Prolin-reiche Region mit vielen PXXP-Motiven verfügt, die als Konsensussequenz für SH3-Domänen dienen können, bleibt daher zu spekulieren, ob HEFL über eines seiner PXXP-Motive an die SH3-Domäne von FAK bindet. Was die Phosphorylierung von HEFL durch FAK betrifft, fiel auf, daß diese schwächer ausfällt im Vergleich zu HEF1. Dies ist möglicherweise bedingt durch das Fehlen des für Cas-Proteine typischen YDYVHL-Motivs bei HEFL. Dieses dient FAK als primäre Phosphorylierungsstelle bei den Cas-Proteinen und ermöglicht somit die Assoziation der Cas-Proteine mit Src, welche die prozessive Phosphorylierung weiterer SH2-Bindemotive der Cas-Proteine bewerkstelligt. Diese können dann wiederum als Bindestellen für

Adaptoren mit SH2-Domänen wie CrkL dienen und somit die Basis für den Aufbau eines komplexen Netzwerks unterschiedlicher Signalmoleküle bilden (Tachibana *et al.*, 1997). Wie für Cas-Proteine charakteristisch verfügt auch HEFL über eine Reihe von SH2-Bindemotiven. Während die Mehrzahl der potentiellen SH2-Bindestellen von HEF1 und p130^{Cas} der Konsensussequenz YXXP für die SH2-Domäne von Crk entsprechen, verfügen beide Proteine noch über Konsensussequenzen für weitere Onkoproteine wie Abl, Src und Vav mit denen sie assoziieren können und durch die sie entsprechend phosphoryliert werden können. HEFL selbst verfügt über sechs SH2-Bindemotive, die als Bindestelle für Crk/CrkL dienen können (Law *et al.*, 1996, Schaller *et al.*, 1995). Die restlichen Tyrosine werden von verschiedenen Aminosäuren flankiert, für die bislang kein bestimmter Bindungspartner bekannt ist, was ein möglicherweise heterogeneres Spektrum der mit HEFL assoziierenden Moleküle suggeriert. Das Potential, einen Komplex mit verschiedenen Signalmolekülen zu bilden und darüber regulierend in die Koordination des Zytoskelette eingreifen zu können, wird HEFL möglicherweise auch durch seine C-terminale Domäne verliehen. Diese ähnelt der C-terminalen Domäne von HEF1/Cas-L zu 59% und weist einen Homologiegrad von 40 % auf (Abb. 20 und nicht gezeigte Daten). Zusammen mit der SH3-Domäne begründet sie auch hauptsächlich die Homologie beider Proteine. Auch HEF1 und p130^{Cas} ähneln sich am deutlichsten in diesen beiden Domänen. Diesem charakteristisch unter Cas-Proteinen konservierten C-Terminus konnte die Funktion eines Dimerisierungsmotivs nachgewiesen werden. Strukturelle Basis ist das Vorhandensein eines Helix-Loop-Helix-Motivs, das sowohl die Homodimerisierung von HEF1 als auch die Heterodimerisierung von HEF1 und p130^{Cas} vermittelt (Law *et al.*, 1996 u. 1999). Für HEFL konnte gezeigt werden, daß es mit HEF1 heterodimerisiert (Dieser Versuch wurde von Dr. med. T. Jahn in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt). Es ist denkbar, daß diese Interaktion durch die C-terminale Domäne von HEFL ermöglicht wird. Die funktionelle Konsequenz der Dimerbildung ist jedoch unklar. Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß am Anfang der Klonierung von HEF1/Cas-L nur dessen C-Terminus bekannt war, der allein pseudohyphales Wachstum von Hefen induzieren kann (Law *et al.*, 1996), scheint eine Funktion des C-Terminus bei der Regulation der Zellform zumindest bei Hefen wahrscheinlich. Dabei könnte die Dimerisierung von HEF1 mit sich selbst und anderen in Hefen die Zellmorphologie kontrollierenden Helix-Loop-Helix-Proteinen eine wesentliche Rolle spielen. Eine andere Hypothese wäre ein Modell, in dem die Interaktion von Tyrosinkinase und anderen Proteinen mit SH3-Domäne und SH2-Bindemotiv der Cas-Proteine die Funktion von deren carboxyterminaler Domäne reguliert, die als direkter Effektor von Veränderungen des Zytoskeletts fungiert. In diesem Modell rekrutiert die SH3-Domäne FAK, die dann über Phosphorylierung der SH2-Bindemotive die Anlagerung von Tyrosinkinase wie Src und Abl bewirkt, was letztlich den Cas-Protein-C-Terminus in die Lage versetzt, eine Veränderung des Aktinzytoskeletts hervorzurufen. Im

Gegensatz dazu wirkten die zahlreichen SH2-Bindestellen im unphosphorylierten Zustand als Negativ-Regulatoren des Cas-Protein-C-Terminus (Law *et al.*, 1996). Zusammengefaßt läßt sich in diesem hypothetischen Modell konstatieren, daß die für die Cas-Proteinfamilie charakteristische Domänenstruktur von HEFL die komplexe Assoziation mit multiplen Signalmolekülen ermöglicht und darüber die Regulation des Aktinzytoskeletts koordiniert. Dies wäre eine Funktion, die für den Erwerb der invasiven Wachstumsfähigkeit maligner Zellen eine bedeutende Rolle spielen könnte.

5.3 Charakterisierung der Interaktion von HEFL mit Bcr-Abl

HEFL interagiert mit Bcr-Abl im humanen Zellsat:

Von besonderem Interesse in dieser Arbeit war es, die Interaktion von HEFL und Bcr-Abl genauer zu untersuchen. Dazu mußte zuerst geklärt werden, ob die in Hefen beobachtete Interaktion von Bcr-Abl und HEFL im humanen Zellsystem (semi-in-vivo) reproduzieren ließ. Damit sollte bewiesen werden, daß es sich um eine direkte und nicht um eine indirekt durch ein Hefeprotein vermittelte Interaktion zwischen HEFL und Bcr-Abl handelte. Es wurden daher zunächst GST-Bindungsstudien mit rekombinantem HEFL-Fusionsprotein und Lysat der Bcr-Abl-exprimierenden CML-Zelllinie K562 durchgeführt. In einem ersten Schritt wurde zu diesem Zweck ein Fusionsprotein, bestehend aus HEFL und der Glutathion bindenden Domäne des Enzyms Glutathion-S-Transferase, im Vektor pGEX-4T-3 hergestellt. Mit diesem Fusionsprotein und Lysaten der Bcr-Abl-positiven Zelllinie K562 konnte in einem GST-Bindungsexperiment die Komplexbildung zwischen HEFL und Bcr-Abl *in vitro* bzw. *semi in vivo* bestätigt werden.

Die SH3-Domäne von HEFL bindet im Abl-Teil von Bcr-Abl:

In einem weiteren GST-Bindungsexperiment mit einem GST-Fusionsprotein, was nur aus der SH3-Domäne von HEFL und der Glutathion bindenden Domäne des Enzyms Glutathion-S-Transferase bestand, konnte zudem bewiesen werden, daß für die Interaktion von HEFL mit Bcr-Abl die SH3-Domäne von HEFL ausreichend ist (Abb. 25). Ein interessanter Aspekt dieser Experimente war, daß neben Bcr-Abl auch c-Abl einen Komplex mit HEFL bildete und noch dazu mit einer signifikant höheren Affinität im Vergleich zu Bcr-Abl. Eine mögliche Erklärung wäre, daß im Unterschied zu endogenem Abl die Bindestellen für die SH3-Domäne von HEFL bei Bcr-Abl bereits besetzt sind durch endogenes HEFL oder andere Proteine, möglicherweise aus der Cas-Familie. Eine weitere Charakterisierung der Interaktion zwischen HEFL und Bcr-Abl war daher notwendig. Aus Kenntnissen von der Domänenstruktur von HEFL war bekannt, daß HEFL eine Reihe von PXXP-Motiven besitzt,

die nachweislich die Assoziation mit SH3-Domänen vermitteln können (Pawson und Schlessinger, 1993, Rickles *et al.*, 1994). Zusammen mit dem Umstand der beobachteten Komplexformation von HEFL und Abl, war dies Anlaß genug, zu untersuchen, ob HEFL an die SH3-Domäne von Abl bindet. In einem entsprechenden GST-Bindungsexperiment mit rekombinantem Fusionsprotein, bestehend nur aus GST und der SH3-Domäne von Abl, und Lysat von Cos1-Zellen, in denen HEFL überexprimiert wurde, konnte allerdings ein Bindungsmechanismus der SH3-Domäne von Abl an Prolin-Motive in HEFL ausgeschlossen werden (Abb. 28). Weil Abl selbst im carboxyterminalen Bereich Prolin-Motive aufweist (Feller *et al.*, 1995; Lowenstein *et al.*, 1992), ließ sich deshalb auf einen Bindungsmechanismus der HEFL-SH3-Domäne im C-Terminus von Abl bzw. im Abl-Teil von Bcr-Abl schließen. Dies wurde vor allem auch unterstützt durch die beobachtete kinaseunabhängige Bindung von HEFL an Bcr-Abl in Hefe (Abb. 29).

Die Interaktion von HEFL mit Bcr-Abl beruht am ehesten auf einem indirekten Bindungsmodus: Weitergehende Bindungsstudien in einem *in vivo* Expressionssystem mit einer Mutante von HEFL, deren SH3-Domäne funktionell inaktiviert war, ließen dann vermuten, daß die Assoziation von HEFL mit Bcr-Abl zumindest nicht einzig über die HEFL-SH3-Domäne zustande kommt, da auch HEFL ohne seine funktionierende SH3-Domäne mit Bcr-Abl komplexierte (Abb. 30). Dieser Verdacht konnte schließlich durch eine andere Koimmunpräzipitationsstudie mit einer SH3-Deletionsmutante von HEFL bestätigt werden (Dieser Versuch wurde von Frau Geraldine Bresolin in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt). Letztlich weisen die Ergebnisse der durchgeführten Bindungsstudien auf einen eher komplexen, indirekten Bindungsmodus von HEFL und Bcr-Abl hin. Konform damit war auch der spezifische Nachweis einer direkten Assoziation von HEFL mit *in vitro* translatiertem Bcr-Abl nie gelungen (Daten nicht gezeigt). Es ist durchaus vorstellbar, daß auch HEFL genauso wie für p130^{Cas} und HEF1 beschrieben über das Adaptorprotein Crkl mit Bcr-Abl assoziiert ist (Salgia *et al.*, 1996, de Jong *et al.*, 1997). Crkl ist dabei mit seiner SH3-Domäne konstitutiv an Bcr-Abl gebunden und rekrutiert gleichzeitig tyrosinphosphorylierte Adaptoren wie HEF1 und p120^{Cbl}, mit denen es über seine SH2-Domäne assoziiert ist, in einen trimeren bzw. in Anbetracht der Oligomerisierungsdomäne von Bcr-Abl multimeren Komplex. Als Voraussetzung für die initiale Assoziation von p130^{Cas}, HEF1 und p120^{Cbl} mit der SH2-Domäne von Crkl gilt hierbei ein basaler minimaler Phosphorylierungsgrad der Tyrosine potentieller SH2-Bindemotive der genannten Proteine. Dieser könnte durch Stimulation durch Wachstumsfaktoren oder Integrinrezeptoren im Rahmen physiologischer Signalvorgänge gewährleistet sein (de Jong *et al.*, 1997). Neben der Bindung an die SH2-Domäne von Crkl ist für HEFL sicherlich auch eine Assoziation mit Crkl denkbar, bei der HEFL über eines seiner PXXP-Motive mit der anderen, zweiten SH3-Domäne von Crkl verbunden ist.

Die Komplexformation von HEFL mit Bcr-Abl ist nicht an dessen Kinaseaktivität gebunden:

In Anbetracht der im Hefesystem beobachteten Kinaseunabhängigkeit der Komplexbildung von HEFL mit Bcr-Abl und aufbauend auf die Ergebnisse der GST-Bindungsstudien, die auf eine Bindung der SH3-Domäne von HEFL an einen Bereich im Abl-Teil von Bcr-Abl hindeuteten, interessierte noch, ob auch im reinen Zellsystem *in vivo* auf die Aktivität der Tyrosinkinase von Bcr-Abl verzichtet werden kann. In einem Koimmunpräzipitationsexperiment mit transient in Cos1-Zellen koexprimiertem HEFL und Bcr-Abl konnte entsprechend (wie erwartet) gezeigt werden, daß die Komplexbildung zwischen HEFL und Bcr-Abl auch im transienten Expressionssystem *in vivo* kinaseunabhängig ist, da auch eine kinasedefekte Mutante von Bcr-Abl mit HEFL komplexierte. Auch in einer weiteren Koimmunpräzipitationsstudie mit einer temperatursensitiven Mutante von Bcr-Abl (Bcr-Abl (ts)) kam es sowohl unter permissiven (32°) wie restriktiven Temperaturen (39°) zur Interaktion der Bcr-Abl-Mutante (ts) mit HEFL (Daten nicht gezeigt). In anderen (nicht gezeigten Daten sowie von Geraldine Bresolin in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten) Bindungs- und Koexpressionsstudien von HEFL und Bcr-Abl fiel dabei die Besonderheit auf, daß die Komplexbildung von Bcr-Abl mit HEFL stärker war in Gegenwart einer aktiven Tyrosinkinase von Bcr-Abl. Es bleibt daher zu spekulieren, daß Bcr-Abl-Wildtyp in HEFL potentielle Bindemotive für die Abl-SH2-Domäne phosphoryliert, was eine zusätzliche Stabilisierung der Interaktion von HEFL und Bcr-Abl bewirken würde. Einer kinaseinaktiven Mutante von Bcr-Abl wäre es hingegen nicht möglich, derartige zusätzliche Interaktionsstellen zu schaffen. Dabei wird davon ausgegangen, daß HEFL durch die Assoziation mit Bcr-Abl auch phosphoryliert wird.

Die Interaktion von HEFL mit Bcr-Abl führt zur Phosphorylierung von HEFL:

Darauf deutete ein entsprechendes Koimmunpräzipitationsexperiment hin, durch das eine Phosphorylierung von HEFL in Gegenwart von kinaseaktivem, nicht aber kinaseinaktivem Bcr-Abl nachgewiesen werden konnte (Abb. 31). Dies konnte letztlich durch nachfolgende Experimente wiederholt gezeigt und bewiesen werden. Offen bleibt allerdings, ob die Phosphorylierung direkt erfolgt oder eine andere Kinase wie beispielsweise c-Abl involviert. Von c-Abl konnte gezeigt werden, daß es mit Paxillin an fokalen Adhäsionsstellen kolokalisiert und Integrin-abhängig reguliert wird (Lewis *et al.*, 1996 u. 1998); im Rahmen dessen ist eine Rolle bei der Phosphorylierung von HEFL durchaus vorstellbar. Auch FAK, das als wesentlicher Bestandteil von Molekülkomplexen der Cas-Proteine vermutet wird (Polte *et al.*, 1995, Law *et al.*, 1996), wäre ein denkbarer Kandidat. Zumal FAK nachweislich mit HEFL komplexiert und dabei zur Phosphorylierung von HEFL führt (Daten nicht gezeigt; diese Versuche wurden von Geraldine Bresolin in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt). Zur

Klärung dieser Fragen wäre selbstverständlich prinzipiell erforderlich, die Direktheit der Phosphorylierung von HEFL durch c-Abl oder FAK nachzuweisen.

5.4 HEFL scheint in den Integrinsignalweg involviert zu sein

Die Klonierung einer neuen cDNA-Sequenz ist unmittelbar mit der Frage nach der Funktion der von ihr kodierten Aminosäuresequenz verbunden. Was HEFL betrifft, kann hier nur ein theoretischer Ansatz entwickelt werden, vor allem aufgrund des Umstands, daß die vorliegende Arbeit auf Klonierung des HEFL-Gens und Charakterisierung der Interaktion des von ihm kodierten Proteins mit Bcr-Abl beschränkt war. Die weitere Bearbeitung von HEFL durch Frau Geraldine Bresolin konnte allerdings einige interessante Aspekte hinsichtlich einer biologischen Funktion von HEFL aufzeigen. Dabei gelang es, eine Zunahme des Phosphorylierungsgrades von HEFL infolge Zelladhäsion an Fibronectin nachzuweisen. Ferner konnte gezeigt werden, daß die durch Fibronectin induzierte Phosphorylierung von HEFL über die Aktivierung des β 1-Integrinsignalwegs vermittelt wird. Eine Beteiligung der Cas-Proteine am Integrin-Signalweg gilt als gesichert (Manie *et al.*, 1997). Daß die Stimulation des β 1-Integrinsignalwegs zur Phosphorylierung von HEFL führt, spricht schließlich auch HEFL eine Rolle in diesem Signalweg zu. Desweiteren gelang es, in Kolokalisationsstudien eine örtliche Umverteilung von HEFL von seiner punktförmigen über das gesamte Zytoplasma verteilten Anordnung hin zu dem an Aktinfilamenten lokalisiertem Bcr-Abl nachzuweisen, wenn HEFL mit kinaseaktivem Bcr-Abl in Cos-7-Zellen überexprimiert wurde. Die substantielle Veränderung von Phosphorylierung und Lokalisation von HEFL durch Expression von Bcr-Abl läßt daher eine Beeinträchtigung der Funktion von HEFL vermuten. Dabei würde generell die konstitutive Phosphorylierung von Signalmolekülen des Integrin-Signalwegs durch Bcr-Abl das physiologische Gleichgewicht zwischen phosphoryliertem und nichtphosphoryliertem Zustand stören und eine Dysregulation der vermutlich über Phosphorylierung regulierten Cas-Proteinfunktion hervorrufen. Es gibt Überlegungen, die Bcr-Abl in kausalen Zusammenhang mit der unkontrollierten Proliferation und den „Homing“-Defekten von CML-Vorläuferzellen bringen (Verfaillie *et al.*, 1997). Diese Hypothese wird auch unterstützt durch die teilweise Wiederherstellung des Kontakts von CML-Zellen zu Knochenmarkstromazellen durch Inhibition der Bcr-Abl-Tyrosinkinase (Bhatia *et al.*, 1998). Angesichts der strukturellen und funktionellen Eigenschaften von HEFL und der Interaktion von HEFL mit Bcr-Abl ist es hypothetisch und spekulativ, ob HEFL eine Rolle spielt als Zielmolekül von Bcr-Abl im Zusammenhang mit den für CML-Zellen typischen Adhäsionsdefekten und Kommunikationsstörungen mit umgebenden Knochenmarkstromazellen.

6. Zusammenfassung

Die CML ist eine klonale Stammzellerkrankung, deren Ursache in der Expression der onkogenen, konstitutiv aktiven Tyrosinkinase Bcr-Abl liegt. Das chimäre Fusionsprotein Bcr-Abl entsteht als Folge der reziproken Translokation von Teilen der Chromosomen 9 und 22, die sich zytogenetisch an der Bildung des Philadelphia-Chromosoms, einer verkürzten Form des Chromosoms 22, nachweisen läßt. Die Identifikation der Bindungspartner von Bcr-Abl ist von großem wissenschaftlichem Interesse, um die molekulare Pathogenese der CML auf zellulärer Ebene weiter zu entschlüsseln. Es wurde daher ein modifiziertes *Yeast two-hybrid*-System etabliert, um in der CML-Zelllinie K562 neue, biologisch relevante Interaktionspartner von Bcr-Abl zu identifizieren. Es konnte dabei die phosphotyrosinunabhängige Interaktion von Bcr-Abl mit dem Klon F6 nachgewiesen werden, der eine signifikante Homologie zu dem Cas-Protein HEF1/Cas-L aufweist. Mithilfe der RACE-Methode konnte die vollständige cDNA des Klons F6 kloniert werden. Das kodierende Gen wurde wegen seiner Analogie zu dem Cas-Protein HEF1 HEFL (HEF-Like) genannt.

Northern Blot-Analysen zeigten, daß HEFL ubiquitär in verschiedenen Geweben exprimiert war mit verstärkter Expression in peripheren Blutleukozyten und Milz.

Es wurde ein Antikörper gegen den N-Terminus von HEFL hergestellt. Damit gelang die spezifische Detektion von HEFL als Protein von 105 kD Größe im Western Blot sowie die Immunpräzipitation von endogenem und überexprimiertem HEFL.

In GST-Bindungsstudien und in Koimmunpräzipitationsstudien konnte eine Interaktion von HEFL mit Bcr-Abl sowohl im humanen Zellysat semi-in-vivo bzw. in vivo nachgewiesen werden. Dabei konnte gezeigt werden, daß die Assoziation von HEFL mit Bcr-Abl zumindest teilweise über die SH3-Domäne von HEFL und wahrscheinlich den C-Terminus von Abl im Bcr-Abl-Protein vermittelt wird.

Experimente mit kinaseinaktiven Mutanten von Bcr-Abl bestätigten die in Hefe beobachtete Phosphotyrosinunabhängigkeit der Interaktion von HEFL mit Bcr-Abl. Dabei konnte gezeigt werden, daß HEFL durch die Assoziation mit Bcr-Abl phosphoryliert wird.

In weitergehenden nicht im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studien mit HEFL und Bcr-Abl konnte die Komplexbildung von HEFL mit FAK begleitet von der Phosphorylierung von HEFL gezeigt werden. Durch Stimulation des β 1-Integrinsignalwegs konnte eine Zunahme des Phosphorylierungsgrades von HEFL nachgewiesen werden und HEFL eine potentielle Rolle im Integrinsignalweg und der Transduktion von Signalen der extrazellulären Matrix zugeschrieben werden. In Kollokalisationsstudien mit Bcr-Abl und HEFL wurde ein Umverteilung von HEFL von seiner normalen zytoplasmatischen Anordnung hin zu dem an Aktinfilamenten lokalisierten Bcr-Abl beobachtet.

Die aus der Interaktion von HEFL mit Bcr-Abl resultierenden Veränderungen von Phosphorylierung und Lokalisation von HEFL könnten mit der physiologischen Funktion von HEFL interferieren und somit zu den Adhäsions- und „Homing“-Defekten von CML-Zellen beitragen.

7. Literaturverzeichnis

Agami, R., Blandino, G., Oren, M., Shaul, Y. Interaction of c-Abl and p73 α and their collaboration to induce apoptosis. *Nature* 399 (1999) 809-813

Ahuja, H., Bar-Eli, M., Arlin, Z., Advani, S., Allen, S.L., Goldman, J., Snyder, D., Foti, A., Cline, M. The spectrum of molecular alterations in the evolution of chronic myelocytic leukemia. *J. Clin. Invest.* 87 (1991) 2042-2047

Alexandropoulos, K., Baltimore, D. Coordinate activation of c-Src by SH3- and SH2-binding sites on a novel p130Cas-related protein. *Genes Dev.* 10 (1996) 1341-1355

Bai, R.Y., Jahn, T., Schrem, S., Munzert, G., Weidner, K.M., Wang, J.Y.J., Duyster, J. The SH2-containing adapter protein GRB10 interacts with Bcr-Abl. *Oncogene* 17 (1998) 941-948

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

Baskaran, R.L., Wood, L.D., Whitaker, L.L., Canman, C.e., Morgan, S.E., Wu, Y., Barlow, C., Baltimore, D., Wynshaw-Boris, A., Kastam, M.B. Ataxia telangiectasia mutant protein activates c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation. *Nature* 387 (1997) 516-519

Bassermann, F., Jahn, T., Miething, C., Seipel, P., Bai, R.Y., Coutinho, S., Tybulewicz, V.L., Peschel, C., Duyster, J. Association of Bcr-Abl with the Protooncogen Vav is implicated in activation of the Rac-1 pathway. *J. Bio. Chem.* 277 (2002) 12437-12445

Bhatia, R., Munthe, H.A., Verfaillie, C.M. Tyrphostin AG957, a tyrosine kinase inhibitor with anti Bcr/abl tyrosine kinase activity restores beta1 integrin-mediated adhesion and inhibitory signaling in chronic myelogenous leukemia hematopoietic progenitors. *Leukemia* 12 (1998) 1708-1717

Bergold, P.J., Blumenthal, J.A., D'Andrea, E., Snyder, H.W., Lederman, L., Silverstone, A., Nguyen, H., Besmer, P. Nucleic acid sequence and oncogenic properties of the HZ2 feline sarcoma virus v-abl insert. *J. Virol.* 61 (1987) 1193-1202

Bolen, J.B., Thompson, P.A., Eiseman, E., Horak, I.D. Expression and interaction of the Src family of tyrosine kinases in T-lymphocytes. *Adv. Cancer Res.* 57 (1991) 103-149

Bolen, J.B., Rowley, R.B., Spana, C., Tsygankov, A.Y. The Src family of tyrosine protein kinases in hematopoietic signal transduction. *FASEB J.* 6 (1992) 3403-3409

Boxer L.M. The role of oncogenes in hematologic malignancies. *Annu. Rev. Med.* 45 (1994) 1-11

Branford, S., Rudzki, Z., Walsh, S., Grigg, A., Arthur, C., Taylor, K., Herrmann, R., Lynch, K.P., Hughes, T.P. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood* 99 (2002) 3472-3475

Bresolin, G. Expression und Charakterisierung des Proteins HEFL in verschiedenen Zelllinien. (Diplomarbeit, TU München, Juli 2000)

Briscoe, J.D., Guschin, D., Müller, M. Signal transduction. Just another signalling pathway. *Curr. Biol.* 4 (1994) 1033-1035

Brunet, A. Signal transduction from the membrane to the nucleus. Variations on common themes. *Bull. Cancer* 85 (1998) 527-537

Carlesso, N., Frank, D.A., Griffin, J.D. Tyrosyl phosphorylation and DNA binding activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cell lines transformed by Bcr/Abl. *J. Exp. Med.* 183 (1996) 811-820

Chan, L.C., Karhi, K.K., Rayter, S.I., Heisterkamp, N., Eridani, S., Powles, R., Lawler, S.D., Groffen, J., Foulkes, J.D., Greaves, M.F., Wiedemann, L.M. A novel abl protein expressed in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Nature* 325 (1987) 635-637

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

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

Coutinho, S., Jahn, T., Lewitzky, M., Feller, S., Hutzler, P., Peschel, C., Duyster, J. Characterisation of Grb4, an adapter protein interacting with Bcr-Abl. *Blood* 96 (2000) 618-624

Daley, G.Q., Van Etten, R.A., Baltimore, D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the p210bcr/abl gene of the Philadelphia Chromosome. *Science* 247 (1990) 824-830

Daley, G.Q., Ben-Neriah, Y. Implicating the bcr/abl gene in the pathogenesis of Philadelphia chromosome-positive human leukemia. *Advances in Cancer Research* 57 (1991) 151-184

De Jong, R., ten Hoeve, J., Heisterkamp, N., Groffen, J. Tyrosine 207 in CRKL is the BCR/ABL phosphorylation site. *Oncogene* 6 (1997) 507-513

Druker, B.J. and for the IRIS (International Randomized IFN vs STI571) Study Group. *Proc. Am. Soc. Clin. Onc.* 21 (2002) 1a

Duyster, J., Baskaran, R., Wang, J.Y.J. Src homology 2 domain as a specificity determinant in the c-abl-mediated tyrosine phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyl-terminal repeated domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 1555-1559

Fantl, W.F., Johnson, D.E., Williams, L.T. Signalling by receptor tyrosine kinases. *Ann. Rev. Biochem.* 62 (1993) 453-481

Feller S.M., Knudsen, B., Wong, T.W., Hanafusa, H. Detection of SH3-binding proteins in total cell lysates with glutathion S-transferase-SH3 fusion proteins: SH3-blot assay. *Methods Enzymol* 255 (1995) 369-378

Franz, M.W., Berger, P., Wang, J.Y.J. Deletion of a N-terminal regulatory domain of c-abl tyrosine kinase activates its oncogenic potential. *EMBO J.* 8 (1989) 137-147

Goff, S.P., Gilboa, E., Witte, O.N., Baltimore, D. Structure of the Abelson murine leukemia virus genome and the homologous cellular gene: studies with cloned viral DNA. *Cell* 22 (1980) 777-785

Golde, D.W., Champlin, R.E. Chronic myelogenous leukemia: Recent advances. *Blood* 65 (1985) 1039-1047

Golub, T.R., Goga, A., Barker, G.F., Afar, D.E., McLaughlin, J., Bohlander, S.K., Rowley, J.D., Witte, O.N., Gilliland, D.G. Oligomerization of the ABL tyrosine kinase by the ets protein TEL in human leukemia. *Mol Cell Biol* 16 (1996) 4107-4116

Gong, J.G., Costanzo, A., Yang, H.Q., Melino, G., Kaelin, W.G., Levrero, M., Wang, J.Y.J. The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature* 399 (1999) 806-809

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

Heldin, C.H. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80 (1995) 213-223

Herold, G. Chronisch myeloische Leukämie. In „Innere Medizin“, Herold, G. (Hrsg.), 50737 Köln, 2001, 79-82

Hochhaus, A., Kreil, S., Corbin, A.S., La Rosée, P., Müller, M.C., Lahaye, T., Hanfstein, B., Schoch, C., Cross, N.C.P., Berger, U., Gschaidmeier, H., Druker, B.J., Hehlmann, R. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia* 16 (2002) 2190-2196

Hoover, R.R., Mahon, F.X., Melo, J.V., Daley, G.Q. Overcoming STI571 resistance with the farnesyl transferase inhibitor SCH66336. *Blood* 100 (2002) 1068-1071

Hughes, T.P., Kaeda, J., Branford, S., Rudzki, Z., Hochhaus, A., Hensley, M.L., Gathmann, I., Bolton, A.E., van Hoomissen, I.C., Goldman, J.M., Radich, J.P. International Randomized Study of IFN vs STI571 (IRIS) Study Group. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *NEJM* 349 (2003) 1423-1432

Hunter, T. Oncoprotein Networks. *Cell* 88 (1997) 333-346

Johansson, B., Fioretos, T., Mitelman, F. Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. *Acta Haematol.* 107 (2002) 76-94

Kantarjian, H.M., Deisseroth, A., Kurzrock, R., Estrov, Z., Talpaz, M. Chronic myelogenous leukemia: A concise update. *Blood* 82 (1993) 691-703

Kashige, N., Carpino, N., Kobayashi, R. Tyrosine phosphorylation of p62^{dok} by p210^{bcr-abl} inhibits RasGAP activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 2093-2098

Kelliher, M.A., McLaughlin, J., Witte, O.N., Rosenberg, N. Induction of a chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with v-abl and BCR-ABL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 6649-6653

Kern, S.E., Vogelstein, B.: Genetic alterations in colorectal tumors, pp 577-584. In: *Origin of Human Cancer*. Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor 1991

Kipreos, E.T., Lee, G.J., Wang, J.Y.J. Isolation of temperature-sensitive tyrosine kinase mutants of v-abl oncogene by screening with antibodies for phosphotyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 1345-1349

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

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

Klucher, K.M., Lopez, D.V., Daley, G.Q. Secondary mutation maintains the transformed state in BaF3-cells with inducible Bcr/Abl expression. *Blood* 91 (1998) 3927-3934

Knippers, R. *Molekulare Genetik*. Thieme, 70469 Stuttgart, 7. Auflage (1997)

Konopka, J.P., Watanabe, S.M., Singer, J.W., Collins, S.J., Witte, O.N. Cell lines and clinical isolates derived from PH1-positive chronic myelogenous leukemia patients express c-abl proteins with a common structural alteration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 1810-1814

Kozak, M. Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation. *Mamm Genome*. 7 (1996) 563-574

Kurzrock, R., Gutterman, J.U., Talpaz, M. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *NEJM* 319 (1988) 990-998

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680-685

Law, S.F., Zhang, Y.Z., Klein-Szanto, A.J.P., Golemis, E.A. Cell cycle-regulated processing of HEF1 to multiple protein forms differentially targeted to multiple subcellular compartments. *Mol. Cell. Biol.* 18 (1998) 3540-3551

Law, S.F., Zhang, Y.Z., Fashena, S.J., Toby, G., Estojak, J., Golemis, E.A. Dimerization of the docking/adaptor protein HEF1 via a carboxy-terminal helix-loop-helix domain. *Exp. Cell Res.* 252 (1999) 224-235

Lemmon, M.A., Ferguson, K.M., Schlessinger, J. PH domains: diverse sequences with a common fold recruit signaling molecules to the cell surface. *Cell* 85 (1996) 621-624

Lewis, J.M., Baskaran, R., Taagepera, S., Schwartz, M.A., Wang, J.Y.J. Integrin regulation of c-Abl tyrosine kinase activity and cytoplasmic-nuclear transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 15174-15179

Lewis, J.M., Schwartz, M.A. Integrins regulate the association and phosphorylation of paxillin by c-Abl. *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 14225-14230

Li, F.P.: Molecular epidemiology of familial cancers. In: Brugge, J., T. Curran, E. Harlow, F. McCormick: *Origin of Human Cancer*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1991

Lowenstein, E.J., Daly, R.J., Batzer, A.G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E.Y., Bar, S.D., Schlessinger, J. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* 70 (1992) 431-442

Lugo, T.G., Witte O.N. The Bcr-Abl oncogene transforms Rat-1 cells and cooperates with v-myc. *Mol. Cell. Biol.* 9 (1989) 1263-1270

Lugo, T.G., Pendergast, A.M., Muller, A.J., Witte, O.N. The tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* 247 (1990) 1079-1082

Manié S.N., Beck, A.R.P., Astier, A., Law, S.F., Canty, T., Hirai, H., Druker, B.J., Avraham, H., Haghayeghi, N., Sattler, M., Salgia, R., Griffin, J.D., Golemis, E.A., Freedman, A.S. Involvement of p130(Cas) and p105(HEF1), a novel Cas-like docking-protein, in a cytoskeleton-dependent signaling pathway initiated by ligation of integrin or antigen receptor on human B cells. *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 4230-4236

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

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

McWhirter, J.R., Wang, J.Y.J. An actin-binding function contributes to transformation by the Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *EMBO J.* 12 (1993b) 1533-1546

McWhirter, J.R., Wang, J.Y.J. Effects of Bcr sequences on the cellular function of the Bcr-Abl oncoprotein. *Oncogene* 15 (1997) 1625-1634

Melo, J.V. The diversity of Bcr-Abl fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* 7 (1996) 2375-2384

Million, R.P., Van Etten, R.A. The Grb2 binding site is required for induction of chronic myeloid leukemia-like disease in mice by the Bcr/Abl tyrosine kinase. *Blood* 96 (2000) 664-670

Mitani, K. Chromosomal abnormalities and oncogenes. *Int. J. Hematol.* 63 (1996) 81-93

Mitelman, F. The cytogenetic scenario of chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 11 (1993) 11-15

Morris, S.W., Kirstein, M.N., Valentine, M.B., Dittmar, K.G., Shapiro, D.N., Saltman, D.N., Look, A.T. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in Non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 263 (1994) 1281-1284

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Ehrlich, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51 (1986) 263-273

Musacchio, A., Gibson, T., Rice, P., Thompson J., Saraste, M. The PH domain: a common piece in the structural patchwork of signalling proteins. *Trends Biochem Sci.* 18 (1993) 343-348

Nowell, P.C., Hungerford, D.A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 132 (1960) 1497

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

Papadopoulos, P., Ridge, S.A., Boucher, C.A., Stocking, C., Wiedemann, L.M. The novel activation of ABL by fusion to an ets-related gene, TEL. *Cancer Res* 55 (1995) 34-38

Pawson, T., Schlessinger, J. SH2 and SH3 domains. *Curr.Biol.* 3 (1993) 434-442

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

Pendergast, A.M., Gishizky, M.L., Havlik, M.K., Witte, O.N. SH1 domain autophosphorylation of p210 Bcr-Abl is required for transformation but not growth factor independence. *Mol. Cell. Biol.* 13 (1993) 1728-1736

Pendergast, A.M., Quilliam, L.A., Cripe, L.D., Bassing, C.H., Dai, Z., Li, N., Batzer, A., Rabun, K.M., Der, C.J., Schlessinger, J., Gishizki, M.L. BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the Grb2 adaptor protein. *Cell* 75 (1993) 175-185

- Pendergast, A.M. BCR/ABL protein domain function and signaling. In: "Chronic myeloid leukaemia. Biology and Treatment", Carella, A., Daley, G., Eaves, C., Goldman, J., Hehlmann, R. (Hrsg.), (2001) 19-39
- Petch, L.A., Bockholt, S.M., Bouton, A., Parsons, J.T., Burridge, K. Adhesion-induced tyrosine phosphorylation of the p130src substrate. *J. Cell Sci.* 108 (1995) 1371-1379
- Polte, T.R., Hanks, S.K. Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130^{Cas}. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92 (1995) 10678-10682
- Puil, L., Liu, J., Gish, G., Mbamalu, G., Bowtel, D., Pelicci, P.G., Arlinghaus, R., Pawson, T. Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *EMBO J.* 13 (1994) 764-773
- Quackenbush R.C., Reuther G.W., Miller J.P., Courtney, K.D., Pear, W.S., Pendergast, A.M. Analysis of the biologic properties of p230 Bcr-Abl reveals unique and overlapping properties with the oncogenic p185 and p210 Bcr-Abl tyrosine kinases. *Blood* 95 (2000) 2913-2921
- Rabbitts, T.H. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 372 (1994) 143-149
- Raitano, A.B., Halpern, J.R., Hambuch, T.M., Sawyers, C.L. The Bcr-Abl leukemia oncogene activates Jun kinase and requires Jun for transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 11746-11750
- Ren, R., Ye, Z.S., Baltimore, D. Abl protein-tyrosine kinase selects the Crk adapter as a substrate using SH3-binding sites. *Genes. Dev.* 8 (1994) 783-795
- Rickles, R.J., Botfield, M.C., Weng, Z., Taylor, J.A., Green, O.M., Brugge, J.S., Zooler, M.J. Identification of Src, Fyn, Lyn, PI3K and Abl SH3 domain ligands using phage display libraries. *EMBO J.* 13 (1994) 5598-5604
- Roche-Lestienne, C., Soenen-Cornu, V., Gardel-Duflos, N., Lai, J.L., Philippe, N., Facon, T., Fenaux, P., Peudhomme, C. Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to ST1571, and they can preexist to the onset of treatment. *Blood* 100 (2002) 1014-1018

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

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

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

Salgia, R., Li, J.-L., Lo, S.H., Brunkhorst, B., Kansas, G.S., Sobhany, E.S., Sun, Y., Pisick, E., Hallek, M., Ernst, T., Tantravahi, R., Chen, L.B., Griffin, J.D. Molecular cloning of human Paxillin, a focal adhesion protein phosphorylated by p210^{BCR/ABL}. *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 5039-5047

Salgia, R., Pisick, E., Sattler, M., Li, J.L., Uemura, N., Wong, W.K., Burky, S.A., Hirai, H., Chen, L.B., Griffin, J.D. p130^{Cas} forms a signaling complex with the adapter protein CRKL in hematopoietic cells transformed by the Bcr/Abl oncogene. *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 25198-25203

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2. Auflage

Sattler, M., Mohi, M.G., Pride, Y.B., Quinnan, L.R., Malouf, N.A., Podar, K., Gesbert, F., Iwasaki, H., Li, S., Van Etten, R.A., Gu, H., Griffin, J.D., Neel, B.G. Critical role for Gab2 in transformation by Bcr/Abl. *Cancer Cell* 1 (2002) 479-492

Sawyers, C.L., Callahan, W., Witte, O.N. Dominant negative MYC blocks transformation by ABL oncogenes. *Cell* 70 (1992a) 901-910

Sawyers, C.L. The bcr-abl gene in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Surv* 15 (1992b) 37-51

Sawyers, C.L., Denny, C.T. Chronic myelomonocytic leukemia: Tel-a-kinase what Ets all about. *Cell* 77 (1994) 171-173

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

Schaller, M.D., Parsons, J.T. pp125FAK-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin creates a high-affinity binding site for crk. *Mol. Cell. Biol.* 15 (1995) 2635-2645

Schlessinger, J., Ullrich, A. Growth factor signalling by receptortyrosine kinases. *Neuron* 9 (1992) 383-391

Shah, N.P., Nicoll, J.M., Nagar, B., Gorre, M.E., Paquette, R.L., Kuriyan, J., Sawyers, C.L. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2 (2002) 117-125

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

Silver, R.T. Chronic myeloid leukemia – A perspective of the clinical and biological issues of the chronic phase. *Hematol Oncol Clin North Am* 4 (1990) 319-335

Skorski, T., Nieborowska-Skorska, M., Szczylik, C., Kanakaraj, P., Perrotti, D., Zon, G., Gewirtz, A., Perussia, B., Calabretta, B. c-Raf-1 serine/threonine kinase is required in Bcr/Abl-dependent and normal hematopoiesis. *Cancer Res* 55 (1995) 2275-2278

Skorski, T., Bellacosa, A., Nieborowska-Skorska, M., Majewski, M., Martinez, R., Choi, J.K., Trotta, R., Wlodarski, P., Perrotti, D., Chan, T.O., Wasik, M.A., Tschlis, P.N., Calabretta, B. Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3K/Akt-dependent pathway. *EMBO J.* 16 (1997) 6151-6161

Skorski, T., Wlodarski, P., Daheron, L., Salomoni, P., Nieborowska-Skorska, M., Majewski, M., Waski, M., Calabretta, B. BCR/ABL-mediated leukemogenesis requires the activity of the small GTP-binding protein Rac. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 11858-11862

Skourides, P.A., Perera, S.A., Ren, R. Polarized distribution of Bcr-Abl in migrating myeloid cells and co-localization of Bcr-Abl and its target proteins. *Oncogene* 18 (1999) 1165-1176

Solomon, E., Borrow, J., Goddard, A.D. Chromosome aberrations and cancer. *Science* 22 (1991) 1153-1160

Songyang, Z., Shoelson, S.E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W.G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., Lechleider, R.J., Neel, B.G., Birge, R.B., Fajardo, J. E., Chou, M.M., Hanfusa, H., Schaffhausen, B., Cantley, L.C. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 72 (1993) 767-778

Staib, P., Diehl, V., Zankovich, R. Chronisch myeloproliferative Erkrankungen. In: „Innere Medizin“, Classen, M., Diehl, V., Kochsiek, K. (Hrsg.), Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 1998, 4. Auflage, 219-233

Stern, D.F., Kamps, M.P., Lao, H. Oncogenic activation of p185^{neu} stimulates tyrosine phosphorylation in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 8 (1988) 3969-3973

Schwartzberg, P.L., Stall, A.M., Hardin, J.D., Bowdish, K.S., Humaran, T., Boast, S., Harbison, M.L., Roberson, E.J., Goff, S.P. Mice homozygous for the ablTm1Y mutation show poor viability and depletion of selected B and T cell populations. *Cell* 65 (1991) 1165-1175

Tachibana, K., Urano, T., Fujita, H., Ohashi, Y., Kamiguchi, K., Iwata, S., Hirai, H., Morimoto, C. Tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrates by focal adhesion kinase. A putative mechanism for the integrin-mediated tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrates. *J. Biol. Chem.* 14 (1997) 29083-29090

Tauchi, T., Boswell, H.S., Leibowitz, D., Broxmeyer, H.E. Coupling between p210bcr-abl and Shc and Grb2 adaptor proteins in hematopoietic cells permits growth factor receptor-independent link to Ras activation pathway. *J. Exp. Med.* 179 (1994) 167-175

Tauchi, T., Feng, G.-S., Shen, R., Song, H.Y., Donner, D., Pawson, T., Broxmeyer, H.E. SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp is a target of p210bcr-abl tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 15381-15387

Tybulewicz, V.L.J., Crawford, C.E., Jackson, P.K., Bronson, R.T., Mulligan, R.C. Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl protooncogene. *Cell* 65 (1991) 1153-1163

Ullrich, A., Schlessinger, J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61 (1990) 203-212

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

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

Verfaillie, C.M., Hurley, R., Zhao, R.C., Prosper, F., Delforge, M., Bhatia, R. Pathophysiology of CML: do defects in integrin function contribute to the premature circulation and massive expansion of the Bcr/Abl positive clone? *J. Lab. Clin. Med.* 129 (1997) 584-591

Von Bubnoff, N., Schneller, F., Peschel, C., Duyster, J. BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia-chromosome-positive chronic myeloid leukaemia to STI571: a prospective study. *Lancet* 359 (2002) 487-491

Wang, J.Y.J., Queen, C., Baltimore, D. Expression of an Abelson murine leukemia virus-encoded protein in *Escherichia coli* causes extensive phosphorylation of tyrosine residues. *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 13181-13184

Wang, J.Y.J., Ledley, F., Goff, S., Lee, R., Groner, Y., Baltimore, D. The mouse c-abl locus: Molecular cloning and characterization. *Cell* 36 (1984) 349-356

Wang, J.Y.J. Abl tyrosine kinase in signal transduction and cell-cycle regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3 (1993) 35-43

Weidner, K.M., Di, C.S., Sachs, M., Brinkmann, V., Behrens, J., Birchmeier, W. Interaction between Gab1 and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis. *Nature* 384 (1996) 173-176

Weiner, D.B., Liu, J., Cohen, J.A., Williams, W.V., Greene, M. A point mutation in the neu oncogene mimics ligand induction of receptor aggregation. *Nature* 339 (1989) 230-231

Welch, P.J., Wang, J.Y.J. A C-terminal protein-binding domain in the retinoblastoma protein regulate nuclear c-Abl tyrosine kinase in the cell cycle. *Cell* 75 (1993) 779-790

Wertheim, J.A., Miller, J.P., Xu, L., He, Y., Pear, W.S. The biology of chronic myelogenous leukemia: mouse models and cell adhesion. *Oncogene* 21 (2002) 8612-8628

Yuan, Z.M., Shioya, H., Ishiko, T., Sun, X., Gu, J., Huang, Y.Y., Lu, H., Kharbanda, S., Weichselbaum, R., Kufe, D. p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature* 399 (1999) 814-817

Yunis, J.J., Tanzer, J. Molecular mechanisms of hematologic malignancies. *Crit. Rev. Oncog.* 4 (1993) 161-190

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Zytogenetik der CML (nach Kurzrock <i>et al.</i> , 1988; Rabbitts, 1994).....	7
Abb. 2:	Phasenhafter Verlauf der Ph ⁺ - CML (nach Staib <i>et al.</i> , 1998).....	8
Abb. 3:	Inhibitionsmechanismen (-) der c-Abl Tyrosinkinase (nach Wang, 1993).....	12
Abb. 4:	Schematische Darstellung der Domänenstruktur von c-Abl.....	13
Abb. 5:	Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Bcr-Abl.....	14
Abb. 6:	Schematische Darstellung der Domänenstruktur von c-Abl, c-Bcr und Bcr-Abl (nach Pendergast, 2001).....	15
Abb. 7:	Zielproteine der Bcr-Abl-Tyrosin-Kinase (nach Pendergast, 2001).....	16
Abb. 8:	Schematische Darstellung der PCR-Mutagenese mittels „Site directed mutagenesis“.....	34
Abb. 9:	RACE (Rapid Amplification of cDNA ends).....	36
Abb. 10:	Schematische Darstellung von Primern und cDNA-Matrize bei der RACE-Methode	38
Abb. 11:	Schematische Darstellung des modifizierten <i>Yeast-Two-Hybrid-Systems</i>	51
Abb. 12:	Die Interaktion von F6/HEFL und Bcr-Abl ist nicht an die Tyrosinkinaseaktivität von Bcr-Abl gebunden.....	55
Abb. 13:	Vergleich der Sequenz von HEFL mit der Sequenz von HEF1.....	56
Abb. 14:	3'-RACE.....	57
Abb. 15:	Schematische Darstellung der DNA-Sequenz der beiden Spleißvarianten von HEFL.....	58
Abb. 16:	5'-RACE verifiziert das Start-Codon von HEFL.....	59
Abb. 17:	Schematische Darstellung der Homologiewerte verschieden langer Sequenz- abschnitte von F6/HEFL und schematische Darstellung der Klonierung der K562-cDNA-Bibliothek in den Vektor pAKT2.....	61
Abb. 18:	Ein Northern Blot ergibt zwei HEFL-Transkripte von ca. 3 und 5 kb.....	63
Abb. 19:	Die von der kompletten cDNA von HEFL kodierte Aminosäuresequenz(785 AS).64	
Abb. 20:	Schematische Darstellung der Domänenstruktur von HEFL und HEF1/Cas-L mit Angabe der Homologiewerte entsprechender Domänen in Prozent.....	64
Abb. 21:	Ein polyklonaler Kaninchen-anti-HEFL-Antikörper erkennt HEFL im Western Blot.....	66
Abb. 22:	Der polyklonale Kaninchen-anti-HEFL-Antikörper erkennt HEFL als 105 KD großes Protein im Western Blot verschiedener Zell-Lysate.....	67
Abb. 23:	Der anti-HEFL-Antikörper detektiert HEFL in Zellen von Patienten mit CML.....	67
Abb. 24:	Der anti-HEFL-Antikörper präzipitiert HEFL in Cos-1-Zellysaten.....	68

Abb. 25: Die SH3-Domäne von HEFL vermittelt die Bindung an Bcr-Abl und cAbl.....	69
Abb. 26: HEFL interagiert mit Bcr-Abl (Kin ⁺) in einem Koimmunpräzipitationsexperiment...	70
Abb. 27: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von HEFL.....	71
Abb. 28: HEFL interagiert nicht mit der Abl-SH3-Domäne in einem GST-Bindungs- Experiment.....	72
Abb. 29: Schematische Darstellung des Bindungsmechanismus der Interaktion von HEFL und Bcr-Abl.....	73
Abb. 30: Eine SH3-Mutante von HEFL interagiert mit Bcr-Abl (Kin ⁺).....	74
Abb. 31: Die Interaktion von HEFL mit Bcr-Abl(Wt) führt zur Phosphorylierung von HEFL.	76

9. Danksagung

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Christian Peschel, der mir das erforderliche Umfeld mit hervorragenden Arbeitsbedingungen im hämatologischen Forschungslabor des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München zur Verfügung gestellt und mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Justus Duyster, der mir das Thema bereitgestellt und diese Arbeit mit hervorragender Fachkompetenz zu jeder Zeit wissenschaftlich betreut sowie es verstanden hat, durch seine faszinierende und energische Begeisterung an der Sache eine große Motivation zu vermitteln.

Ebenso herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Thomas Jahn, für seine vorzügliche Anleitung beim Erlernen der Arbeitstechniken und die stete Betreuung und Hilfestellung bei allen Experimenten und wissenschaftlichen Fragestellungen.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Florian Bassermann, Herrn Dr. Cornelius Miething, Herrn Jochen Metzger für wertvolle Hilfen bei der Anfertigung dieser Arbeit und ihre gute Laune, die ein angenehmes Arbeitsklima erzeugt hat, sowie bei Frau Dr. Sunita Coutinho und Herrn Dr. Ren-Yuan Bai für ihre selbstverständliche Hilfestellung bei der Arbeit im Labor. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Frau Petra Seipel, Frau Dr. Susanne Urschel, Frau Claudia Mugler und Herrn Darioush Shirvani, die mir alle immer hilfsbereit zur Seite standen.

Ein herzliches Dankeschön auch an alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Bernhard für die freundschaftliche Zusammenarbeit und ein gutes Arbeitsklima.

An dieser Stelle richte ich meinen ganz persönlichen Dank auch an meine Eltern. Sie haben mir meine langjährige Ausbildung ermöglicht. Ohne ihr Verständnis und ihre zu jeder Zeit großzügige volle Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.