

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Die biologischen Effekte des Zellzyklusregulators  
p21<sup>Waf1/Cip1</sup> auf Proliferation und Apoptose  
Philadelphia-positiver Leukämien**

Karin Forster  
aus  
Kösching

2004

### **Erklärung**

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von PD Dr. Haralabos Zorbas betreut.

### **Ehrenwörtliche Versicherung**

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, 04.01.2004

Karin Forster

Dissertation eingereicht am:

Erstgutachter: Prof. Dr. Michael Hallek

Zweitgutachter: PD Dr. Haralabos Zorbas

Mündliche Prüfung am: 15.03.2004

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 1999 bis Dezember 2003 in der KKG Genterapie an der GSF unter Anleitung von Prof. Dr. Michael Hallek angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Forster K, Obermeier A, Mitina O, Simon N, Warmuth M, Hallek M. "The cell cycle regulatory protein p21 (Waf1/Cip1) attenuates both proliferation and drug-induced apoptosis in Bcr-Abl transformed murine bone marrow cells." Manuskript eingereicht

Schuster C, Forster K, Dierks H, Elsässer A, Behre G, Simon N, Danhauser-Riedl S, Hallek M, Warmuth M. „The effects of Bcr-Abl on C/EBP transcription-factor regulation and neutrophilic differentiation are reversed by the Abl kinase inhibitor imatinib mesylate.“ *Blood* 2003 Jan 15;101(2): 655-63

## **Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Hallek für die Ermöglichung der Durchführung meiner Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe. Ich bedanke mich für sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit und für seine kontinuierliche Unterstützung. Besonders danke ich ihm auch, dass er mir die Teilnahme an nationalen und internationalen Kongressen ermöglicht hat.

Herrn PD Dr. Haralabos Zorbas gilt mein besonderer Dank für seine Bereitschaft, meine Dissertation vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie zu vertreten.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Markus Warmuth und Dr. Axel Obermeier für ihre vielen hilfreichen Ratschläge und ihr stetes Interesse am Fortgang der Arbeit bedanken.

Ferner bedanke ich mich ganz herzlich bei Dr. Michael Schaeffer für die schnelle und effektive Korrektur meiner Doktorarbeit.

Ich bedanke mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Hallek an der GSF und im Genzentrum für die freundliche Zusammenarbeit und stete Hilfsbereitschaft. Ganz besonders möchte ich mich dabei für die herzliche Arbeitsatmosphäre und die kollegiale Zusammenarbeit bei allen Mitgliedern der „Signaltransduktions- und Immuntherapiegruppe“ bedanken.

Besonders dankbar bin ich für die Freundschaften die während der letzten Jahre mit aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Hallek und mit weiteren Mitarbeitern der GSF und des Genzentrums entstanden sind. Sie haben vor allem die anstrengenden Zeiten wesentlich erleichtert.

Ganz besonders danke ich meinem Freund Christoph für seinen Beistand in schweren Stunden, aber auch für jede Menge Spaß in vielen guten Zeiten.

*Im Gedenken an meine Eltern.*

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1 Bcr-Abl-positive Leukämien .....</b>	<b>4</b>
1.1.1 Die molekulare Anatomie der Philadelphia-Translokation.....	4
1.1.2 Das klinische Erscheinungsbild und die Epidemiologie Ph-positiver Leukämien.....	5
<b>1.2 Die biologischen Funktionen des Onkoproteins Bcr-Abl .....</b>	<b>6</b>
1.2.1 Der Einfluss von Bcr-Abl auf die Proliferation und den Zellzyklus.....	7
1.2.2 Der Einfluss von Bcr-Abl auf die Differenzierung hämatopoetischer Zellen.....	9
1.2.3 Der Einfluss von Bcr-Abl auf die Apoptose .....	10
1.2.4 Bcr-Abl vermittelt Resistenz gegen Medikament-induzierte Apoptose.....	12
<b>1.3 Therapie Bcr-Abl positiver Leukämien .....</b>	<b>12</b>
1.3.1 Konventionelle Therapieansätze bei CML und ALL.....	12
1.3.2 Der Tyrosinkinase-Inhibitor STI571 .....	13
1.3.3 Mechanismen der Resistenz gegen STI571 .....	13
<b>1.4 p21<sup>Cip1/Waf1</sup>: Ein multifunktionelles Protein .....</b>	<b>15</b>
1.4.1 Die molekulare Anatomie von p21 .....	15
1.4.2 Die Rolle von p21 in der Proliferation und im Zellzyklus.....	16
1.4.3 Die Funktion von p21 für das Überleben der Zelle und die Apoptose- Resistenz.....	17
1.4.4 Die Rolle von p21 in der Differenzierung der Zelle .....	19
1.4.5 Die Regulation der Funktion von p21 .....	19
1.4.6 Die Rolle von p21 in der Tumorentstehung: Tumorsuppressor oder Onkogen? .....	20
<b>2 ZIELE DER ARBEIT.....</b>	<b>22</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1 Material.....</b>	<b>23</b>
3.1.1 Mausstämme.....	23
3.1.2 Zelllinien .....	23

3.1.3	Bakterienstämme .....	24
3.1.4	Vektoren .....	24
3.1.5	Zellkulturmedien .....	25
3.1.6	Chemikalien, Enzyme, Antikörper .....	25
3.1.7	Geräte und Labormaterial .....	28
<b>3.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>30</b>
3.2.1	Eukaryontische Zellkultur .....	30
3.2.2	Produktion von rekombinantem Retrovirus .....	32
3.2.3	Retrovirale Infektion .....	33
3.2.4	Transfektionsverfahren eukaryotischer Zellen.....	34
3.2.5	Kultivierung von Bakterien .....	35
3.2.6	Molekularbiologische Methoden.....	37
3.2.7	Proteinbiochemische Methoden .....	39
3.2.8	Proteinimmunologische Methoden .....	43
3.2.9	Enzymatische <i>in-vitro</i> -Assays .....	46
3.2.10	Zellbasierende Analyse-Methoden.....	47
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>51</b>
<b>4.1</b>	<b>Der Einfluss von Bcr-Abl auf die Expression von p21 in hämatopoetischen Zellen..</b>	<b>51</b>
4.1.1	Die Expression von Bcr-Abl erhöht die Expression von p21 in 32D-Zellen.....	51
4.1.2	Konstruktion einer induzierbaren 32D-Zelllinie: 32Dtet b/a .....	52
4.1.3	Die Expression von p21 wird in Abhängigkeit von Bcr-Abl reversibel hochreguliert.....	59
4.1.4	Die Expression von p21 wird durch die Kinaseaktivität von Bcr-Abl reguliert .....	60
<b>4.2</b>	<b>Der Einfluss von Bcr-Abl auf die zelluläre Lokalisation von p21.....</b>	<b>65</b>
4.2.1	Die Bcr-Abl-abhängige Lokalisation von p21 in Cos7-Zellen .....	65
4.2.2	Die Bcr-Abl-abhängige Lokalisation von p21 in 32D-Zellen.....	67
<b>4.3</b>	<b>Die biologische Funktion von p21 in der Proliferation Bcr-Abl-positiver Zellen .....</b>	<b>69</b>
4.3.1	In Bcr-Abl-transformierten Knochenmarkzellen verlangsamt p21 die Proliferation.....	71
4.3.2	In Bcr-Abl-positiven Zellen verlangsamt p21 die DNA-Synthese .....	74

---

<b>4.4 Die biologische Rolle von p21 in der Medikament-induzierten Apoptose in Bcr-Abl positiven hämatopoetischen Zellen .....</b>	<b>75</b>
4.4.1 p21 reduziert die STI571-induzierte Apoptose in Bcr-Abl-positiven Knochenmarkzellen.....	75
4.4.2 p21 reduziert die Taxol-induzierte Apoptose in Bcr-Abl-positiven Knochenmarkzellen.....	79
<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>81</b>
<b>5.1 Bcr-Abl aktiviert die Expression des Zellzyklusinhibitors p21<sup>Waf1/Cip1</sup> .....</b>	<b>81</b>
<b>5.2 p21<sup>Waf1/Cip1</sup> reduziert die Proliferation Bcr-Abl-positiver Zellen.....</b>	<b>82</b>
<b>5.3 p21<sup>Waf1/Cip1</sup> reduziert die STI571- und Taxol-induzierte Apoptose in Bcr-Abl-positiven Zellen.....</b>	<b>85</b>
<b>5.4 Eine duale Rolle von p21<sup>Waf1/Cip1</sup> in Bcr-Abl-positiven Zellen.....</b>	<b>86</b>
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>89</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>90</b>
<b>8 LEBENS LAUF.....</b>	<b>102</b>

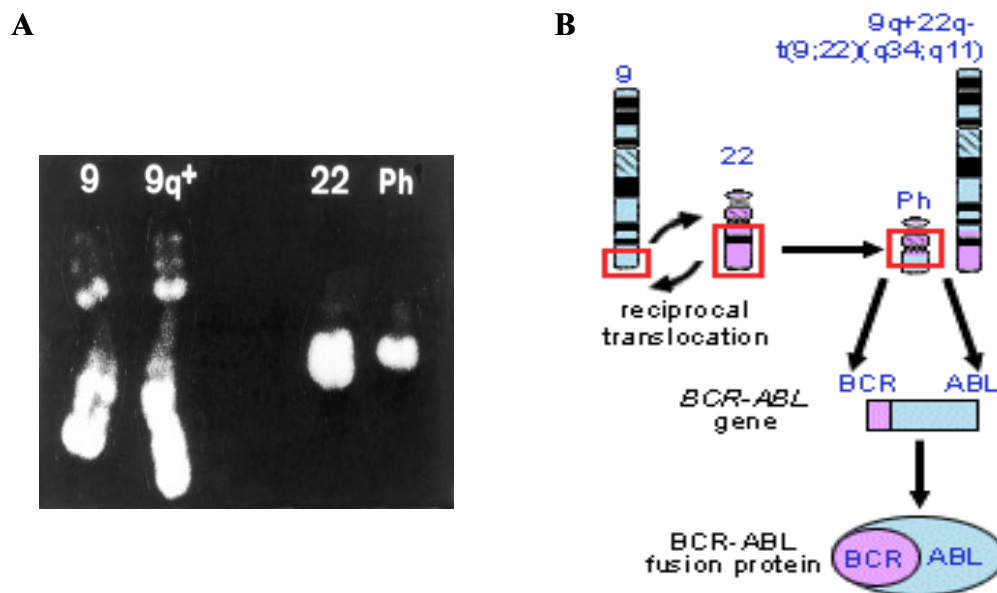


# 1 Einleitung

## 1.1 Bcr-Abl-positive Leukämien

### 1.1.1 Die molekulare Anatomie der Philadelphia-Translokation

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



**Abbildung 1: Die molekulare Anatomie der Philadelphia-Translokation**

A) Chromosom 9 und 22 wurden mittels Bandentechnik angefärbt. (Heisterkamp und Groffen, 2002).  
 B) Schematische Darstellung der Philadelphia Translokation mit dem resultierenden Genprodukt und dem Bcr-Abl Fusionsprotein (Genes and Disease, NCBI).

Die Fusion von *c-abl* und *bcr* führt zu einer konstitutiven Aktivierung der Abl-Tyrosinkinase. Zahlreiche Experimente in Zellkultur und in Tiermodellen konnten zeigen, dass diese Aktivierung von c-Abl durch die Fusion mit Bcr für die transformierende und leukämogene Potenz von Bcr-Abl wichtig ist. Bei der Philadelphia-Translokation können sowohl in *c-abl* als auch in *bcr* verschiedene Bruchpunkte beteiligt sein, so dass am Ende Fusions- oder Hybridgene unterschiedlichen Ausmaßes entstehen. Je nach Bruchpunkt können drei verschiedene Bcr-Abl Isoformen entstehen, die nach ihrem Molekulargewicht benannt werden: p185, p210 und p230. Interessanter Weise tragen diese unterschiedlichen Bcr-Abl-Hybride zumindest zum Teil zu unterschiedlichen leukämischen Phänotypen bei.

## **1.1.2 Das klinische Erscheinungsbild und die Epidemiologie Ph-positiver Leukämien**

### **1.1.2.1 Bcr-Abl induziert die chronische myeloische Leukämie (CML)**

Die CML betrifft in erster Linie ältere Menschen. Das mittlere Alter bei Erstdiagnose liegt bei 45-55 Jahren. Die Inzidenz der Erkrankung liegt bei 1-2 Fällen pro 100.000 Einwohner. Biologisch gesehen ist die CML definiert als eine klonale, myeloproliferative Erkrankung ausgehend von einer hämatopoetischen Stammzelle. Entsprechend dieses Ursprungs kommt es nicht nur zur malignen Expansion granulözytärer Zellen, sondern auch monozytäre, megakaryozytäre sowie lymphatische Zellreihen sind am Krankheitsgeschehen beteiligt (Fialkow et al., 1977). Neben einer Vermehrung dieser Zellen im peripheren Blut findet man eine deutliche myeloische Hyperplasie des Knochenmarks. In der klinischen Symptomatik zeichnet sich die CML durch einen stadienhaften Verlauf aus, und es wird zwischen der chronischen Phase, der Akzelerationsphase und der Blastenkrise unterschieden. Die Symptomatik während der chronischen Phase ist uncharakteristisch, nicht selten bleibt die Erkrankung in diesem Stadium symptomlos. Erst 3-5 Jahre nach der Erstmanifestation geht die CML zunächst in eine Akzelerationsphase, anschließend in eine terminale Blastenkrise über. Die Erkrankung ist gekennzeichnet durch Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust und Schwellungen der Milz und Leber. Die periphere Leukozyten- und Thrombozytenzahl kann nicht mehr adäquat durch Chemotherapie kontrolliert werden. Im Knochenmark kommt es zu einer zunehmenden Verdrängung der regulären Hämatopoese durch den malignen Zellklon. Anämien und Thrombozytopenien sind die Folge. Zytologisch ist der Übergang der Erkrankung in dieses Finalstadium charakterisiert durch das Auftreten eines hohen Prozentanteils (> 30%) undifferenzierter, blastärer Zellen im peripheren Blut oder im

Knochenmark sowie durch Manifestation extramedullärer, leukämischer Infiltrate. Bei einem Drittel der Patienten haben die Blasten eine lymphatische Morphologie und exprimieren lymphatische Zellmarker. Das Krankheitsbild entspricht dann weitgehend einer ALL. Bei den übrigen Patienten ähnelt der Phänotyp der malignen Zellen demjenigen einer akuten myeloischen Leukämie. Die Blastenkrise führt auch unter Behandlung innerhalb weniger Monate zum Tod. Häufige Todesursachen sind Infektionen, Blutungen oder ein terminaler Blastenschub mit Multiorganversagen.

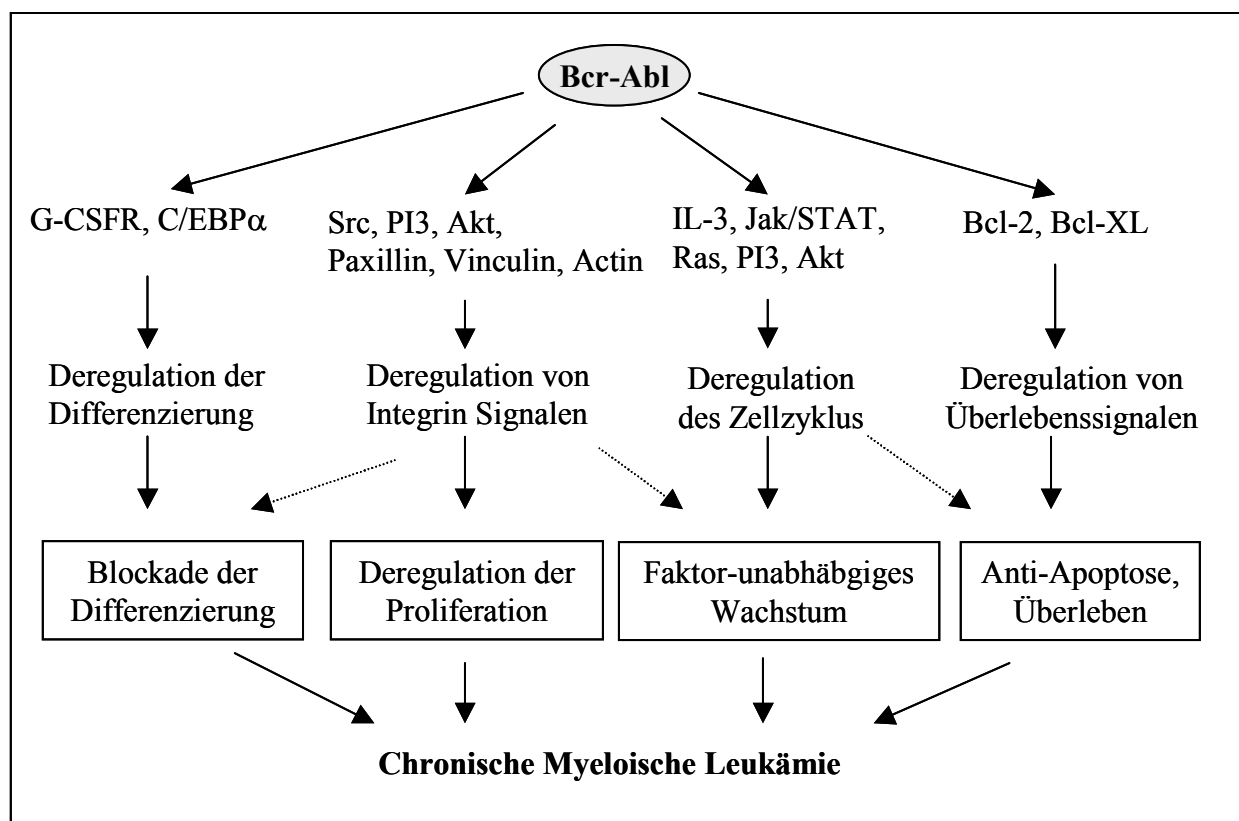
#### 1.1.2.2 Bcr-Abl induziert die akute lymphatische Leukämie (ALL)

Die ALL ist eine maligne Erkrankung der Lymphopoese, charakterisiert durch die klonale Proliferation undifferenzierter lymphatischer Zellen. Sie tritt mit einer Inzidenz von 1:100.000 auf. Etwa 25-30% der Fälle von ALL sind mit einer Philadelphia-Translokation assoziiert, wobei in erster Linie ältere Patienten betroffen sind. Die Ph-positive ALL ist durch eine starke Vermehrung der lymphatischen Zellen gekennzeichnet. Wie bei der CML tritt eine lymphatische Blastenkrise auf, wobei es hier zur Verdrängung der normalen Hämatopoese, insbesondere der Erythropoese, im Knochenmark durch den malignen Zellklon kommt. Bei einer Ph-positiven ALL kommt es zur starken Vermehrung von Vorläufer-B-Zellen und zu einer fehlenden Differenzierung der B-Zellreihe. Unklar ist, ob es sich bei allen Fällen der Ph-positiven ALL um ein eigenständiges Krankheitsbild handelt oder aber um eine erst zum Zeitpunkt der Blastenkrise diagnostizierte CML. Diese Frage wurde von verschiedenen Untersuchungen unterschiedlich beantwortet (Radich, 2001).

## 1.2 Die biologischen Funktionen des Onkoproteins Bcr-Abl

C-Abl ist eine zytosolische und nukleäre Tyrosinkinase. Neben der Lokalisation des zellulären Abl-Proteins unterliegt auch seine Aktivität strikten Kontrollmechanismen, wobei sowohl intra- als auch intermolekulare Protein-Protein-Interaktionen und posttranslationale Modifikationen an der Regulation der Kinaseaktivität von Abl beteiligt sind (Van Etten, 1999). Die Fusion von Bcr an Abl durchbricht diese Regulationsmechanismen: Die Aktivität der c-Abl-Kinase wird normalerweise über ihre SH3- und SH2-Regionen reguliert. Die SH3-Domäne ist ein negativ-Regulator, während die SH2-Domäne das Protein positiv reguliert (Franz et al., 1989). Als ein Ergebnis der Bcr-Abl Fusion, bindet die N-terminale Domäne von

Bcr-Abl Phosphotyrosin-unabhängig an die SH2 Domäne von Abl und aktiviert dadurch die Abl-Kinase konstitutiv (Pendergast et al., 1991). Bcr-Abl zeichnet sich durch eine deregulierte Kinaseaktivität aus (Konopka et al., 1984). Außerdem ist Bcr-Abl ausschließlich im Zytosol, nicht mehr im Kern, lokalisiert (Van Etten et al., 1998). Beide Veränderungen ermöglichen es Bcr-Abl, mit Proteinen verschiedenster intrazellulärer Signalkaskaden zu interagieren. Diese molekularen Interaktionen führen in der hämatopoetischen Zelle zu Wachstumsfaktor-unabhängigem Wachstum, veränderter oder blockierter Differenzierung, Änderungen in der Zell-Zell und Zell-Matrix-Interaktion, Inhibition der Apoptose und letztlich zu „unkontrolliertem Wachstum“ und Leukämogenese. Auf die einzelnen Auswirkung dieser veränderten molekularen Interaktionen wird im Folgenden eingegangen.



**Abbildung 2: Überblick über den biologischen Einfluss des Onkoproteins Bcr-Abl auf die Biologie der Zelle.** Zusammengefasst sind Signalkaskaden, die von Bcr-Abl aktiviert werden und ihre biologische Konsequenz für die Zelle. (in Anlehnung an Di Bacco et al., 2000)

### 1.2.1 Der Einfluss von Bcr-Abl auf die Proliferation und den Zellzyklus

Bcr-Abl ist in der Lage, Wachstumsfaktor-unabhängiges Wachstum in hämatopoetischen Zelllinien zu induzieren. Bisher gibt es unterschiedliche Beobachtungen dazu, ob die durch Bcr-Abl induzierte Proliferation ein primärer Effekt ist oder ob zusätzliche sekundäre

Veränderungen in den Zellen dafür notwendig sind. Einige Ergebnisse zeigen in temperatursensitiven und induzierbaren Systemen, dass Bcr-Abl in BaF/B3- und in 32D-Zellen IL-3-unabhängiges Wachstum erst nach einer Lag-Phase von 2-3 Wochen induziert (Carlesso et al., 1994; Kabarowski et al., 1994). Andere Daten deuten darauf hin, dass ein grundsätzlicher Mechanismus von Bcr-Abl sein könnte, hämatopoetische Zellen gegenüber bestimmten Zytokinen und Wachstumsfaktoren zu sensibilisieren (Pierce et al., 1998). Eine erhöhte Sensitivität gegenüber Wachstumsfaktoren wurde bei primitiven hämatopoetischen Progenietorzellen aus CML Patienten gezeigt (Bhatia et al., 2000). Außerdem wird diskutiert, dass die anti-apoptotische Wirkung von Bcr-Abl die Anhäufung von zusätzlichen genetischen Mutationen fördert, die dann zur unkontrollierten Proliferation führen (Korsmeyer, 1992).

Hingegen wurde in anderen Arbeiten gezeigt, dass Bcr-Abl ein Wachstumsfaktor-unabhängiges Wachstum vermittelt und den Wachstumsfaktor IL-3 substituiert (1994; Hariharan et al., 1988). Bcr-Abl aktiviert mitogene Signalwege in der Zelle wie den Ras/MAPK-Signalweg, den PI3-Kinase/Akt-Signalweg, den Jak/STAT-Signalweg und den Src-Kinase-Signalweg (zusammengefasst in Warmuth et al., 1998). Aus diesem Grund dürften nicht nur sekundäre Mutationen in Bcr-Abl positiven Zellen zu Wachstumsfaktor-unabhängiger Proliferation führen, sondern Bcr-Abl scheint auch direkt das Wachstum und die Vermehrung der Zellen zu steuern. Die Expression von Bcr-Abl stellt somit ein andauerndes unreguliertes Wachstumssignal für die Zelle dar.

Für diese Hypothese spricht auch, dass Bcr-Abl direkt in die Abläufe in der Zellzyklusprogression eingreifen kann. Diese Fähigkeit könnte vor allem während der Blastenkrise der CML und bei der Ph-positiven B-ALL von Bedeutung sein. Die Aktivierung Cyclin-abhängiger Kinasen sowie der G1/S-Phasen-Progression ist ein direkter Effekt von Bcr-Abl, wie mit einem Dexamethason-induzierbarem System in 32D-Zellen gezeigt wurde (Cortez et al., 1997). Bei Entzug von Wachstumsfaktoren erhält Bcr-Abl die Progression des Zellzyklus in primären CML-Patienten Zellen aufrecht (Jonuleit et al., 1998). Bcr-Abl vermittelt auch das Wachstumsfaktor-unabhängige Eintreten von 32D und BaF/B3 Zellen in den Zellzyklus und ermöglicht das Durchlaufen des Zellzyklus ohne Wachstumsfaktoren, während untransformierte 32D und BaF/B3 Zellen ohne Wachstumsfaktoren in der G1/S-Phase des Zellzyklus arretieren und schließlich in Apoptose gehen (Parada et al., 2001). Der Grund für die Aufrechterhaltung des Zellzyklus unter Wachstumsfaktorentzug ist, dass Bcr-Abl in Abwesenheit von IL-3 in 32D und BaF/B3 Zellen die CyclinD-Expression hochreguliert. (Parada et al., 2001). Damit induziert Bcr-Abl die Wachstumsfaktor-

unabhängige Aktivierung der Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4 und 6. Es wurde gezeigt, dass die konstitutive Aktivierung des CyclinD-Signalwegs Wachstumsfaktor-abhängige Proliferation von Zellen aufhebt und dadurch zur onkogenen Transformation beiträgt (Sherr, 1996). Weitere G1-Cycline werden durch Bcr-Abl jedoch anscheinend nicht beeinflusst. Parallel dazu wird in 32D-Zellen und BaF/B3 Zellen der Zellzyklus-Inhibitor p27 herunterreguliert (Gesbert et al., 2000; Jonuleit et al., 2000). Dies soll auf einen gesteigerten Abbau von p27 zurückzuführen sein und korreliert außerdem mit der Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signalwegs.

Die Aktivität der PI3-Kinase kann durch Bcr-Abl reguliert werden und ist für das Wachstum Ph-positiver Zellen notwendig (Skorski et al., 1995). Der STAT-Weg ist ein weiterer Signalweg, der in hämatopoetischen Zellen durch Bcr-Abl aktiviert wird (Ilaria und Van Etten, 1996) und für das Überleben und Wachstum von K562-Zellen, 32D<sub>Bcr-Ablwt</sub> oder Ba/F3<sub>Bcr-Ablwt</sub> in Wachstumsfaktor-freien Kulturbedingungen nötig ist (de Groot et al., 1999). Über STAT5 wird dabei auch die CyclinD Expression erhöht (de Groot et al., 2000).

Insgesamt scheint Bcr-Abl also einen sowohl indirekten als auch direkten Einfluss auf die Zellproliferation und den Zellzyklus zu nehmen. Bcr-Abl aktiviert unabhängig von Wachstumsfaktoren mitogene Signalwege in der Zelle und macht so die Zelle unabhängig von internen und externen Kontrollen. Es ist allerdings wahrscheinlich, dass sekundäre und tertiäre Mutationen notwendig sind, um die Proliferations-fördernde Qualität von Bcr-Abl komplett freizusetzen.

### **1.2.2 Der Einfluss von Bcr-Abl auf die Differenzierung hämatopoetischer Zellen**

Der Einfluss von Bcr-Abl auf die Differenzierung hämatopoetischer Zellen hängt im wesentlichen vom Phänotyp der Leukämie und vom Differenzierungszustand der Zellen ab: Bcr-Abl kann die Differenzierung hämatopoetischer Zellen sowohl antreiben als auch blockieren. Mittels einer regulierten Expression von Bcr-Abl in embryonalen Stammzellen wurde gezeigt, dass Bcr-Abl die Entwicklung myeloischer Zellreihen gegenüber der erythropoetischer Zellen begünstigt. Dies deutet auf eine Tendenz hämatopoetischer Stammzellen zur Differenzierung in Richtung Myelopoese in Gegenwart von Bcr-Abl hin (Era und Witte, 2000).

Im Gegensatz dazu blockiert Bcr-Abl in der myeloischen Zelllinie 32D die Differenzierung. Diese Zellen können normalerweise unter Zugabe von G-CSF zu neutrophilen Granulozyten ausdifferenzieren. Der durch Bcr-Abl verursachte Differenzierungsstopp konnte mit einer

Dysregulation der hämatopoetischen Transkriptionsfaktoren C/EBP $\alpha$  und  $\epsilon$  und des C/EBP Rezeptors korreliert werden (Schuster et al., 2003). Durch Inkubation mit dem Bcr-Abl-Kinase-Inhibitor STI571 konnte die Hochregulation der Transkriptionsfaktoren und das physiologische Differenzierungsverhalten wieder hergestellt werden. Diese Beobachtung belegt, dass Bcr-Abl direkt zu dem beschriebenen Differenzierungsblock beiträgt.

### **1.2.3 Der Einfluss von Bcr-Abl auf die Apoptose**

Einige Untersuchungen deuten darauf hin, dass Bcr-Abl in die Abläufe des programmierten Zelltods (Apoptose) eingreift und so das Überleben hämatopoetischer Zellen verlängert. Hierfür spricht auch die Tatsache, dass die Expression von Bcr-Abl in hämatopoetischen Zelllinien zum Wachstumsfaktor-unabhängigen Überleben der Zellen führt, während untransformierte Zellen sterben (Cortez et al., 1995; Kabarowski et al., 1994). Darüber hinaus zeigen Bcr-Abl positive Zellen eine erhöhte Resistenz gegenüber DNA-schädigenden und pro-apoptotischen Stimuli, wie UV-Strahlung, ionisierende Strahlung oder Zytostatika (Bedi et al., 1994). Es wurde gezeigt, dass auch eine hochdosierte Chemotherapie in Verbindung mit Stammzell-Transplantation in den meisten Patienten nicht zu einer Eliminierung der Krankheit führt (Gale et al., 1994). Diese klinischen Studien zeigen zusätzlich zu grundlegenden Daten, dass Bcr-Abl positive Zellen resistent sind gegen Apoptose, die durch Chemotherapeutika ausgelöst wird. Ein weiterer Beleg für den Bcr-Abl abhängige Schutz vor Apoptose durch DNA-schädigende Substanzen wurde in Wachstumsfaktor-abhängigen Zellen gezeigt: Der Apoptoseschutz war hier von der Menge an exprimiertem Bcr-Abl abhängig (Cambier et al., 1998).

Das wachsende Wissen um die molekularen Abläufe während der Apoptose hat zu einem besseren Verständnis der Wirkung von Bcr-Abl auf das Überleben hämatopoetischer Zellen beigetragen. Interessanterweise werden die anti-apoptotischen Effekte durch unterschiedliche Signalwege vermittelt. Bcr-Abl stimuliert zahlreiche Signalmoleküle wie Ras, PI-3K/Akt und STAT5. Diese Signalwege können sowohl für Wachstumsfaktor-unabhängige Proliferation als auch anti-apoptotische Mechanismen wichtig sein.

Bcr-Abl schützt vor programmiertem Zelltod und Apoptose-induzierenden Medikamenten durch verschiedene Mechanismen: Bcr-Abl positive Zellen können DNA-Schäden schneller reparieren als andere Zellen. Sie aktivieren Zellzyklus-Kontrollpunkte durch DNA-Schäden effektiver und erlauben so mehr Zeit für diese Reparaturmechanismen. Außerdem aktiviert Bcr-Abl direkt Mechanismen, die vor pro-apoptotischen Signalwegen schützen, wie sie zum

Beispiel durch DNA-schädigende Agenzien oder andere zytotoxische Agenzien, die an der Zellteilung angreifen, ausgelöst werden (Skorski, 2002).

Einer der effektivsten anti-apoptotischen Mechanismen ist die Regulation der Proteine der Bcl-2 Familie durch Bcr-Abl. Dadurch kann Bcr-Abl direkt apoptotische Signalwege hemmen. Bcr-Abl induziert einen Block der Apoptose als Antwort auf eine Reihe zytotoxischer Agenzien (Amarante-Mendes et al., 1998). Zum einen erhöht Bcr-Abl die Expression von anti-apoptotischem Bcl-xL (Amarante-Mendes et al., 1998), zum anderen induziert es die Phosphorylierung und somit die Inaktivierung des pro-apoptotischen Proteins Bad (Neshat et al., 2000). In CD34-positiven CML-Patienten kann ein Bcr-Abl-Kinase-Inhibitor die Expression von Bcl-xL vermindern (Horita et al., 2000). Die Induktion von Bcl-xL wird über die Aktivierung des STAT-5-Signalwegs vermittelt (de Groot et al., 2000; Gesbert and Griffin, 2000). Die anti-apoptotische Bedeutung des STAT5-Signalwegs zeigt sich auch dadurch, dass die Expression von dominant-negativem STAT5 das Überleben und Wachstum von K562-Zellen, 32D<sub>Bcr-Ablwt</sub> oder Ba/F3<sub>Bcr-Ablwt</sub> gegenüber Strahlung und Zytostatika reduziert (Sillaber et al., 2000). Die Phosphorylierung von Bad erfolgt zum einen über den PI3-Kinase/Akt-Signalweg, zum anderen aber auch über einen Ras/Raf-abhängigen Signalweg (Neshat et al., 2000). Zusätzlich führt der Akt-Kinase-Weg zur Inhibition von Procaspase-9 (Cardone et al., 1998). Während die Rolle von Bcl-xL und Bad in der durch Bcr-Abl induzierten Apoptose-Resistenz weitgehend gesichert ist, ist die Beteiligung des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 umstritten (Sanchez-Garcia and Grutz, 1995; Sanchez-Garcia and Martin-Zanca, 1997; Amarante-Mendes et al., 1998a).

Neben der Hemmung apoptotischer Signalwege scheint es noch einen weiteren Mechanismus zu geben, der das Überleben Bcr-Abl positiver Zellen beeinflusst. Obwohl die Anzahl an DNA-Schäden in Bcr-Abl transformierten Zellen höher ist als in untransformierten, können diese DNA-Schäden schneller reparieren (Slupianek et al., 2002). Nach Exposition speziell gegenüber DNA-schädigender Stimuli (Zytostatika, Strahlung) führt Bcr-Abl zur Induktion eines verlängerten G2-Zellzyklusarrests (Bedi et al., 1995; Nishii et al., 1996). Diese Verlängerung des G2/M-Kontrollpunkts könnte Bcr-Abl-positiven Zellen erlauben, DNA-Schäden, die durch genotoxische Substanzen oder Strahlung während der S-Phase verursacht wurden, zu beheben. Dadurch könnte der Zelltod, verursacht durch stark beschädigte DNA, umgangen werden. Es wurde gezeigt, dass dieser Mechanismus von der Bcr-Abl Aktivität und vom STAT5 Signalweg abhängig ist (Slupianek et al., 2001). Ein detaillierter Mechanismus



hierfür ist jedoch noch nicht bekannt (zusammengefasst in Skorski, 2002).

#### **1.2.4 Bcr-Abl vermittelt Resistenz gegen Medikament-induzierte Apoptose**

Die beschriebene anti-apoptotische Aktivität von Bcr-Abl führt dazu, dass Bcr-Abl-exprimierende Zellen relativ resistent sind gegen chemotherapeutische Medikamente wie Etoposid und Taxol. Die Rolle von Bcr-Abl in der Vermittlung von Resistenzen wurde dabei durch die Verwendung von Antisense-RNA demonstriert. Dabei führte die Expression von Antisense-RNA in der CML-Zelllinie K562 zu einer verminderten Expression von Bcr-Abl und das führte zur Erhöhung der Sensitivität gegen verschiedene Apoptose induzierende Substanzen, wie zum Beispiel Etoposid, Cycloheximid, Actinomycin D, Camptothecin (McGahon et al., 1994). Diese Experimente wurden bestätigt durch ähnliche Strategien in CML-Patienten-Zellen, Mäusen und in 32D-Zellen (Bedi et al., 1994; Skorski et al., 1997). Interessanterweise nimmt die Resistenz von Zellen gegen apoptotische Stimuli mit zunehmendem Expressionslevel von Bcr-Abl zu (Cambier et al., 1998)

### **1.3 Therapie Bcr-Abl positiver Leukämien**

#### **1.3.1 Konventionelle Therapieansätze bei CML und ALL**

Die konventionellen Therapieformen bei Bcr-Abl-positiven Leukämien sind der Einsatz verschiedener Chemotherapeutika (Hydroxyharnstoff, Cytosinarabinosid) und die allogene Knochenmarkstransplantation (KMT) mit möglichst weitgehend HLA-kompatiblen Knochenmark. Außerdem wird bei der CML Interferon- $\alpha$  eingesetzt. Für den Patienten ist jede der konventionellen Therapien problematisch. Eine KMT ist mit hoher Toxizität verbunden. Sie wird deshalb vor allem bei jüngeren Patienten (<50 Jahre) durchgeführt. Die Verwendung von Chemotherapeutika und Interferon- $\alpha$  kann die CML nicht dauerhaft heilen und ist mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden. Bei der ALL wird wegen der schlechten Ansprech- und Remissionsraten der Chemotherapie möglichst nur die allogene KMT durchgeführt.

### 1.3.2 Der Tyrosinkinase-Inhibitor STI571

Eine neue und innovative Therapiemöglichkeit stellen die sogenannten „small molecule drugs“ dar. Das sind niedermolekulare Substanzen, die ein für die Krankheit relevantes Protein blockieren. Sie stellen also ein Mechanismus-basiertes Medikament dar. Ein solches Medikament ist STI571 (Imatinib, CGP57148, Gleevec®). STI571 ist ein Tyrosinkinase-Inhibitor, der die ATP-Bindestelle der Abl-Tyrosinkinase im Bcr-Abl Fusionsprotein kompetitiv blockiert und dadurch die Bcr-Abl-Aktivität inhibiert. Es ist ein Phenylaminopyrimidin-Derivat und blockiert außer Bcr-Abl auch Stammzellofaktor-Rezeptor-Kinase (c-Kit) und PDGF-Rezeptor-Kinase. 1996 wurde von Druker und Kollegen im Tiermodell die therapeutische Wirksamkeit von STI571 gezeigt.

In Zellkultur-Experimenten sowie an Patientenmaterial konnte gezeigt werden, dass STI571 tatsächlich das Überleben Bcr-Abl-positiver, nicht aber negativer Zellen hemmt (Carroll et al., 1997; Deininger et al., 1997; Druker et al., 1996). Langzeit-Kulturen von Knochenmark, die mit STI571 in vitro kultiviert wurden, zeigten eine reduzierte Anzahl an CML-Vorläuferzellen, aber nur wenig Toxizität auf normalen Zellen (Kasper et al., 1999). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass STI571 auch in einem Mausmodell die Expansion humaner Ph-positiver Zelllinien vermindert (le Coutre et al., 1999). Auch in der Klinik ist STI571 inzwischen als Therapiemöglichkeit bei Ph-positiven Leukämien etabliert. Zahlreiche klinische Studien konnten die Wirksamkeit des Inhibitors belegen. Bei CML-Patienten in der späteren chronischen Phase führte STI571 in 98% der Fälle zu einer hämatologischen Remission mit Normalisierung des peripheren Blutbildes. Diese Remissionen waren unter kontinuierlicher Verabreichung von STI571 stabil (Druker et al., 2001). Weniger erfolgversprechend sind die Ergebnisse der Studien bei CML-Patienten in der Blastenkrise oder bei Ph-positiven B-ALL-Patienten. Diese Patienten sprachen meist ebenfalls gut auf STI571 an, jedoch war dieser Effekt im Patienten nicht stabil (Druker et al., 2001). In einer Phase-I-Studie entwickelten über 90% der Patienten mit Ph-positiver B-ALL und 82% der Patienten in der Blastenkrise ein Rezidiv; die Leukämie wurde gegenüber STI571 resistent.

### 1.3.3 Mechanismen der Resistenz gegen STI571

Es gibt zwei Mechanismen der Resistenz-Entstehung bei kontinuierlicher STI571-Therapie. Zum einen kann eine Resistenz durch eine Reaktivierung der Abl-Kinase in Bcr-Abl verursacht werden. Eine solche Reaktivierung kann durch Punktmutationen in Bcr-Abl an

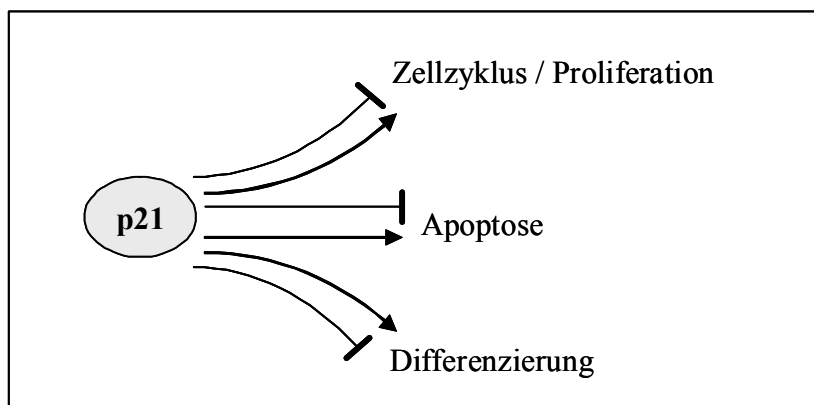
einer für die STI571-Bindung wichtigen Position erfolgen. Eine weitere Möglichkeit ist die Amplifikation oder die Überexpression des Bcr-Abl Gens. Der damit verbundene Anstieg von Kinase-Aktivität kann so von STI571 nicht mehr ausreichend blockiert werden (le Coutre et al., 2000). Eine Reaktivierung der Abl-Kinase kann auch Bcr-Abl unabhängig erfolgen, zum Beispiel durch die Überexpression des MDR-Gens („multiple drug resistance“) und dem aktiven Transport des Inhibitors aus der Zelle (Mahon et al., 2000).

In STI571-resistenten Patienten wurde eine Punktmutation gefunden, die im Bcr-Abl Protein an der Position 315 ein Isoleucin statt eines Threonins aufwies und dadurch die Bindung des Inhibitors verhindert (Gorre et al., 2001). Auch durch in vitro Mutation von Bcr-Abl an dieser Stelle und anschließender Expression in 32D-Zellen wurde gezeigt, dass die Mutation T315I in Bcr-Abl resistent ist gegen die Inhibition durch STI571 und immer noch Wildtyp-Kinase-Aktivität besitzt (Warmuth, 2002). Inzwischen wurden zahlreiche weitere Punktmutationen in Patienten gefunden, welche die Bindung von STI571 an Bcr-Abl negativ beeinflussen (Roumiantsev et al., 2002; Shah et al., 2002; von Bubnoff et al., 2002). Am häufigsten sind die Aminosäuren an den Positionen 253, 255, 315 und 351 betroffen. Auch eine Amplifikation des Bcr-Abl Gens wurde in STI571-resistenten Patienten gefunden (Gorre et al., 2001).

Die zweite Möglichkeit, eine Resistenz gegenüber STI571 zu entwickeln, besteht in dem Auftreten von sekundären Mutationen. Bcr-Abl greift in eine Vielzahl von Signalkaskaden ein, die das Überleben der Zelle oder das Fortschreiten des Zellzyklus positiv beeinflussen. Durch sekundäre Mutationen könnten Proteine aus diesen Signalwegen in die Lage versetzt werden, die transformierende Funktion von Bcr-Abl zu übernehmen. Das häufige Auftreten von Mutationen und daraus resultierenden Resistenzen, vor allem in der Blastenkrise und in der B-ALL, wird oft mit einer besonderen genomischen Instabilität bei Ph-positiven Patienten erklärt. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass in einem Mausmodell die Expression von Bcr-Abl eine genetische Instabilität induziert (Salloukh and Laneuville, 2000). Eine mögliche Erklärung dafür könnte in der negativen Regulierung von DNA-Reparaturproteinen liegen, wie den PKCs („DNA-dependent protein kinases“) (Deutsch et al., 2001).

## 1.4 p21<sup>Waf1/Cip1</sup>: Ein multifunktionelles Protein

Krebs entwickelt sich, wenn in einer Zelle die Balance zwischen Proliferation und Zelltod gestört wird. Ein Protein, das beide Vorgänge in der gesunden Zelle und darüber hinaus die Differenzierung kontrollieren kann, ist p21<sup>Waf1/Cip1</sup> (p21). p21 ist einerseits ein Inhibitor der Proliferation und inhibiert Cyclin/CDK Komplexe und damit die Zellzyklusprogression (Sherr et al., 1995). Es sollte also eine Rolle in der Prävention gegen Tumoren spielen. Andererseits haben viele neuere Arbeiten gezeigt, dass p21 auch als Inhibitor der Apoptose fungiert (Gartel et al., 2002). Dadurch kann p21 zum Überleben transformierter Zellen beitragen. Im Folgenden soll das p21 Protein und seine verschiedenen Funktionen vorgestellt werden.



**Abbildung 3: Biologische Funktionen von p21** (nach Dotto, 2000) p21 kann den Zellzyklus und die Proliferation, die Apoptose und die Differenzierung von Zellen sowohl inhibieren als auch aktivieren.

### 1.4.1 Die molekulare Anatomie von p21

Wie der Name des Proteins bereits andeutet, ist p21 ein Protein mit dem Molekulargewicht von 21kDa. p21 wurde von zwei Arbeitsgruppen zur etwa gleichen Zeit in unterschiedlichen funktionalen Assays entdeckt: als Inhibitor der Aktivität von Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs, „Cyclin-dependent kinase“), an die es direkt binden kann (Cip1, „CDK-interacting protein 1“) (Harper et al., 1993) und als ein Vermittler des durch p53 induzierten Wachstumsarrests (WAF1, „wild-type p53-activated fragment“) (El-Deiry et al., 1993). p21 gehört zur Familie der Cip/Kip Familie der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren (CDKI, Cyclin-dependent kinase inhibitor), die aus den Proteinen p21<sup>Cip1/Waf1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> und p57<sup>Kip2</sup> besteht. Die Cip/Kip Familie weist eine signifikante Sequenzhomologie in ihrem N-terminalen Bereich auf und erkennt eine große Zahl unterschiedlicher Cyclin/CDK Komplexe

des gesamten Zellzyklus (Sherr und Roberts, 1999). Die verschiedenen CDKIs unterscheiden sich jedoch deutlich in ihren C-Termini. Die Cip/Kip Familie an CDKIs wird im übrigen sowohl in der Sequenz als auch Funktion unterschieden von der Ink4A Familie an CDKIs (z. B. p16), die sehr spezifisch einen einzigen Cyclin/CDK Komplex in der G1 Phase des Zellzyklus inhibiert.

Im Wesentlichen besteht p21 aus einer N-terminalen und einer C-terminalen Domäne. Diese Domänen dienen der Bindung an verschiedenste Proteine: Cycline, CDKs, Transkriptionsfaktoren, DNA-Synthese-Initiatoren (PCNA), Proteinkinasen, Caspasen und andere (Dotto, 2000). p21 hat komplexe Funktionen in der Zelle, die es durch Bindung an diese Proteine ausübt. p21 reguliert Kinasen, Transkriptionsfaktoren und andere Proteine in ihrer Aktivität und Komplexbildung mit weiteren Molekülen und hat dabei größtenteils eine inhibitorische Funktion. p21 funktioniert damit als ein Netzwerk-molekül, dessen Aktivität vor allem über seinen Expressionsstatus in der Zelle reguliert wird, aber auch durch seine Lokalisation und den Phosphorylierungszustand.

#### **1.4.2 Die Rolle von p21 in der Proliferation und im Zellzyklus**

Die „klassische Rolle“ von p21 im Zellzyklus ist die eines CDK-Inhibitors (Niculescu et al., 1998; Sherr et al., 1995). Als Wachstumsinhibitor und CDK-Inhibitor wurde es auch in zwei unterschiedlichen zellulären Assays erstmals entdeckt und isoliert (Harper et al., 1993; El-Deiry et al., 1993). Die Überexpression von p21 führt zu G1- und S-Phase Arrest in der Zelle (Niculescu et al., 1998, Ogryzko et al., 1997). Dabei kann p21 mit allen Cyclin/CDK-Komplexen interagieren, ihre Kinase-Aktivität inhibieren und so den Zellzyklus und die Proliferation verlangsamen oder inhibieren. Jedoch hat p21 eine duale Rolle im Zellzyklus und bildet damit eine Ausnahme unter den CDKIs. Abhängig von seinem Expressionslevel in der Zelle kann es Cyclin/CDK-Komplexe sowohl inhibieren, als auch die Bildung von aktiven Cyclin/CDK4/6-Komplexen fördern und stabilisieren. Dadurch kann p21 den Zellzyklus vorantreiben (Sherr und Roberts, 1999) und die Proliferation aktivieren. p21 kann somit nicht nur zur Aktivierung des initialen CyclinD/CDK4- und CyclinD/CDK6-Komplexes beitragen, sondern auch CyclinE/CDK2-Komplexe aktivieren, da die CyclinD/CDK4/6-Komplexe inhibitorisches p21 entzieht. p21 interagiert direkt mit Cyclinen durch konservierte Regionen in seinem N- und C-Terminus. Außerdem besitzt es eine CDK2-Bindestelle am N-Terminus. Ein weiteres Zielmolekül über das p21 den Zellzyklus regulieren kann ist das „Proliferating Nuclear Antigen“ (PCNA), einer Untereinheit der DNA-Polymerase  $\delta$ . PCNA verankert die

DNA-Polymerase mit der DNA und ist unbedingt nötig für die DNA-Synthese in der S-Phase. Durch die direkte Bindung des C-Terminus von p21 an PCNA kann p21 die DNA-Synthese durch die DNA-Polymerase  $\delta$  inhibieren und dadurch die S-Phase des Zellzyklus blockieren oder verlangsamen (Waga et al., 1994; Flores-Rozas et al., 1994). Interessanterweise wurde in Endothelzellen beobachtet, dass die Bindung von p21 an PCNA durch Phosphorylierung von p21 am Threonin 145 inhibiert wird. Die Phosphorylierung erfolgt durch die Akt-Kinase (Rössig et al., 2001). Dadurch trägt Akt zur Progression der DNA-Synthese und der Proliferation bei. Auch in Glioblastom-Zelllinien wurde gezeigt, dass Akt p21 am Threonin 145 phosphoryliert und so die PCNA Bindung inhibiert. Außerdem scheint Akt auf diese Weise auch die Assemblierung von CyclinD1/CDK4-Komplexen zu fördern (Li et al., 2002) und den Zellzyklus voranzutreiben.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die klassische Rolle von p21 die eines Proliferationsinhibitors ist. Jedoch kann p21 abhängig vom zellulären Kontext auch proliferationsfördernde Aktivität besitzen.

### **1.4.3 Die Funktion von p21 für das Überleben der Zelle und die Apoptose-Resistenz**

Eine Vielzahl an Publikationen zeigt, dass p21 nicht nur ein Proliferationsinhibitor ist, sondern auch ein Inhibitor der Apoptose. p21 wirkt als negativer Regulator der Apoptose über einen entweder p53-abhängigen oder p53-unabhängigen Mechanismus. Während die Mechanismen der p53-induzierten Apoptose noch nicht vollständig verstanden sind, ist gezeigt, dass der p53-abhängige Zellzyklusarrest zum Schutz vor Strahlung und Chemotherapie vor allem über p21 kontrolliert wird. Oft vermittelt dabei ein hohes Expressionslevel von p21 einen Zellzyklusarrest und damit einen Schutz vor p53-abhängiger Apoptose (zusammengefasst in Gartel und Tyner, 2002).

Interessanterweise inhibiert p21 auch die Apoptose, die p53-unabhängig vermittelt wird. Die Mechanismen der anti-apoptotischen Funktion von p21 sind hierfür noch nicht vollständig verstanden, beruhen aber anscheinend nicht auf seiner Funktion als Zellzyklusinhibitor. Die anti-apoptotische Funktion von p21 ist jedoch in zahlreichen Zellkultursystemen gezeigt worden (zusammengefasst in Gartel und Tyner, 2002). Hierbei ist besonders auffällig, dass ein hohes Expressionslevel an p21 in HER-2/neu-exprimierenden Brustkrebs-Zelllinien vor Taxol-induzierter Apoptose schützt. Taxol ist ein Chemotherapeutikum, das über die Inhibition der Tubulin-Polymerisation wirkt. Der resultierende Block im Abbau der mitotischen Spindel führt zu programmiertem Zelltod (Horwitz, 1992; Linke, 1996). Die

Überexpression von HER-2/neu in Brustkrebs-Zelllinien induziert direkt eine transkriptionelle Aktivierung von p21. Zusätzlich wird p21 auf Proteinebene stabilisiert, indem es durch Akt am Serin 146 phosphoryliert wird (Zhou et al., 2001). Der Beweis, dass p21 die Zellen vor Taxol-induzierter Apoptose schützt, wurde durch Inaktivierung der p21-Expression mit p21-Antisense-RNA erbracht: durch eine Antisense-RNA gegen p21 wurden die Zellen wieder sensibel gegen Taxol-induzierte Apoptose (Yu et al., 1998). Auch in Glioblastom-Zellen wurde gezeigt, dass eine erhöhte p21-Expression den Schutz vor Taxol-induzierter Apoptose vermittelt (Li et al., 2002).

In einigen Fällen korreliert die zytoplasmatische Lokalisation von p21, das sowohl im Kern als auch im Zytoplasma lokalisiert sein kann, mit der anti-apoptotischen Funktion von p21 in Tumorzellen gegen Taxol (Zhou et al., 2001). In diesem Fall wird eine Änderung der nukleären Lokalisation in eine zusätzlich zytoplasmatische durch Phosphorylierung von p21 durch überaktives Akt vermittelt. Ähnliche anti-apoptotische Effekte in Korrelation mit der zytoplasmatischen Lokalisation von p21 wurden im Zusammenhang mit dem Schutz vor Apoptose während der Differenzierung von Monozyten beobachtet, wobei hier keine Beteiligung der Akt-Kinase beschrieben wurde (Asada et al., 1999).

In einer Vielzahl weiterer Zelllinien wurde die anti-apoptotische Wirkung von p21 gezeigt. Dabei vermittelt p21 nicht nur Schutz vor Apoptose durch Taxol sondern auch vor weiteren Chemotherapeutika wie Etoposid, BCNU, Cisplatin, Adriamycin und 1- $\beta$ -D-Arabinofuranosylcytosine (zusammengefasst in Gartel und Tyner, 2002). Außerdem schützt p21 vor „zellulären“ apoptotischen Stimuli: TGF- $\beta$ -, TNF $\alpha$ - und Fas-Ligand-induzierte Apoptose (Xu und El-Deiry, 2000; Suzuki et al., 1998).

Ein einheitlicher Mechanismus, durch den p21 die Zellen vor Apoptose schützt, ist noch nicht verstanden. Neuere Daten zeigen einen direkteren Mechanismus des p21-vermittelten Apoptoseschutzes: p21 bindet an Pro-Caspase-3 und verhindert dadurch die Spaltung und Aktivierung der Initiatorcaspase. Auch die Aktivierung von Caspase 8 wird durch Überexpression von p21 verhindert (Suzuki et al., 1999). Bei der Initiation von Apoptose spielt nicht nur die Aktivierung von Caspasen eine Rolle. Auch andere Signalkaskaden werden im Verlaufe der Apoptose in charakteristischem Muster aktiviert: p38 MAPK und SAPK (JNK), außerdem ASK1-Kinase. p21 kann die katalytische Aktivität dieser pro-apoptotischen Kinasen inhibieren (Shim et al., 1996; Basu und Kolesnick, 1998).

Auch wenn kein einheitlicher anti-apoptotischer Mechanismus für p21 bekannt ist, ist die anti-apoptotische Funktion von p21 sehr häufig mit einem erhöhten Expressionsniveau von

p21 verbunden und in manchen Fällen mit einer veränderten Lokalisierung von p21. In diesem Fall scheint die Überexpression von p21 eine Art Schutzschild gegen bereits aktivierte oder zu aktivierende apoptotische Mechanismen bereitzustellen.

#### **1.4.4 Die Rolle von p21 in der Differenzierung der Zelle**

Neben der Kontrolle der Proliferation und Apoptose zeigt sich auch eine unerwartet komplexe Rolle von p21 bei der Regulation der Differenzierung von Zellen (Dotto et al., 2000), so dass hier nur im Überblick darauf eingegangen werden kann. Es wurde gezeigt, dass das Expressionsniveau von p21 die Differenzierung von verschiedenen Zelltypen beeinflusst. Die Rolle von p21 scheint abhängig vom Zelltyp zu sein. Die p21-Expression kann sowohl die Differenzierung inhibieren als auch induzieren. Besonders interessant für diese Arbeit ist die Bedeutung von p21 in der Entwicklung des hämatopoetischen Systems. Die p21-Expression ist wichtig für die Aufrechterhaltung des Ruhestadiums und der Erneuerung des Stammzellpools in Mäusen (Cheng et al., 2000). Bei Transplantationsexperimenten mit p21<sup>-/-</sup>-Mäusen kommt es zu einer Erschöpfung des Stammzellpools als Folge einer verminderten Selbsterneuerung. Dennoch entwickeln sich p21<sup>-/-</sup>-Mäusen (ohne Transplantationsversuche) und ihr hämatopoetisches System normal. Im Verlaufe der Differenzierung in der Hämatopoese wird in Übereinstimmung mit Cheng et al. p21 herunterreguliert (Steinman, 2002). Nur in undifferenzierten Zellen ist die p21-Expression erhöht. Interessanterweise wird p27 im Zuge der Differenzierung von hämatopoetischen Zellen genau entgegengesetzt reguliert: In Stammzellen wird p27 nur gering exprimiert, während seine Expression in differenzierten Zellen erhöht ist. Auf mögliche Mechanismen der Beeinflussung der Differenzierung durch p21 soll hier nicht im Detail eingegangen werden. Interessant ist, dass p21 mit C/EBP $\alpha$  interagieren kann, einem Transkriptionsfaktor, der besonders für die Differenzierung im hämatopoetischen System wichtig ist.

#### **1.4.5 Die Regulation der Funktion von p21**

Die komplexe Funktion von p21 wird wesentlich über dessen Expressionsstatus reguliert. Die Expression von p21 wird auf zwei Ebenen reguliert. Zum einen über die Transkription, zum anderen über die Proteinstabilität. Es ist bereits gut untersucht, dass p21 ein Zielgen von p53 ist, das im Promoterbereich von p21 zwei konservierte Bindestellen besitzt und seine Expression hochreguliert (Bargonetti und Manfredi, 2002; El-Deiry, 1998). Zusätzlich dazu



gibt es eine Vielzahl von p53-unabhängigen Wegen, über welche die p21-Transkription aktiviert wird. Dabei spielen zahlreiche Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle wie zum Beispiel Sp1, STATs, C/EBP $\alpha$  und C/EBP $\beta$  (zusammengefasst in Gartel und Tyner, 1999). Interessant dabei ist, dass Signalwege, die von Onkogenen aktiviert werden, an der Regulation der p21-Expression beteiligt sind. Zum Beispiel wird der STAT-Signalweg durch Bcr-Abl aktiviert. Zudem kann die p21-Expression auf posttranskriptionellem Niveau reguliert werden. Dabei spielen Ubiquitin-abhängige und -unabhängige Mechanismen des Proteasom-abhängigen Proteinabbaus eine Rolle (Maki et al., 1997). Die Proteinstabilität von p21 kann über seinen Phosphorylierungszustand reguliert werden: p21 wird durch die Akt-Kinase am Serin 146 phosphoryliert. Dies erhöht seine Proteinstabilität, wie in 293E Zellen gezeigt wurde (Li et al., 2002). Weiterhin wird die Funktion von p21 über seine Phosphorylierung am Threonin 145 reguliert. Dies verhindert die Bindung von p21 an PCNA und aktiviert damit die DNA-Synthese (Rössig et al., 2002). Zusätzlich vermindert dieser Phosphorylierungsstatus die CDK2-inhibitorische Aktivität von p21, indem die Bindung von p21 an diese Cyclin-abhängige Kinase reduziert wird. Somit wird durch die Phosphorylierung von p21 am Threonin 145 die Proliferation positiv reguliert.

Die Funktion von p21 wird außerdem über seine zelluläre Lokalisation definiert. Die nukleäre Lokalisation von p21 korreliert mit einer Zellzyklus-regulatorischen Funktion von p21 (LaBaer et al., 1997). Dagegen ist die zusätzliche zytoplasmatische Lokalisation von p21 in einigen Publikationen mit dem Schutz der Zellen vor Apoptose verbunden (Asada et al., 1999; Zhou et al., 2001). In manchen Fällen korreliert die Phosphorylierung von p21 am Threonin 145 mit der zytoplasmatischen Lokalisation (Zhou et al., 2001).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Funktion von p21 in der Proliferation und der Apoptose anscheinend vor allem über sein Expressionsniveau und die Lokalisation in der Zelle reguliert wird. Die Beeinflussung beider Vorgänge durch den Phosphorylierungszustand von p21 erhöht die Komplexität der Regulation der p21-Funktion.

#### **1.4.6 Die Rolle von p21 in der Tumorentstehung: Tumorsuppressor oder Onkogen?**

Die Beteiligung von p21 an der Karzinogenese wurde unter anderem in p21<sup>-/-</sup> Mäusen untersucht. p21<sup>-/-</sup> Mäuse entwickeln früher spontane Tumoren als normale Mäuse (Martin-Caballero et al., 2001). Die Tumoren in p21<sup>-/-</sup> Mäusen waren dabei interessanterweise hauptsächlich hämatopoetischen oder epithelialen Ursprungs, entstanden also aus Geweben, die sich schnell teilen und undifferenzierte Zellen enthalten. Dies demonstriert die Funktion

von p21 als Zellzyklus- und Proliferationsinhibitor und somit als Tumorsuppressor. Dennoch muss betont werden, dass p21 ein bei weitem weniger potenter Tumorsuppressor ist als p53, da p53-„Knockout“-Mäuse wesentlich anfälliger für Tumoren sind (Martin-Caballero et al., 2001). Dass p21 ein vergleichsweise schwacher Tumorsuppressor ist, zeigt sich auch darin, dass sowohl p16 als auch p53 weitaus häufiger in menschlichen Tumoren mutiert sind, als p21. Dennoch wurde gezeigt, dass p21 im Schutz gegen Tumorprogression synergistisch wirkt mit Rb und INK4A/ARF (Brugarolas et al., 1998; Paramio et al., 2001). Zudem sind p21-/- Mäuse nicht nur anfälliger für spontane sondern auch für chemisch induzierte Tumoren speziell in der Haut (Philipp et al., 1999). Das kann auf die Eigenschaft von p21 zurückgeführt werden, durch Kontrolle des Zellzyklus und der DNA-Reparatur die genomische Stabilität zu erhalten. Diese Beobachtungen und die Tatsache, dass p21 ein Inhibitor der Proliferation ist, sprechen dafür, dass p21 als Tumorsuppressor agiert.

Dagegen spricht, dass der p21 Knockout die Entwicklung von strahlungsinduzierten Tumoren in Mäusen reduziert (Martin-Caballero et al., 2001). Außerdem zeigt sich in Tumor-Modellen, dass die klar demonstrierte anti-apoptotische Aktivität von p21 diesem ein Potential als Onkoprotein verleiht (Gartel und Tyner, 2002; Roninson, 2002). p21 schützt Zellen vor Chemotherapie-induzierter Apoptose und ermöglicht so die Progression von Tumoren.

Die Erklärung für die unterschiedliche Auswirkung von p21 auf die Tumorentstehung in Mäusen ist, dass p21 sowohl Eigenschaften eines Tumorsuppressors, als auch eines Onkogens besitzt: Einerseits verleiht die negativ-proliferative Funktion p21 die Eigenschaften eines Tumorsuppressors, andererseits zeigen die bisher eindeutig identifizierten anti-apoptotischen Funktionen von p21, dass es ein Potential als Onkogen besitzt (Gartel und Tyner, 2002). Die unterschiedliche Ausprägung dieser gegensätzlichen Eigenschaften in verschiedenen Tiermodellen kann auf die multifunktionalen und konträren Eigenschaften von p21 zurückgeführt werden.

In CML-Zellen ist p21 in der Regel nicht mutiert (Iolascon et al., 1998). Untersuchungen zur Rolle von p21 in Bcr-Abl-positiven Leukämien gibt es jedoch bisher nicht. Da p21 in der Zelle vielfältige und antagonistische Funktionen hat, die abhängig sind vom zellulären Kontext und dem p21-Expressionsniveau, muss die Rolle von p21 für jeden Krankheitsmechanismus neu definiert werden.

## 2 Ziele der Arbeit

Das Onkoprotein Bcr-Abl ist eine konstitutiv aktive Tyrosinkinase, die in der Zelle Signalwege aktiviert, welche zu Wachstumsfaktor-unabhängiger Proliferation und Inhibition der Apoptose führen. Auf diese Weise induziert Bcr-Abl die chronische myeloische Leukämie und vermittelt außerdem Resistenz gegen verschiedene Chemotherapeutika. Der genaue Mechanismus der Apoptose-Resistenz in Bcr-Abl positiven Zellen ist noch nicht vollkommen geklärt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Regulation der Proliferation aber auch des Überlebens der Bcr-Abl-transformierten Zelle weiter untersucht werden. Dazu sollte die biologische Funktion des Zellzyklusregulators p21, welcher sowohl die Proliferation als auch die Apoptose und die Stress-Antwort der Zelle reguliert, in der Bcr-Abl-transformierten Zelle untersucht werden.

Da p21 vor allem über sein Expressionsniveau reguliert wird, sollte zunächst folgende Ausgangsfragestellung geklärt werden:

1. Wird das Expressionsniveau des Zellzyklusregulators p21 von Bcr-Abl direkt beeinflusst?

Da in dieser Arbeit gezeigt wird, dass die Expression von p21 durch Bcr-Abl positiv reguliert wird, stellt sich die Frage, warum ein potentieller Zellzyklusinhibitor in einer Bcr-Abl transformierten Zelle hochreguliert wird. Um die biologische Funktion von p21 in Bcr-Abl positiven Leukämien weiter zu untersuchen, sollten folgende weiterführende Fragestellungen beantwortet werden:

2. Welche biologische Funktion hat der Zellzyklusregulator p21 in der Regulation der Proliferation von Bcr-Abl-positiven Zellen? Wird die Proliferation durch p21 positiv oder negativ reguliert?

3. Beeinflusst p21 die Apoptose von Bcr-Abl transformierten Zellen?

4. Beeinflusst p21 die STI571- und Taxol-induzierte Apoptose in Bcr-Abl positiven Zellen?

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Mausstämme

Genotyp	Beschreibung	Stammmname und Referenz
p21 -/-	white-bellied agouti, enthält einen homozygoten „Knockout“ des p21 Waf1 Gens	B6, 129-Cdkn1a; Jackson Laboratories, Bar Harbour, USA
WT	white-bellied agouti, Wildtyp Maus, Kontrolle zur p21-Knockout-Maus	B6, 129SF2/J101045; Jackson Laboratories, Bar Harbour, USA

##### 3.1.2 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
32D	IL-3 abhängige, murine myeloische Knochenmarkszelllinie, kann in Granulozyten und Makrophagen differenzieren	DMSZ Nr.: ACC411, Greenberger et al., 1983
32Dp210	IL-3 unabhängige 32D Zelllinie, exprimiert Bcr-Abl	Schuster et al., 2003
Wehi-3B	murine myelomonozytische Leukämiezelllinie, IL-3 Produzent	DMSZ Nr.: ACC 26, Warner et al., 1969
Cos7	Nierenzelllinie von grüner Meerkatze	Gluzman Y., 1981
293T	humane Fibroblasten (Niere) mit large T Antigen transfiziert	DMSZ Nr.: ACC305, Graham et al., 1977
293tetoff	humane Fibroblasten, exprimieren den Tet-Transaktivator tTA	BD Biosciences Clontech, Palo Alto USA

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
NIH3T3	Maus-Fibroblasten	DMSZ Nr.: ACC59, Anderson et al., 1969
PA317infTA	„Producer“-Zelllinie, produziert ecotrophen rekombinanten Retrovirus, der für tTA (tet Transaktivator) codiert	Tim Schroeder, GSF, München

### 3.1.3 Bakterienstämme

*E.coli* XL-1 Blue (Stratagene, Heidelberg)

### 3.1.4 Vektoren

Vektor	kodierte Proteine und Merkmale	Referenz
pcDNA3.1	Expressionsvektor für Säugetierzellen, Ampicillinresistenz	Invitrogen, Groningen, Niederlande
pcDNA3-p21	Expressionsplasmid für p21, Ampicillinresistenz, p21 wurde in die EcoRI-Schnittstelle der MCS eingefügt	K. Forster, GSF, München
pcDNA3-bcr-abl	Expressionsvektor für Bcr-Abl, Ampicillin-Resistenz	M. Warmuth, GSF, München
pApuro	Expressionsvektor für Säugetierzellen, Selektionsvektor mit Puromycinresistenz	Dr. Seth Corey, Pittsburg, USA
pMSCV-neo	retroviraler Vektor mit LTRs, zur Generierung ecotropher rekombinanter Retroviren, Neomycin-Resistenz	Clontech, Palo Alto, USA
pMSCV-IRES-EGFP	retroviraler Vektor mit LTRs, zur Generierung ecotropher rekombinanter Retroviren mit IRES-gekoppeltem EGFP-Gen	Rick Van Etten, Boston, USA
pMSCV-bcr-abl-IRES-EGFP	retroviraler Vektor für die Expression von Bcr-Abl und EGFP, gekoppelt über eine IRES-Sequenz	Olga Mitina, GSF, München

pMSCV-bcr-abl T315I-IRES-EGFP	retroviraler Vektor für die Expression von Bcr-AbIT315I und EGFP, gekoppelt über eine IRES-Sequenz	Olga Mitina, GSF, München
MCV-ecopac	Hüllproteine für ecotrphe rekombinante Retroviren	Rick Van Etten, Boston, USA
CMV- $\beta$ -Gal	Reporterplasmid, $\beta$ -Galaktosidase	Tim Schroeder, GSF, München
pBIL	enthält Tet-regulierbaren Promoter	Clontech, Palo Alto, USA
pBIL-b/a	enthält bcr-abl unter der Kontrolle des Tet-regulierbarem Promoters, bcr-abl ist in die EcoRI- und HindIII-Schnittstellen in die MCS von pBIL eingefügt	K. Forster, GSF, München
pUHC-13-3	Reporterplasmid, enthält Luciferasegen unter der Kontrolle eines Tet-regulierbaren Promoters	Gossen und Bujard, 1992

### 3.1.5 Zellkulturmedien

RPMI 1640 Medium (PAN, Aidenbach)

DMEM Medium (PAN, Aidenbach)

Fötale Kälberserum (FCS) (PAN, Aidenbach)

Fötale Kälberserum (FCS) (Sigma, Osterode)

PBS (PAN, Aidenbach)

PBS ohne Calcium, Magnesium, Natriumbicarbonat (Gibco, Niederlande)

### 3.1.6 Chemikalien, Enzyme, Antikörper

#### Chemikalien

2-Mercaptoethanol (Sigma, St.Louis, USA)

A-Beads/G-Beads (Pharmacia, Freiburg)

Acrylamid 40% (Serva, Heidelberg)

Agarose (Serva, Heidelberg)

Ammoniumchlorid (CellSystems, St. Katharinen)

Ammoniumpersulfat (Bio-Rad, München)  
Ampicillin (Sigma, St Louis, USA)  
BSA (Sigma, St.Louis USA)  
Cibrobay (Ciprofloxacin) (Bayer, Leverkusen)  
Detektions-System ECL (Amersham, Braunschweig)  
Dimethylsulfoxid (Sigma, St.Louis, USA)  
DNA Längenstandards (MBI, )  
DNA Präparationskits (Qiagen, Hilden)  
dNTPs (Promega, Mannheim)  
Effectene Transfektions-Reagenz (Qiagen, Hilden)  
Ficoll (Immuno GmbH, Heidelberg)  
Flüssigstickstoff (Linde, München)  
Glycin (ICN, Aurora, Ohio, USA)  
Magermilchpulver (Merck, Darmstadt)  
Murines IL-3 (TEBU (Protech), Offenbach)  
Murines IL-7 (TEBU (Protech), Offenbach)  
PCR-Primer (Metabion, Martinsried)  
Proteinmarker See Blue®Plus2 (Invitrogen, Karlsruhe)  
Puromycin (Sigma, St. Louis, USA)  
SDS (ICN, Aurora, Ohio, USA)  
STI571 (Gleevec®) zur Verfügung gestellt von E. Buchdunger und D. Fabbro (Novartis Pharmaceuticals, Basel, Schweiz)  
TEMED (Roth, Karlsruhe)  
Tris (Amersham, Freiburg)  
Tritium-markiertes Thymidin (Amersham, Braunschweig)  
Trypanblau 0,5% (Serva, Heidelberg)

Alle anderen Chemikalien (Sigma, St.Louis, USA oder Roth, Karlsruhe)

## **Enzyme**

Restriktionsenzyme (Roche, Mannheim und NEB, Schwalbach und MBI, St.Leon-Roth)  
Pfu-DNA Polymerase (Promega, Mannheim)  
T4-DNA-Ligase (Roche, Mannheim)

Phosphatase (Calf Intestinal Phosphatase) (Promega, Mannheim)

Enzympuffer vom jeweiligen Hersteller des Enzyms

### Antikörper

Spezifität	Subtyp	Firma
p21 (Waf1/Cip1)	Kaninchen polyklonal (AB5)	Oncogene, Schwalbach
p21 (Waf1/Cip1)	Maus monoklonal (F5)	Santa Cruz, Heidelberg
c-Abl	Maus monoklonal (AB3)	Oncogene, Schwalbach
β-Tubulin	Kaninchen polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg
β-Tubulin	Maus monoklonal	Boehringer, Mannheim
P-Tyrosin	Maus monoklonal (PY99)	Santa Cruz, Heidelberg
anti-rabbit IgG	Sekundärantikörper, HRP-gekoppeltes F(ab') <sub>2</sub>	Amersham, Baunschweg
anti-mouse IgG	Sekundärantikörper, HRP-gekoppeltes F(ab') <sub>2</sub>	Amersham, Freiburg
CD11b/Mac-1	Ratte-anti-Maus IgG2b, PE-gekoppelt	BD Biosciences Pharmingen, San Diego USA
Gr-1 (Ly-6G)	Ratte-anti-Maus IgG2b, PE-gekoppelt	BD Biosciences Pharmingen, San Diego USA
CD45R/B220	Ratte-anti-Maus IgG2a, PE-gekoppelt	BD Biosciences Pharmingen, San Diego USA
CD19	Ratte-anti-Maus IgG2a, PE-gekoppelt	BD Biosciences Pharmingen, San Diego USA
CD25	Ratte-anti-Maus IgG2b, PE-gekoppelt	BD Biosciences Pharmingen, San Diego USA
CD4	Ratte-anti-Maus IgG2b, PE-gekoppelt	BD Biosciences Pharmingen, San Diego USA



CD8	Ratte-anti-Maus IgG2b, PE-gekoppelt	BD Biosciences Pharmingen, San Diego USA
Sca1	Ratte-anti-Maus IgG2a, PE-gekoppelt	BD Biosciences Pharmingen, San Diego USA
Isotyp IgG2a	Ratte-anti Maus, PE-gekoppelt	BD Biosciences Pharmingen, San Diego USA
Isotyp IgG2b	Ratte-anti Maus, PE-gekoppelt	BD Biosciences Pharmingen, San Diego USA
anti-rabbit IgG	FITC-gekoppelt	Jackson Immuno Research, USA
anti-mouse IgG	TRITC-gekoppelt	Jackson Immuno Research, USA

### 3.1.7 Geräte und Labormaterial

Bakterieninkubator (Heraeus, Hanau)

Bakterienschüttler (New Brunswick Scientific, Nürtingen)

Beschichtetes Papier (Schleicher & Schüll, Dassel)

Blotting Papier (Schleicher & Schüll, Dassel)

ECL-Filme (Amersham, Braunschweig)

Einfriergerät (Cryoson, Schöllkrippen)

Einfrierröhrchen (Nunc, Roskilde DK)

Elektroporationsgerät (Kodak, New Haven, USA)

Elektroporationsküvetten (Bio-Rad, München)

Entwickler (Agfa-Gevaert, Leverkusen)

Flüssigstickstofftank (Cryoson, Schöllkrippen)

Geldokumentationsanlage (LFT, Wasserburg)

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

Geltransferkammer (Bio-Rad, München)

Heizblock (Techne, Cambridge GB)

Inkubator (WTB, Tuttlingen)

Mikroskope (Zeiss, Oberkochen)

Parafilm M (American National Can, Greenwich USA)

PCR Maschine (Perkin Elmer, Norwalk, USA)

pH-Meter (WTW, Weilheim)  
Photometer (Pharmacia, Freiburg)  
Pipetten (Gilson, Langenfeld)  
Pipetten, Kulturflaschen, Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht)  
Pipettenspitzen (Sarstedt, Nümbrecht)  
Poly-L-lysin-beschichtete Objektträger (Sigma)  
Power-Supplies (Bio-Rad, München)  
Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg)  
Reinstwasseranlage (USF, Ransbach Baumbach)  
Schüttler (Bühler, Tübingen)  
Sterilbänke (BDK, Sonnenbühl)  
Sterilfilter (Gelman Sciences, Ann Arbor USA)  
Szintillationszähler (Wallac, Turku, Finnland)  
Taumelrolleninkubator (CAT, Staufen)  
Überkopffrotoren (Labinco, Breda, Niederlande)  
Vortex (Heidolph, Kelheim)  
Waage (Sartorius, Göttingen)  
Wasserbad (Köttermann, Hänigsen)  
Zählkammern (Brand, Wertheim)  
Zellschaber (Beckton Dickinson, Heidelberg)  
Zentrifugen (Eppendorf, Hamburg und Sigma, Osterode)

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Eukaryontische Zellkultur

#### Kultivierung von adhärennten Zellen und Suspensionszellen

Alle Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. 32D-Zellen wurden alle 2 Tage 1:5 bis 1:10 verdünnt, so dass die Zellzahl zwischen  $5 \times 10^4$  und  $1 \times 10^6$  pro ml betrug. Ideal ist eine Konzentration von  $1 \times 10^5$  bis  $5 \times 10^5$  pro ml. Cos7-, 293T- und NIH3T3-Zellen wurden alle 2 Tage 1:7 verdünnt, nachdem sie für 3-5 min mit Trypsin bei 37 °C vom Boden der Kulturflasche gelöst wurden. Das Inaktivieren des Trypsins erfolgte durch FCS-haltiges Medium. Falls das Experiment einen kompletten Mediumwechsel oder das Waschen der Zellen mit PBS erforderte, wurden die Zellen bei 200 rpm, 4 °C für 10 min sedimentiert und in frischem Medium aufgenommen. Wehi-3B wurden in Kultur gehalten, da ihr Überstand Interleukin-3 (IL-3) enthält. Dieser Überstand wurde dem Medium für die IL-3 abhängigen 32D-Zellen und Baf/B3 Zellen zugesetzt. Wehi-3B-Zellen wachsen semiadhärent und wurden durch Trypsin vom Flaschenboden gelöst. Der Überstand dieser Zelllinie wurde in regelmäßigen Abständen geerntet, sterilfiltriert und sofort verwendet, oder bei -20 °C eingefroren.

Kulturmedien:

für 32D-Zellen:

RPMI 1640

FCS 10 %

Wehi-3B-Überstand 10 %

für 32Dp210-, 32Dbcr-abl-, Wehi-3B-Zellen:

RPMI 1640

FCS 10 %

für Cos-7-, 293T-, NIH3T3-Zellen:

DMEM 4,5 g/l Glukose

FCS 10 %

#### Einfrieren von Zellkulturen

Zum Anlegen von Dauerkulturen wurden ca.  $1 \times 10^6$  Zellen pro Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden die Zellen bei 200 rpm, 4 °C für 10 min abzentrifugiert

und in Einfriermedium aufgenommen. Die Zellen wurden in einem Behälter mit Isopropanol langsam auf  $-80\text{ °C}$  eingefroren und nach einem Tag in flüssigem Stickstoff eingelagert.

Einfriermedium:	Einfriermedium für Knochenmarkzellen:
Medium	Medium für Knochenmarkszellen
20 % FCS	50 % FCS
10 % DMSO	10 % DMSO

### Auftauen von Dauerkulturen

Die 2 ml-Einfrieröhrchen wurden aus dem Stickstofftank genommen und auf Eis transportiert. Dann wurden sie bei  $37\text{ °C}$  im Wasserbad aufgetaut und in das entsprechende Kulturmedium überführt. Die Zellen wurden einmal mit Medium gewaschen, um das DMSO zu entfernen.

### Isolation von Knochenmarkzellen aus Mäusen

Aus den Ober- und Unterschenkelknochen getöteter Mäuse wurde das Knochenmark präpariert. Dazu wurden zunächst die Knochen präpariert und dann wurde das Knochenmark mit DMEM Medium und einer 23G Kanüle ausgespült. Die Zellsuspension wurde mehrmals erst durch eine 10 ml Pipette und dann durch eine 10 ml Pipette mit aufgesteckter  $200\text{ }\mu\text{l}$  Pipettenspitze pipettiert, um größere Zellklumpen zu trennen. Die restlichen weißen Krümel wurden für 5 min bei Raumtemperatur sedimentiert. Die Suspension wurde anschließend mit einer Plastikpipette ohne das Sediment in ein frisches 50 ml Röhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 200 rpm, 10 min,  $24\text{ °C}$  abzentrifugiert. Zur Lyse der Erythrozyten, die im Zellpellet vorhanden sind, wurde dieses in 3 ml Ammoniumchlorid (150 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 mM  $\text{KHCO}_3$ , 0,1 mM EDTA, pH 7,4) resuspendiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert (alternativ für 20 min auf Eis). Anschließend wurden die Knochenmarkzellen bei 200 rpm, 10 min,  $24\text{ °C}$  abzentrifugiert und 2 mal mit 20 ml RPMI Medium mit 20 % FCS gewaschen. Man erhielt so in etwa  $3 \times 10^7$  Zellen pro Maus. Nach diesem Schritt wurden die Zellen entweder in Aliquots eingefroren oder mit einem Transgen infiziert.

### 3.2.2 Produktion von rekombinantem Retrovirus

#### Produktion von rekombinantem Retrovirus

Um Knochenmarkzellen und 32D-Zellen mit dem Onkogen Bcr-Abl effektiv zu infizieren wurde rekombinanter ecotropher Retrovirus hergestellt, der für Bcr-Abl kodiert und nur Nagetierzellen infizieren kann. Als Produktionszelllinie für rekombinanten ecotrophen Retrovirus wurden 293T Zellen verwendet. Das zu verpackende retrovirale Plasmid wurde zusammen mit dem Verpackungsplasmid (MCV-ecopac) in 293T Zellen mittels  $\text{CaPO}_4$  transfiziert. Das zu verpackende Plasmid enthält die LTRs (Long Terminal Repeats), die als Verpackungssignal dienen und das gewünschte Gen flankieren. EcoPack enthält die Sequenzen der Proteine der Virushülle. Für die Transfektion wurde der CalPhos-Transfektions-Kit von Clontech verwendet (siehe  $\text{CaPO}_4$  Transfektion). 5 bis 12 h nach der Transfektion wurde das Medium vorsichtig gewechselt und 10 ml frisches vorgewärmtes Medium wurden zugegeben. 48 h nach Transfektionsbeginn wurde das Medium, das nun den rekombinanten Retrovirus enthalten sollte, abgenommen und durch einen  $0,45 \mu\text{m}$  Filter von restlichen 293T Zellen gereinigt. Der so produzierte Virusüberstand wurde in 1 ml Aliquots bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren und gelagert.

#### Bestimmung des Retrovirus-Titers

Die Titerbestimmung des pMSCV-bcr-abl-IRES-EGFP-Virus wurde per FACS-Analyse durchgeführt. Dazu wurden NIH3T3 Zellen in 6-Well Platten mit  $250 \mu\text{l}$ ,  $125 \mu\text{l}$ ,  $62,5 \mu\text{l}$ ,  $31,25 \mu\text{l}$ ,  $15,6 \mu\text{l}$  und  $7,8 \mu\text{l}$  Viruspräparation infiziert. Zwei Tage nach der Infektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin abgelöst. Anschließend wurde die Zellzahl pro Well und der Prozentsatz GFP-positiver Zellen mittels FACS-Analyse bestimmt. Der Titer berechnet sich aus der Gesamtzahl pro 6-Well  $\times$  Anteil der GFP-positiver Zellen:  $\mu\text{l}$  Virus-Präparation  $\times 1000 = \text{CFU/ml}$ . Alternativ dazu wurde der Titer über die immunologische Detektion der Prozentzahl Bcr-Abl-positiver Zellen ermittelt. Die Detektion von Bcr-Abl erfolgte dabei durch einen anti-Abl-Antikörper und einen sekundären TRITC-markierten Antikörper.

### 3.2.3 Retrovirale Infektion

#### Retrovirale Infektion von Knochenmarkzellen aus Mäusen

Die Knochenmarkzellen wurden wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben aus Mäusen isoliert. Es wurden entweder frische Zellen oder aufgetaute Zellen verwendet. Pro Infektion wurden  $4 \times 10^6$  Zellen in einem 50 ml Röhrchen abzentrifugiert und in 2 ml Medium resuspendiert. Dazu wurden 40  $\mu$ l 1M HEPES (Endkonzentration 10 mmol), 10  $\mu$ l Polybren (800  $\mu$ g/ml) (Endkonzentration 2  $\mu$ g/ml) und 8  $\mu$ l IL-7 (5  $\mu$ g/ml) (Endkonzentration 10 ng/ml) pipettiert. Dazu wurden 2 ml frisch aufgetauter rekombinanter Retrovirus gegeben, der wie beschrieben hergestellt wurde. Die Suspension wurde vorsichtig gemischt und in ein Schälchen einer 6-Well Platte überführt. Anschließend wurde eine Spin-Infektion durchgeführt. Dazu wurde der Ansatz bei  $1530 \times g$  für 90 min bei 30 °C zentrifugiert. Danach wurden die Zellen für 4 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Das Medium der Zellen wurde gewechselt, um das Polybren zu entziehen. Dieses wird für eine effiziente Infektion benötigt, wirkt aber bei zu langer Inkubation toxisch auf die Zellen. Dem Medium für die Knochenmarkzellen wurde nochmals IL-7 beigelegt, da die Zellen noch nicht unabhängig von Wachstumsfaktoren wachsen. Am Tag 2 nach der Infektion wurde das Medium erneut gewechselt. Die Zellen wurden einmal mit Medium gewaschen, um den Wachstumsfaktor zu entziehen und die Zellen auf Wachstumsfaktor-Unabhängigkeit zu selektieren: Nur Zellen, die infiziert wurden und das transformierende Onkogen exprimieren, wachsen. Die mit Leervektor infizierten Kontrollzellen sollten sterben.

Medium für Knochenmarkzellen:

RPMI mit:

20 % FCS

0,5 % Penicillin/Streptomycin

50  $\mu$ mol  $\beta$ -Mercaptoethanol

1  $\mu$ g/ml Ciprofloxacin

#### Retrovirale Infektion von 32D-Zellen

Die retrovirale Infektion von 32D-Zellen erfolgte in 24-Well-Platten. Dazu wurden  $5 \times 10^4$

Zellen mit jeweils gleichen Mengen an Retrovirus in einem Gesamtvolumen von 500 µl mit 8 µg/ml Polybren für 4-5 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 1,5 ml Medium auf die Zellen gegeben. Bei Infektion mit Bcr-Abl-kodierendem Plasmid wurden die 32D-Zellen 48 h nach der Infektion auf IL-3 unabhängiges Wachstum selektiert.

#### Retrovirale Infektion von NIH3T3 Zellen

Zur retroviralen Infektion von NIH3T3-Zellen wurden einen Tag vor der Infektion  $2 \times 10^5$  Zellen in ein 6-Well ausgesät. Die Infektion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 1 ml DMEM Medium mit 10% FCS, 8 µg/ml Polybren und Virusüberstand (siehe Titerbestimmung). 24 h nach Infektion wurde das Medium gegen 2 ml frisches Medium gewechselt. 48 h später erfolgte die GFP-Messung mittels FACS-Analyse oder die immunologische Detektion der Bcr-Abl-Expression.

### **3.2.4 Transfektionsverfahren eukaryontischer Zellen**

#### Transfektion durch $\text{CaPO}_4$

Zur transienten Transfektion von 293T Zellen wurden die CalPhos-Transfektions Reagenzien von BD Biosciences verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

#### Transfektion von 32D-Zellen durch Elektroporation

$4 \times 10^6$  32D-Zellen wurden pro Ansatz bei 200 rpm und 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Die Zellen wurden zweimal in PBS ohne Calcium, Magnesium und Natriumbicarbonat gewaschen. Das Pellet wurde in 400 µl RPMI ohne FCS resuspendiert. Dazu wurden 5 – 25 µg der zu transfizierenden DNA pipettiert. Die Suspension wurde in einer Elektroporationsküvette für 5-10 min auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte die Elektroporation bei 950 µF und 320 V. Sofort nach der Elektroporation wurde die Küvette kurz geschüttelt und für 1 min auf Eis gestellt. Dann wurden die Zellen in vorgelegtes Selektionsmedium (RPMI mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS ohne Wehi-3B-Überstand) pipettiert.

### Transfektion durch Liposomen

Die transiente Transfektion von Cos7-Zellen erfolgte durch liposomale Transfektion mittels Effectene-Transfektions-Reagenz von Quiagen wie vom Hersteller angegeben. Bei transienten Transfektionen wurden die Zellen nach 48 h geerntet und Proteinlysate wurden aus den Zellen hergestellt.

### Anzucht und Selektion stabiler Zelllinien

Die Anzucht von stabilen 32D-Zellen erfolgte, nachdem die Zellen entweder durch Elektroporation transfiziert wurden oder durch rekombinanten Retrovirus infiziert wurden. Stabil transformierte Knochenmarkzellen wurden durch retrovirale Infektion hergestellt. Da Bcr-Abl hämatopoetische Zellen transformiert und IL-3-unabhängiges Wachstum vermittelt, wurden Zellen mit Bcr-Abl-Transfektion und -Expression durch Wachstumsfaktorentzug selektiert. Andere Zelllinien wurden durch Zugabe von Antibiotika auf die Expression eines Antibiotikaresistenzgens selektiert.

## **3.2.5 Kultivierung von Bakterien**

### Herstellung kompetenter Bakterien

Um *E. coli* XL-1 blue kompetent zu machen, wurden die Bakterien zunächst auf MgCl<sub>2</sub>-LB Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Mit einer gepickten Einzelkolonie wurden 5 ml TYM-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Die Übernachtskultur wurde am nächsten Morgen in 300 ml TYM-Medium überimpft und unter den gleichen Bedingungen bis zu einer OD 600 von 0,7 bis 0,8 vermehrt. Der 300 ml Ansatz wurde in 50 ml Falcon-Röhrchen aufgeteilt und abzentrifugiert (3000 rpm, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde dekantiert und der Zelleniederschlag sofort auf Eis gestellt. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden im Kühlraum (4 °C) durchgeführt. Die Bakterien (alle Mengenangaben beziehen sich auf einen 50 ml Ansatz) wurden vorsichtig in je 15 ml TFBII-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis gestellt. Nach erneuter Zentrifugation (wie oben) wurde der Niederschlag in 2 ml TFBII-Puffer aufgenommen, zügig zu 200 µl Aliquots abgefüllt und die Eppendorf-Gefäße wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte bei -80 °C. Die Transformationseffizienz betrug zwischen 0,7 und 2,0×10<sup>8</sup> Kolonien pro µg DNA-Plasmid.



MgCl <sub>2</sub> -LB-Platten:	TYM-Medium:
Trypton 1 %	Trypton 2 %
Hefeextrakt 0,5 %	Hefeextrakt 0,5 %
NaCl 0,5 %	NaCl 100 mM
MgCl <sub>2</sub> 10 mM	MgCl <sub>2</sub> 10 mM
Agar 1,5 %	

TFBI Puffer:	TFBII Puffer:
KOAc 30 mM	NaMOPS 10 mM
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	CaCl <sub>2</sub> 75 mM
CaCl <sub>2</sub> 100 mM	KCl 10 mM
Glycerin 15 %	Glycerin 15 %

### Transformation von Bakterien

Für jeden Transformationsansatz wurden 100 µl kompetenter *E. coli* XL1 blue-Bakterien auf Eis aufgetaut. Die zu transformierende DNA sowie 1 µl β-Mercaptoethanol wurden zugegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurde der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde im Wasserbad der Hitzeschock bei 42 °C für 45 Sekunden durchgeführt. Dann wurden die Bakterien sofort wieder für 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Nach der Zugabe von 400 µl warmen SOC-Medium wurde die Kultur für 60 min bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Etwa 100 µl dieser Kultur wurden anschließend auf LB/Amp-Platten ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert.

SOC-Medium:	nach dem Autoklavieren zugegeben:	LB/Amp-Platten:
Trypton 10 g	1 M MgCl <sub>2</sub> 5 ml	Trypton 10 g/l
Hefeextrakt 2,5 g	1 M MgSO <sub>4</sub> 5 ml	Hefeextrakt 5 g/l
NaCl 0,25 g	2 M Glucose 5 ml	NaCl 10 g/l
H <sub>2</sub> O dd. 485 ml	sterilfiltrieren	Agar 15 g/l
		Ampicillin 100 mg/l

### 3.2.6 Molekularbiologische Methoden

#### Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Plasmid-DNA wurde aus Bakterien über Anionenaustauschersäulen isoliert. Es wurden Präparationen im "Mini"- und "Maxi"- Maßstab mit den Präparationsreagenzien und nach den Protokollen von Qiagen durchgeführt.

#### Aufreinigung von DNA nach enzymatischen Reaktionen

Die Aufreinigung von DNA nach enzymatischer Reaktion erfolgte mittels des "Quiaquick-Spin-Kits" von Qiagen über eine Säule nach Anleitung des Herstellers.

#### Polymerasekettenreaktion

Zur *in-vitro* Amplifizierung von DNA wurde als Matrize Plasmid-DNA verwendet.

Reaktionsansatz:

Matrizen-DNA: 100 ng

5'-Primer: 100 pmol

3'-Primer: 100 pmol

10 mM dNTP-Lösung (2,5 mM je dNTP): 2 µl

10×Pfu-Puffer: 5 µl.

Pfu-DNA-Polymerase: 2,5 U

ad 50 µl mit sterilem Millipore-Wasser

Protokoll:

35 Zyklen:

Denaturierung: 1 min, 95 °C,

Hybridisierung: 1 min, Temperatur abhängig vom Primer,

Polymerisierung: 2 min pro 1 kb, 72 °C

Abkühlung auf 4 °C

Der Ansatz wurde in ein verschließbares 100 µl Reaktionsgefäß gegeben und im Thermocycler mit dem oben angegebenen Protokoll durchgeführt. Vor der weiteren Verwendung wurde das PCR-Produkt aus einem Agarosegel aufgereinigt.

#### DNA-Sequenzierung

Sequenzanalysen wurden von der Firma MediGenomix (Martinsried) durch zyklische Terminationsreaktion mit Fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotiden durchgeführt.

### Restriktion von DNA

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde zur Umklonierung von Gensequenzen und zur Überprüfung auf erfolgreiche Klonierung eingesetzt. Für eine vollständige Restriktion wurden dabei zwischen 0,5 und 4 µg DNA mit 1 bis 30 U Enzym eingesetzt. Die Spaltung erfolgte über ein bis zwei Stunden bei der für das Enzym vorgegebenen Reaktionstemperatur in 20 bis 50 µl Gesamtvolumen. Die Reaktionsbedingungen wie erforderliche Restriktionspuffer, Temperatur und Restriktionsaktivität wurden den Herstellerangaben entnommen. Die Hitzeinaktivierung des Enzyms erfolgte, falls möglich, durch Inkubation bei 65 bis 75 °C für 10 bis 20 min. Die Kontrolle der Spaltung erfolgte durch Agarosegelelektrophorese.

### Dephosphorylierung von 5'-DNA-Fragmenten

Die Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden nach Restriktionsverdau wurde mit „Calf-Intestinal Phosphatase“ (CIP) von Promega nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden 10 U CIP nach einem Restriktionsverdau direkt in den Ansatz pipettiert und 1 h bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wurde bei 65 °C für 20 min inaktiviert.

### Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten und Vektoren wurde T4-DNA-Ligase verwendet. Dabei wurden im Allgemeinen etwa 100 ng eines aufgeschnittenen Vektors mit der dreifachen Menge des Insertionsfragmentes ligiert. Die Ligation wurde mit 10 U Ligase in einem Gesamtvolumen von 10 µl im vom Hersteller mitgeliefertem Ligase-Puffer durchgeführt. Die Reaktion erfolgte über 4 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C. Anschließend wurden kompetente Bakterien mit 10 µl des Ligationsansatzes transformiert.

### Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen und zur Aufreinigung von DNA (Entfernung von Enzymen und Umpufferung) wurden Gelextraktions-Kits von Quiagen verwendet. Die elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mit dem Skalpell ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden entsprechend der Anleitung des Herstellers bei 50 °C geschmolzen. Dann wurde die Suspension nach Anleitung des Herstellers durch eine Reinigungssäule

zentrifugiert und einmal gewaschen. Anschließend wurde die DNA mit H<sub>2</sub>O von der Säule eluiert.

### Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel

Die Agarose wurde in der gewünschten Konzentration (0,8-1,5 %) mit 1 × TAE Puffer aufgeschlämmt, im Mikrowellenherd aufgeköcht und gelöst. Nach dem Abkühlen auf 60 °C wurde die Lösung mit 0,5 g/ml Ethidiumbromid versetzt. Das Agarosegel wurde in einen Gelträger gegossen, mit einem entsprechenden Kamm bestückt und nach dem Erstarren in die entsprechende Gelapparatur eingesetzt. Die DNA-Proben wurden mit 0,2 Volumen Auftragspuffer versetzt und die Elektrophorese in TAE-Puffer mit 50 bis 100 V durchgeführt. Die DNA wurde anschließend durch die UV-Absorption des interkalierten Ethidiumbromids sichtbar gemacht. Parallel aufgetragene Größenmarker erlaubten eine Abschätzung der Länge der DNA-Fragmente.

50×TAE-Puffer:

Tris 242 g

Eisessig 57,1 ml

EDTA 37,2 g

NaOH ad. pH 8

H<sub>2</sub>O ad. 1000 ml

Auftragspuffer :

Tris/HCl pH 8, 10 mM

EDTA pH 8, 50 mM

Glyzerin 50 %

Bromphenolblau 0,01 %

### **3.2.7 Proteinbiochemische Methoden**

#### Lyse von Zellen und Isolierung von Gesamtprotein aus Zellen

Die Zusammensetzung des Lysispuffers und die Konzentration seiner Komponenten sind von entscheidender Bedeutung und sollten je nach Fragestellung immer optimiert werden. Ein wichtiger Faktor für die Stringenz eines Lysispuffers ist die Stärke des verwendeten Detergens. NP40 ist ein etwas stärkeres Detergens, kann aber in geringeren Konzentrationen verwendet werden und macht auch Membranproteine gut löslich. Die Funktionen der anderen Komponenten sind: Glycerin als Gefrierschutz, EDTA zur Komplexierung von Mg<sup>2+</sup> und Mn<sup>2+</sup> und damit Inhibierung von Kinasen, NaCl für das Einstellen der Osmolarität, Tris-Cl als pH-Puffer, Natriumfluorid als Serin- und Threonin-Phosphataseinhibitor und Phenylphosphat als Phosphataseinhibitor. Zusätzlich wurden dem Lysispuffer folgende

Inhibitoren zugefügt: PMSF, Leupeptin, Aprotinin (Proteaseinhibitoren), sowie Na-Orthovanadat (Tyrosinphosphataseinhibitor). Alternativ dazu wurde Proteinaseinhibitor-Coctail und Phosphataseinhibitor-Coctail I und II von Sigma zugegeben. Alle Zellysate wurden auf Eis gehalten, um Proteine und Proteinkomplexe zu schützen (Proteolyse, Dissoziation).

Lysispuffer:	Zusätzlich pro 1 Milliliter Lysispuffer:
NP 40 0,5 %	PMSF 10 µl
EDTA 1 mM	NaVO <sub>4</sub> 10 µl
Tris-Cl pH 7,4 50 mM	Aprotinin 5 µl
Natriumfluorid 1 mM	Leupeptin 2 µl
NaCl 150 mM	alternativ dazu:
Glycerin 15 %	Phosphataseinhibitor-Coctail II (Sigma) 10 µl
	Proteinaseinhibitor-Coctail (Sigma) 10 µl

Durchführung der Zellyse:

Zur Lyse der Zellen wurden  $1 \times 10^7$  Zellen in 100 µl Lysispuffer lysiert. Das erste Durchmischen erfolgte durch zweimaliges Auf- und Abpipettieren mit einer blauen Pipettenspitze, danach wurden die Proben 25 min bei 4 °C rotiert. Schließlich wurde das Lysat durch Abzentrifugieren für 15 min bei 4 °C und 14000 rpm von unlöslichen Anteilen wie größeren Membranteilen befreit. In dem klaren Lysat sollten sich jetzt zytosolische, nukleäre und membranäre Zellproteine befinden. Im Allgemeinen wurde für Experimente frisches Lysat hergestellt. Bei einigen Experimenten wurde das Lysat bei -80 °C eingefroren und später verwendet.

#### Bestimmung der Proteinkonzentration nach der BCA-Methode

Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge in einem Zellysate erfolgte durch die BCA-Methode mit den REagenzien von Pierce (Rockford, USA). Dazu wurden 900 µl BCA-Reagenz, 98 µl H<sub>2</sub>O bidest. und 2 µl Lysat vermischt und für 10 min bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Lösung bei 595 nm gemessen. Als Referenz dienten 900 µl BCA-Reagenz mit 100 µl H<sub>2</sub>O bidest.. Parallel dazu wurde auf die selbe Weise mit bekannten Mengen an Rinderserum-Albumin (5, 10, 15, 20, 25 und 30 µg BSA) eine Eichgerade erstellt, mit deren Hilfe über die Absorption die Proteinmenge bestimmt wurde.

### Elektrophorese von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Durch die Zugabe von SDS erfolgt die Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld nicht nach ihrer Ladung, sondern nach ihrem Molekulargewicht, über Gelfiltrationseffekte (verschieden konzentrierte Gele). SDS bindet dabei mit seinem hydrophoben Alkylrest in einer konstanten Rate (1 SDS/2 Aminosäuren) so an Proteine, dass die intrinsische Proteinladung durch die Sulfatgruppe des SDS maskiert wird. Zusätzlich wurde die Technik der *disc*-Elektrophorese (*discontinuous* pH) angewandt. Hierbei wird mit zwei unterschiedlichen Gelen, bei unterschiedlichen pH-Werten gearbeitet. Nach der Beschleunigung und Konzentrierung der Proteine im Sammelgel erfolgt ein „Auflaufen“ an der Grenzschicht Sammelgel-Trenngel. Dies hat zur Folge, dass die Banden schärfer begrenzt sind und besser aufgetrennt werden.

#### Herstellen der Polyacrylamidgele:

Zwei Glasplatten (für 8 × 10 cm große Gele) wurden mit Spacern und Klammern versehen im Gelständer fixiert. Zuerst wurde das Trenngel gegossen. Hierfür wurden die Reagenzien in der unten angegebenen Reihenfolge blasenfrei vermischt und vorsichtig zwischen die zwei Glasplatten pipettiert. Der Zwischenraum wurde bis etwa 2 cm unter den Rand der kleineren Platte gefüllt. Schließlich wurde alles auf die selbe Weise mit 1 ml Isopropanol überschichtet und für mindestens 30 min zum Polymerisieren stehen gelassen. Die Isopropanolschicht über dem auspolymerisierten Trenngel wurde abgegossen und mit Filterpapier abgesaugt. Nach zweimaligen ausspülen mit Wasser wurde der Zwischenraum bis zur Oberkante der kleineren Glasplatte blasenfrei mit Sammelgel gefüllt. Dann wurde ein vorher mit 70 % Ethanol gereinigter Kamm (10 Zähne) so eingesteckt, dass keine Blasen entstanden. Nach etwa 20 min wurde der Kamm entfernt, die Taschen mit Elektrophorese-Puffer ausgespült und das Gel in der Elektrophoresekammer befestigt. Diese wurde mit 1× Elektrophoresepuffer gefüllt.

#### Beladen der Gele mit Protein-Proben:

Die Proteinlysate wurden 1:1 mit Probenpuffer versetzt und zur vollständigen Reduktion für 5 min auf 100 °C erhitzt. Parallel wurde immer eine Bahn mit 10 µl Proteinmarker beladen. Das Laden des Gels und der Gellauf fanden bei Raumtemperatur statt. Der Gellauf erfolgte bei 80-100 V. Der Gellauf wurde beendet, wenn die blaue Bande des Farbmarkers im

Probenpuffer den unteren Rand der Glasplatten erreicht hat. Dann wurde das Gel für Immunoblots weiter verwendet.

Acrylamid/Bisacrylamid-Mix (40 %)

APS 10 %: 10 %-ige Lösung von APS in dd H<sub>2</sub>O, das bis zu vier Wochen bei 4 °C gelagert wurde.

4× Tris-Cl/SDS pH 8,8:

dd H<sub>2</sub>O 300 ml

dd H<sub>2</sub>O ad. 500 ml

Tris 91 g

SDS 2 g

mit HCl pH 8,8 einstellen

mit 0,45 µm Filter filtrieren

4× Tris-CL/SDS pH 6,8:

dd H<sub>2</sub>O 40 ml

Tris 6,05 g

SDS 0,4 g

mit HCl pH 6,8 einstellen

dd H<sub>2</sub>O ad. 100 ml

mit 0,45 µm Filter filtrieren

Trenngel 7 %:

Acrylamid/Bis. (40 %) 875 µl

4× Tris-Cl/SDS pH 8,8 1,25 ml

dd H<sub>2</sub>O 2,7 ml

TEMED 17 µl

APS 10% 7 µl

Sammelgel:

Acrylamid/Bis. (40 %) 150 µl

4× Tris-Cl/SDS pH 6,8 0,4 ml

dd H<sub>2</sub>O 1 ml

TEMED 2 µl

APS 10% 8,5 µl

5× Elektrophoresepuffer:

Tris 15,1 g

Glycin 72 g

SDS 5 g, dd H<sub>2</sub>O ad. 1000 ml

2× Probenpuffer:

4× Tris-Cl/SDS pH 6,8 12,5 ml

SDS 10% 20 ml

β-Mercaptoethanol 2 ml

Glycerin 20 ml

Bromphenolblau 1 mg

dd H<sub>2</sub>O 45,5 ml

### 3.2.8 Proteinimmunologische Methoden

#### Immunoblot (Westernblot)

##### Transfer:

Die zu analysierenden Proteine wurden durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und anschließend auf Nitrozellulose Membranen übertragen. Dazu wurde zunächst eine Nitrozellulose-Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten, kurz in dd H<sub>2</sub>O geschwenkt und dann in Transferpuffer gelagert. Ebenso wurden zwei Schwämme und zwei Whatman 3 MM-Papierstücke der Größe des Gels in Transferpuffer eingeweicht. Vom Polyacrylamid-Gel, das die nach Größe aufgetrennten Proteine enthält, wurde das Sammelgel abgeschnitten und in einer Transferkassette wurde es zusammen mit den weiteren Komponenten in folgender Reihenfolge blasenfrei durch Ausrollen mit einer Glaspipette aufeinandergelegt: Schwamm, Whatman-Papier, Gel, Nitrozellulose, Whatman-Papier, Schwamm. Die Kassette wurde geschlossen und in der mit Puffer gefüllten Transferkammer so befestigt, dass die Membran auf der Seite der Anode war. Der Transfer lief unter Rühren bei 4 °C und 80 V für eine Stunde.

##### Blockieren der Nitrozellulose-Membran:

Die auf die Nitrozellulose-Membran übertragenen Proteine wurden durch Antikörper analysiert. Da Antikörper auch unspezifisch an verschiedene Materialien binden können, ist es notwendig, alle Stellen der Membran, an denen keine Zellproteine gebunden haben, mit einem unspezifischen Protein zu blockieren. Nach der Transferlaufzeit wurde die Membran aus der Kammer genommen und bei Raumtemperatur für 2 h in einer Plastikschaale mit Blocking-Solution geschüttelt. Danach wurde sie einmal mit 1× TBST gespült und einmal für 5 min in 1× TBST geschüttelt, um überschüssige Blocking-Solution abzuwaschen.

##### Antikörper-Inkubation:

Die verwendeten primären Antikörper wurden in einer 1:1000 Verdünnung, die sekundären Antikörper in 1:2000 Verdünnungen jeweils in Inkubationslösung eingesetzt. Für Anti-Phosphorylierungs-Antikörper wurde als Inkubationslösung 5 % BSA verwendet, für alle anderen Antikörper wurde 1 % Magermilchpulver verwendet. Die Inkubation mit dem primären Antikörper gegen das zu untersuchende Protein erfolgte in einem Plastischälchen



über Nacht auf einem Schwenkinkubator bei 4 °C (Kühlraum). Die Membran wurde danach viermal für 5 min mit TBST gewaschen, bevor sie mit dem zweiten Antikörper für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Die Detektion der Proteine erfolgte nach erneutem Waschen mit TBST für 4× 5 min.

#### Detektion der Proteine:

Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Chemilumineszenz. Die ECL-Lösungen, die das Substrat für die Peroxidase enthält, wurden 1:1 gemischt. Die Membran wurde in einer Plastikschale mit der Detektionslösung übergossen. Nach einer Minute wurde der Blot entnommen, auf einem Papiertuch getrocknet und mit einer Plastikfolie blasenfrei bedeckt. Der Blot wurde in einer Filmkassette für verschiedene Zeitabstände (5 Sek bis 5 min) mit einem Film exponiert. Nach der Entwicklung des Films erscheinen Antikörper-Bindungsstellen als schwarze Banden. Die Markerpositionen wurden von der Membran auf den entwickelten Film mit einem Folienstift übertragen.

#### Strippen der ECL-Blots:

Bei der ECL-Methode ist es möglich, die Membran mehrfach (bis zu dreimal) einer Immundetektion zu unterziehen. Bei dem sogenannten „Strippen“ werden zunächst sowohl die sekundären, als auch die primären Antikörper von der Membran entfernt. Danach ist die Inkubation mit weiteren Antikörpern möglich. Die Membran wurde im Wasserbad bei 55 °C für 45 min in Stripping-Solution geschüttelt, dann mit 1× TBS einmal gespült und zweimal für 10 min gewaschen. Schließlich wurde erneut geblockt und mit Antikörpern inkubiert wie oben angegeben.

#### 10× TBST:

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

#### Stripping-Solution:

Tris-Cl pH 6,7 3,78 g  
SDS 10 g  
β-Mercaptoethanol 3,5 ml  
dd H<sub>2</sub>O ad. 500 ml

#### Blocking-Solutions für ECL:

5 % Magermilchpulver in 1× TBST

#### Inkubationslösung für Antikörper:

1 % Magermilchpulver in 1× TBST  
oder  
5 % BSA in 1× TBST

### In-situ-Immunfluoreszenzmikroskopie von Suspensionskulturzellen

Die Suspensionskulturzellen (32D-Zellen) wurden vor der Antikörperfärbung auf Glasobjektträger fixiert, die mit Polylysin beschichtet waren. Mit einem Fettstift wurde zuvor auf dem Objektträger ein ca. 1×1 cm großes Feld markiert, in das 100 µl Zellsuspension mit 250.000 Zellen pipettiert wurden. Die Objektträger wurden für 30 min bei 37 °C inkubiert, damit sich die Zellen auf dem Boden absetzen. Anschließend wurde das restliche Medium mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt. Zum Waschen der Zellen wurde mit einer Pasteurpipette PBS vom Rand ausgehend auf den Objektträger pipettiert, bis der ganze Objektträger bedeckt war. Anschließend wurde das PBS wieder mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Dann wurden die Zellen auf dem Objektträger mit Formaldehyd fixiert. Dazu wurde der Objektträger in ein 50 ml Röhrchen mit Formaldehydlösung gelegt und für 15 min bei RT inkubiert. Das restliche Formaldehyd wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Dann wurden die Zellen zur Neutralisation auf die gleiche Weise für 5 min bei RT in 1% Glycinlösung inkubiert. Zum Permeabilisieren der Zellen wurde der Objektträger mit den Zellen in ein Plastikröhrchen mit 0,2 % Triton-Lösung (in PBS) getaucht und für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger mit den Zellen 2 mal in PBS gewaschen.

#### Antikörperfärbung:

Zur Antikörperfärbung wurden die Zellen auf dem Objektträger mit 95 µl Lösung des primären Antikörpers (Verdünnung 1:20 in PBS) für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit PBS im 50 ml Röhrchen gewaschen. Danach wurden die Zellen für 1h bei RT mit dem sekundären Antikörper inkubiert, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist (Verdünnung 1:200). Die Zellen wurden 2 mal mit PBS wie oben gewaschen. Dann wurden die Zellen mit Mountening-Lösung bedeckt und eingedeckelt. Die Zellen wurden anschließend im konfokalen Fluoreszenz-Mikroskop analysiert und fotografiert. Alternativ zu einer Einzelfärbung wurden auch Doppelfärbungen mit zwei verschiedene Antikörpern mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenz-markierten Sekundär-Antikörpern durchgeführt. Bei zu hoher Hintergrundfluoreszenz können die Zellen mit 5 % BSA in PBS vor der Antikörperinkubation blockiert werden.

### In-situ-Immunfluoreszenzmikroskopie von adhärennten Zellen

Cos7-Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät, in die zuvor ein steriles Deckglas gelegt wurde. Auf diese Weise konnten die Zellen auf dem Deckglas für einen Tag anwachsen. Die Zellen wurden verwendet, wenn sie ca. 50-70 % konfluent waren. Zunächst wurde das Deckglas aus dem Schälchen genommen und vorsichtig mit PBS gewaschen. Anschließend wurde in einer Plastikschiene zum Fixieren der Zellen der Objektträger mit eiskaltem Methanol für 5 min überschichtet. Im Anschluss wurde der Objektträger mit Aceton überschichtet. Die Zellen wurden dann in einem Plastikschielchen mit PBS gewaschen. Die weitere Färbung der Zellen mit Antikörpern erfolgte wie für Suspensionskulturzellen angegeben. Die Zellen wurden anschließend im Fluoreszenzmikroskop analysiert und fotografiert.

### **3.2.9 Enzymatische *in-vitro*-Assays**

#### Luciferase-Assay

Das Luciferase-Gen dient als Reporter-Gen. Durch die Firefly-Luciferase wird Luciferin in Gegenwart von ATP, Luftsauerstoff und Magnesium-Ionen oxidiert und liefert Licht der Wellenlänge 562 nm. Durch die Messung des emittierten Lichts kann die Aktivität der Luciferase bestimmt werden. Zur Präparation des Proteinrohextrakts aus 32D-Zellen wurden die Zellen 2 Tage nach Elektroporation bei 1200 rpm, 20 °C, 10 min abzentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Sie wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 55 µl Extraktionspuffer aufgenommen und bei -70 °C eingefroren. Anschließend wurde das Pellet bei 15.000 rpm, 15 min bei 4 °C abzentrifugiert. Um die Aktivität der Luciferase in einem Protein-Rohlysat aus 32D-Zellen zu bestimmen, wurde eine definierte Menge an Proteinrohextrakt (40 µl) pro Well in einer 96-Well Mikrotiterplatte gegeben. Die Messung der frei werdenden Lichtmenge nach automatischer Zugabe von 100 µl Assaypuffer erfolgte in einem Luminometer. Die Dauer des Messvorgangs betrug 10 Sekunden. Die Einheit der gemessenen Lichtmenge wird als RLU (Relative Lichteinheiten) definiert. Um das Messpufferniveau festzustellen wurden parallel mindestens 3 Ansätze mit 100 µl Messpuffer ohne Proteinextrakt gemessen. Zur Kontrolle wurde auch der Proteinrohextrakt von untransfizierten Zellen vermessen. Er zeigte stets Messpufferniveau und somit keine Luciferaseaktivität. Zur Normierung der Transfektionseffizienz wurde zusammen mit dem Reporterplasmid ein konstitutiv aktives β-Galaktosidaseplasmid

transfiziert. Die Normierung der RLU aus der Luciferase-Messung erfolgte so durch die RLU der  $\beta$ -Galaktosidase-Messung.

5× Extraktionspuffer	Assaypuffer:
50 % Glycerin	20 mM Tricin
5 % Triton X-100	1,07 mM $\text{MgCO}_4$
10 mM EDTA	2,67 mM $\text{MgSO}_4$
125 mM Tris	0,1 mM EDTA
DTT: frisch zugegeben,	33,3 mM DTT
Endkonzentration 2 mM	270 $\mu\text{M}$ CoenzymA
	470 $\mu\text{M}$ Luciferin, 530 $\mu\text{M}$ ATP

### $\beta$ -Galaktosidase-Assay

Die Messung erfolgte modifiziert nach der Methode von Miller (1972). Für die Detektion der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität wurden 10  $\mu\text{l}$  Proteinrohextrakt eingesetzt, die in eine Mikrotiterplatte (96-Well) pipettiert wurden. Zu jedem Well wurden 100  $\mu\text{l}$  Reaktionspuffer A zugegeben. Es erfolgte die Inkubation bei Raumtemperatur für 15-20 min. Während der Messung wurde vom Messgerät automatisch zur Verstärkung der Reaktion Reaktionspuffer B zugegeben.

Reaktionspuffer A:	Reaktionspuffer B:
300 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	0,2 M NaOH
200 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	10 % Emerald Enhancer
50 mM KCl	
1 % Galacton-Plus	

### **3.2.10 Zellbasierende Analyse-Methoden**

#### Detektion der GFP-Fluoreszenz in lebenden Zellen durch FACS-Analyse

Die Detektion von GFP-positiven Zellen erfolgte durch FACS-Analyse. Dazu wurden  $1 \times 10^5$  Zellen in einem FACS-Röhrchen abzentrifugiert. Sie wurden einmal mit 2 ml PBS gewaschen und zur FACS-Analyse in 500 ml PBS resuspendiert.

### Analyse von Oberflächenmarkern in lebenden Zellen durch FACS-Analyse

Die Analyse von Oberflächenmarkern von Zellen erfolgte durch FACS-Analyse nach Inkubation der Zellen mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen die Oberflächenmarker. Dazu wurden  $1 \times 10^5$  Zellen in einem FACS-Röhrchen abzentrifugiert. Sie wurden einmal mit 2 ml PBS gewaschen und anschließend in 100  $\mu$ l PBS mit 1  $\mu$ l des Antikörpers für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und zur FACS-Analyse in 500 ml PBS resuspendiert. Parallel dazu wurde jeweils eine Isotyp-Kontrolle durchgeführt, um eine unspezifische Bindung des Antikörpers auf der Oberfläche der Zellen auszuschließen.

### Detektion der Apoptose durch AnnexinV-Färbung

AnnexinV ist ein 35-36 kDa großes Protein, das an Phosphatidylserin (PS) bindet. Die Externalisierung von PS erfolgt in den Membranen von früh-apoptotischen Zellen. Die Bestimmung der Anzahl apoptotischer Zellen erfolgte mittels Färbung einer Zellpopulation mit FITC- oder PE- markiertem AnnexinV, das an das PS auf der Zelloberfläche apoptotischer Zellen bindet. Durch anschließende FACS-Analyse wurde der Anteil apoptotischer Zellen einer Population gemessen.

Zur AnnexinV-PE- oder Annexin-FITC-Messung wurden die AnnexinV Apoptose-Detektions-Reagenzien von PharMingen BD oder von Bender-Med-Systems nach Anleitung der Hersteller verwendet.

### Bestimmung der Zellvitalität durch Zählen der Zellen

Um die Anzahl lebender Zellen einer Zellpopulation zu bestimmen, ist die direkteste Methode, die Lebendzellzahl durch Zählen zu bestimmen. Um exakte Zellmengen zu bestimmen, wurde eine Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung mittels Trypanblauausschluß-Färbung durchgeführt. Zur Bestimmung wurden 20  $\mu$ l einer Zellpopulation in eine 96-Loch-Platte überführt und mit 20  $\mu$ l 0,5 % Trypanblau-Lösung gut gemischt. Von dieser Mischung wurden etwa 10  $\mu$ l in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die Auszählung der Zellen erfolgte unter dem Lichtmikroskop. Blau-gefärbte Zellen wurden nicht mitgezählt. Aus der Zahl der ausgezählten Zellen, dem Verdünnungsfaktor und dem Kammerfaktor lässt sich die Zellzahl berechnen. Zur Bestimmung der relativen Zu- oder Abnahme der Zellzahl kann man

die Zellzahl einer Probe auf die Zellzahl einer unbehandelten Kontrolle beziehen.

### Bestimmung der Proliferationsrate durch immunologische Detektion des BrdU-Einbaus

Eine Methode zur Messung der Proliferationsrate bzw. der Zellzyklusprogression von Zellen ist die Messung der DNA-Syntheserate. Die DNA-Synthese kann durch Einbau des Pyrimidin-Analogs 5-Bromo-2'-Deoxyuridine (BrdU) in die DNA gemessen werden. Anschließend erfolgt die immunologische Detektion und Quantifizierung des in die DNA eingebauten BrdUs.

Zur Messung der DNA-Synthese von Bcr-Abl-transformierten Knochenmarkzellen wurde der BrdU-Zellproliferationsassay (chemilumineszent) von Roche verwendet. Es wurden  $5 \times 10^4$  Zellen in 100  $\mu$ l Medium in weißen 96-Well Platten mit durchsichtigem Boden ausgesät. BrdU wurde jeweils bis zu einer Endkonzentration von 10  $\mu$ M zugegeben. Die Zellen wurden bei 37 °C für 12 h und 24 h inkubiert und zu den jeweiligen Zeitpunkten geerntet. Dazu wurden die Zellen in den 96-Well Platten bei  $300 \times g$  für 10 min abzentrifugiert und mit einem Föhn für 15 min in den 96-Well Platten getrocknet. Die Platten wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C für maximal 24 h gelagert. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen nach Angaben des Herstellers. Die fixierten und permeabilisierten Zellen wurden zur Quantifizierung des Eingebauten BrdU-Gehalts mit dem Peroxidase-gekoppelten Anti-BrdU-Antikörper inkubiert. Die Substratreaktion erfolgte durch Zugabe der Luminollösung. Die Detektion der freiwerdenden Lichtmenge wurde in einem Luminometer durchgeführt. Die daraus resultierenden Relativen Lichteinheiten (RLU) korrelieren direkt mit der Menge an synthetisierter DNA und dadurch mit der Anzahl proliferierender Zellen.

### Bestimmung der Zellzyklusphasen

Zur Analyse der Verteilung einer Zellpopulation im Zellzyklus misst man den Prozentsatz der Zellen in den Zellzyklusphasen. Dazu bestimmt man den DNA Gehalt der Zellen. In der G1-Phase beträgt der DNA Gehalt 1N, in der G2/M Phase 2N, in der S-Phase liegt der Gehalt der DNA dazwischen. Der DNA-Gehalt wird über die Interkalation von Propidiumiodid in die DNA und die daraus resultierende Fluoreszenzstärke im FACS-Gerät bestimmt.

Zur Zellzyklusmessung wurden  $1 \times 10^6$  Zellen bei 200 rpm abzentrifugiert und einmal mit 2 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml 90 % Ethanol resuspendiert und zum Fixieren 1 h auf Eis gestellt. Danach wurden die Zellen bei 200 rpm abzentrifugiert,

zweimal mit 2 ml kaltem PBS gewaschen und in PI-Puffer resuspendiert. Die Proben wurden bis zur Messung bei 4 °C aufbewahrt. Die Analyse der Propidiumiodid-Fluoreszenz erfolgte mittels FACS-Analyse.

PI-Puffer:

20 µg/ml Propidiumiodid

20 mM EDTA, pH 8,0

0,5 mg/ml RNaseA

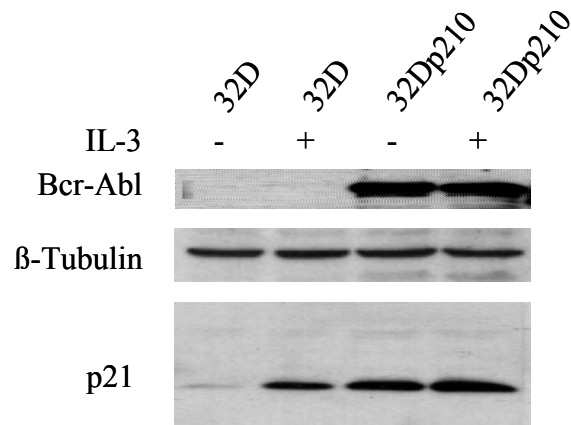
## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Der Einfluss von Bcr-Abl auf die Expression von p21 in hämatopoetischen Zellen**

#### **4.1.1 Die Expression von Bcr-Abl erhöht die Expression von p21 in 32D-Zellen**

Bcr-Abl dereguliert die Proliferation und das Überleben hämatopoetischer Zellen und führt so zur Entstehung der chronischen myeloischen Leukämie. Um diese Mechanismen näher zu charakterisieren, sollte untersucht werden, ob Bcr-Abl den Zellzyklusregulator p21 dereguliert und welche Rolle p21 in Bcr-Abl transformierten Zellen spielt. Da p21 seine Funktion vor allem über die Regulation seines Expressionsniveaus ausübt, wurde zunächst untersucht, ob das Onkoprotein Bcr-Abl die Expression von p21 beeinflusst. Um hierzu erste Hinweise zu gewinnen, wurden zunächst die Expressionsniveaus von p21 zwischen 32Dp210-Zellen, die Bcr-Abl stabil exprimieren, und untransformierten 32D-Zellen verglichen. Die p21-Expression wurde mittels Immunoblot untersucht (Abbildung 4). Im Immunoblot ist zu sehen, dass die Expression von p21 in 32Dp210-Zellen im Vergleich zu 32D-Zellen deutlich erhöht ist. In normalen 32D-Zellen wird p21 durch den Wachstumsfaktor Interleukin 3 (IL-3) hochreguliert, während in 32Dp210-Zellen die p21-Expression nur geringfügig durch IL-3 beeinflusst wird. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Expression von p21 durch die Expression von Bcr-Abl erhöht wird. Außerdem wird die p21-Expression in 32Dp210-Zellen nicht mehr deutlich durch IL-3 reguliert, während in 32D-Zellen bei IL-3-Entzug die p21-Expression schon nach 12 h deutlich reduziert ist. Bcr-Abl führt in 32D-Zellen folglich zur Wachstumsfaktor-unabhängigen Überexpression von p21. In weiteren Experimenten sollte untersucht werden, ob p21 ein direktes Zielmolekül von Bcr-Abl ist. Auch sollte ausgeschlossen werden, dass die p21-Expression in den Bcr-Abl-transformierten 32D-Zellen durch Sekundärmutationen beeinflusst wird.





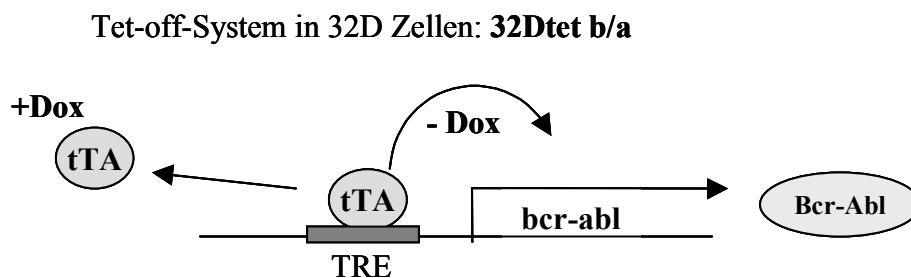
**Abbildung 4: Die Expression von p21 wird durch die Expression von Bcr-Abl und durch IL-3 in 32D-Zellen hochreguliert.** 32D-Zellen und Bcr-Abl-exprimierende 32D-Zellen (32Dp210) wurden für 12 h mit einer Anfangsdichte von  $1 \times 10^5$ /ml angezogen und jeweils ohne (-) und mit (+) Interleukin-3 (IL-3) (5 U/ml) kultiviert. Aus den Zelllinien wurden die Proteinlysate präpariert und die p21-Expression wurde mittels Westernblots untersucht. Parallel dazu wurde zur Ladekontrolle der Proteinkonzentration  $\beta$ -Tubulin detektiert. Außerdem wurde die Bcr-Abl-Expression mit Antikörpern gegen c-Abl überprüft.

#### 4.1.2 Konstruktion einer induzierbaren 32D-Zelllinie: 32Dtet b/a

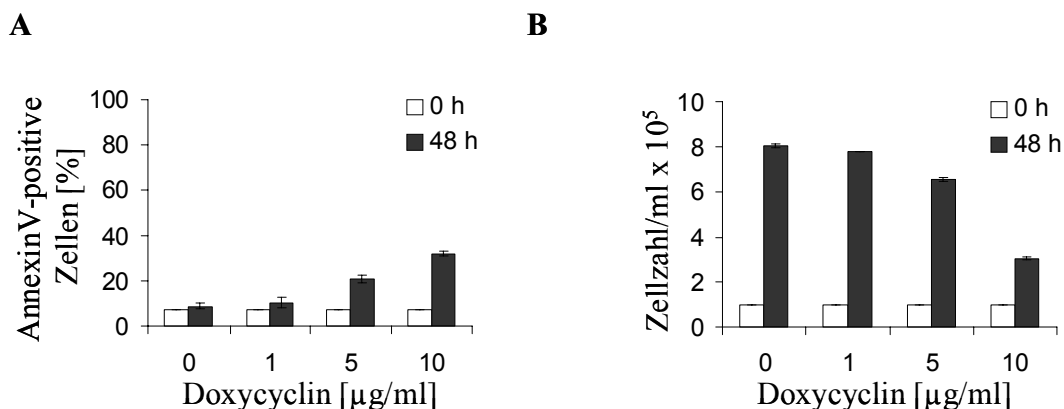
Um zu bestätigen, dass Bcr-Abl die Expression von p21 erhöht, wurde eine 32D-Zelllinie generiert, in der die Bcr-Abl-Expression reguliert werden kann. Hierzu wurde das Tet-System in 32D-Zellen etabliert, mit dem die Bcr-Abl Expression in der Zelle durch Doxycyclin abgeschaltet werden kann. Außerdem sollte die Zelllinie bei Abschalten der Bcr-Abl-Expression noch IL-3-abhängig wachsen, so dass eine Transformation der Zellen durch Sekundärmutationen ausgeschlossen werden kann. Im Tet-off-System wird zur Regulation der Expression eines Gens der Transkriptionsaktivator tTA verwendet (schematische Abbildung 5): Dieses besteht aus einer Fusion des Tetracyclin-Repressors (TetR) aus *E. coli* mit der Aktivatordomäne aus dem Transkriptionsfaktor VP16 des Herpes simplex Virus (Gossen et al., 1995). tTA bindet in Abwesenheit des Tetracyclinderivats Doxycyclin (Dox) an das Tet-responsive-Element (TRE), einem Minimalpromoter, und aktiviert so die Expression des zu regulierenden Gens. Bei Anwesenheit von Doxycyclin wird tTA induziert und tTA kann nicht mehr an TRE binden. Die Genexpression wird abgeschaltet.

Vor der Etablierung des Tet-Systems in 32D-Zellen wurde zunächst die Toxizität von Doxycyclin auf 32D-Zellen ausgetestet. Dazu wurden 32D-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Doxycyclin inkubiert. Der Einfluss von Doxycyclin auf die Lebendzellzahl wurde mittels Trypanblaufärbung überprüft. Der Einfluss des Antibiotikums

auf die Apoptose wurde durch AnnexinV-Messung bestimmt (Abbildung 6). Bis zu einer Konzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  ist Doxycyclin nicht toxisch. Die von der Literatur vorgeschlagene Menge zur Induktion des tTA ist 1-2  $\mu\text{g Dox/ml}$ . Das Tet-System kann also auch in 32D-Zellen angewendet werden.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung des Tet-Systems:** Das Tet-induzierbare System wurde in 32D-Zellen etabliert: Ohne Doxycyclin bindet tTA an TRE und induziert die Expression von Bcr-Abl. Mit Doxycyclin wird tTA induziert und Bcr-Abl wird nicht exprimiert. tTA: Tet-Transaktivator, Dox = Doxycyclin, TRE = Tet-responsive Element = Bindestelle für tTA.



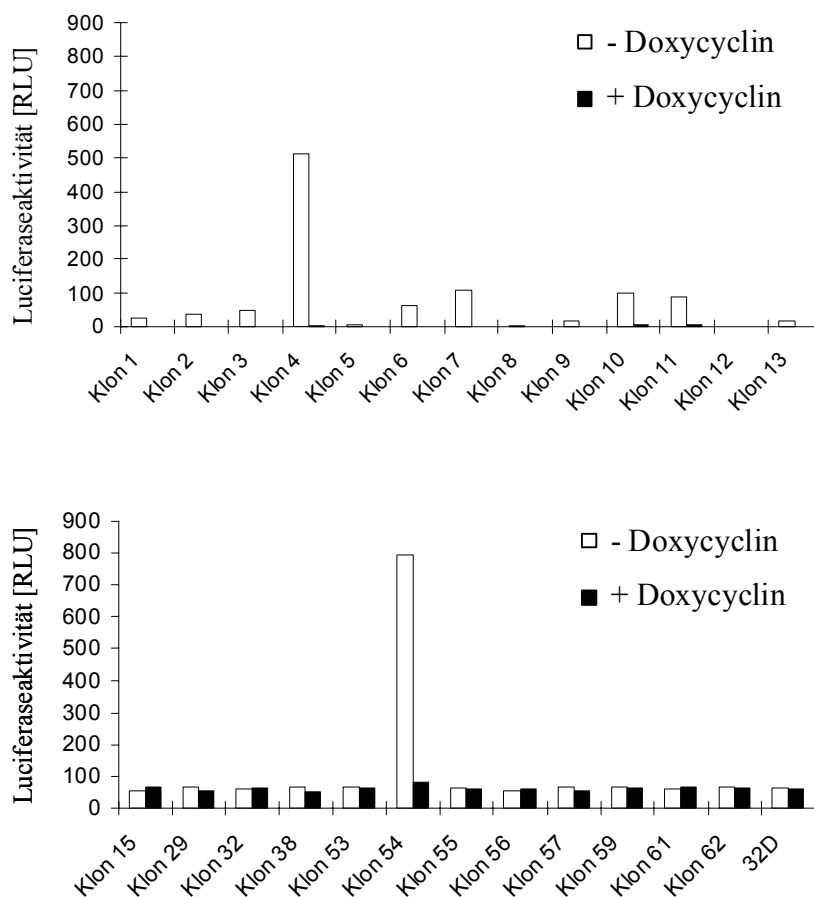
**Abbildung 6: Kontrolle der toxischen Wirkung von Doxycyclin auf 32D-Zellen.** 32D-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Doxycyclin inkubiert (1 – 10  $\mu\text{g/ml}$ ), um die Toxizität des Antibiotikums zu testen. Zum Vergleich wurden die Zellen ohne Doxycyclin inkubiert. A) Durch AnnexinV-Färbung und anschließende FACS-Analyse wurde zum Zeitpunkt 0 und nach 48 h die Anzahl apoptotischer Zellen bestimmt. B) Mittels Trypanblaufärbung wurde die Lebendzellzahl zum Zeitpunkt 0 und nach 48 h Stunden bestimmt.

### Etablierung einer 32D-Zelllinie, die das Regulatorprotein tTA exprimiert

Die Etablierung des Tet-Systems in 32D-Zellen erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurde eine Zelllinie konstruiert, die den Transkriptionsaktivator tTA stabil exprimierte. Dazu wurden 32D-Zellen mit rekombinantem Retrovirus infiziert, der für tTA codiert. Außerdem enthält

der Virus ein Gen für Neomycin-Resistenz, das die Selektion der infizierten Zellen ermöglicht. Der Virusüberstand wurde aus der Verpackungs-Zelllinie PA317inffTA hergestellt, die das tTA-Gen auf einem integrierten viralen Vektor stabil zusammen mit den Verpackungssequenzen enthält und die viralen Verpackungsproteine exprimiert. Die infizierten 32D-Zellen wurden in Weichagar kultiviert. Dieses Verfahren ermöglichte das Anziehen und die Isolation von Einzelzellklonen speziell von Suspensionskulturzellen. Insgesamt 62 32Dtet-Einzelzellklone wurden aus dem Weichagar isoliert und angezogen.

Zur Identifizierung von Zellklonen, die den Transkriptionsaktivator tTA exprimieren, wurde ein enzymatischer Test mit einem Luciferase-Reporter gen durchgeführt. Falls der tTA in einem 32Dtet-Klon exprimiert ist, sollte dieser die Expression eines Reporter gens, in diesem Fall die Luciferase, aktivieren. Mit Doxycyclin sollte jedoch die Luciferaseexpression abgeschaltet werden. Das Luciferase-Gen befand sich dazu im Reporterplasmid pUHC-13-3 unter der Kontrolle eines Doxycyclin-regulierbaren Promotors. Zum Testen der 32Dtet-Klone wurde jeder Klon transient mit dem Luciferase-Reporter gen pUHC-13-3 transfiziert. Nach der Elektroporation wurden die Zellen jeweils mit oder ohne Doxycyclin inkubiert. Die Luciferaseaktivität wurde in einem enzymatischen Test, wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, bestimmt. Die im Test erzeugte Lichtmenge wurde in relativen Lichteinheiten (RLU) gemessen und korrelierte direkt mit der Aktivität der Luciferase. Die Aktivität der Luciferase korrelierte wiederum direkt mit der Expressionsstärke der Luciferase. Eine hohe Induktion der Luciferaseaktivität ohne Doxycyclin-Inkubation zeigte die erfolgreiche Expression des Transkriptionsaktivators tTA an und erlaubte so die Identifizierung der richtigen 32Dtet Klone. Die Ergebnisse der Luciferase-Tests sind in Abbildung 7 dargestellt. Die einzelnen Klone wurden mit Nummern bezeichnet. Das Ergebnis des Reporterassays zeigt, dass in zahlreichen Klonen keine oder nur eine minimale Luciferaseaktivität gemessen wurde, die dem Hintergrund in normalen 32D-Zellen entspricht. Einige Klone zeigten eine sehr schwache Induktion der Luciferaseaktivität. Es wurden jedoch zwei Klone gefunden, die eine starke Induktion der Luciferaseaktivität ohne Doxycyclin aufweisen: Die Klone 4 und 54. Diese Klone wurden für die weitere Arbeit ausgewählt und als 32Dtet1 und 32Dtet2 bezeichnet. Durch einen Proliferationsassay wurde sichergestellt, dass die Klone ähnlich schnell proliferieren wie die Ausgangszellen (32D) und Wachstumsfaktor-abhängig sind.

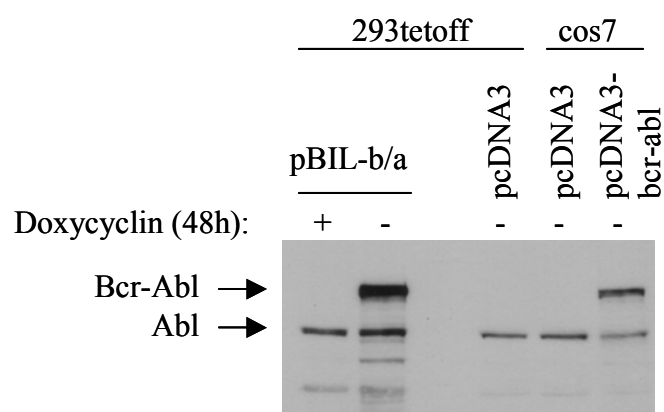


**Abbildung 7: Etablierung einer 32D-Zelllinie, die das Regulatorprotein tTA exprimiert.** Um 32Dtet-Klone zu identifizieren, die den Transkriptionsaktivator tTA des Tet-Systems exprimieren, wurden alle Klone mit einem Doxycyclin-induzierbaren Luciferase-Reporterplasmid (pUHC-13-3) elektroporiert und anschließend entweder ohne (weiße Balken) oder mit (schwarze Balken) Doxycyclin (2  $\mu\text{g/ml}$ ) inkubiert. 24 h nach der Elektroporation wurde aus den elektroporierten Zellen der Proteinrohextrakt geerntet und die Luciferaseaktivität der Proteinrohlysate wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben gemessen. Die Lichtmenge wurde in Relativen Lichteinheiten (RLU) gemessen und diente als Maß für die Expression der Luciferase. Die Normierung der RLU auf die Transfektionseffizienz erfolgte wie im Methodenteil beschrieben.

### Herstellen einer 32Dtet-Zelllinie mit Doxycyclin-regulierbarer Bcr-Abl-Expression

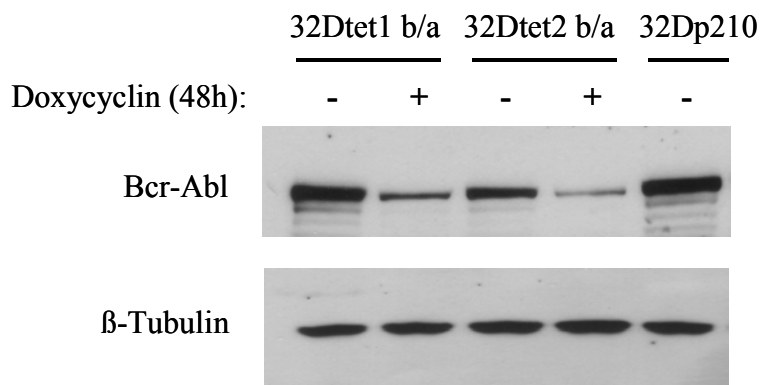
Um Bcr-Abl durch tTA regulieren zu können, wurden im zweiten Schritt die Klone 32Dtet1 und 32Dtet2 mit einem regulierbaren Bcr-Abl Plasmid infiziert. Dieses Plasmid wurde konstruiert, indem das *bcr-abl* vor den regulierbaren Promoter TRE im Plasmid pBIL kloniert wurde und so das Plasmid pBIL-b/a konstruiert wurde. Die Funktionalität des Plasmids pBIL-b/a wurde in der Zelllinie 293tetoff getestet. Diese Zelllinie exprimiert stabil den Transkriptionsaktivator tTA und wird deshalb zur funktionellen Kontrolle der Doxycyclin-Regulierbarkeit verwendet. In einem korrekten Plasmid sollte Bcr-Abl ohne Doxycyclin

exprimiert werden, mit Doxycyclin sollte die Bcr-Abl-Expression abgeschaltet sein. Die Regulation der Expression von Bcr-Abl durch Doxycyclin-Zugabe wurde nach Transfektion der Zelllinie 293tetoff mit pBIL-b/a mittels Westernblot analysiert (Abbildung 8). Das Ergebnis zeigt, dass ohne Doxycyclin Bcr-Abl exprimiert wird, während mit Doxycyclin die Expression von Bcr-Abl in der Zelllinie 293tetoff reduziert wird. Somit konnte die Westernblotanalyse die Regulierbarkeit der Bcr-Abl-Expression im Plasmid pBIL-b/a bestätigen.



**Abbildung 8: Funktionale Kontrolle der Doxycyclin-abhängigen Bcr-Abl-Expression im Plasmid pBIL-b/a.** Die Zelllinie 293tetoff wurde mit pBIL-b/a transfiziert (Spur 1 und 2) und für 48 h mit (+) und ohne (-) Doxycyclin (2 µg/ml) inkubiert. Zur Negativ-Kontrolle wurde der Leervektor pcDNA3 transfiziert (Spur 3). Zur Expressionskontrolle von Bcr-Abl wurden Cos7-Zellen mit Leervektor (Spur 4) oder pcDNA3-bcr-abl transfiziert (Spur 5). Die Bcr-Abl Expression wurde mittels Westernblot durch einen Antikörper gegen c-Abl überprüft. Es wurden gleiche Proteinmengen aufgetragen. Die Laufhöhe von Bcr-Abl und endogenem Abl ist jeweils mit Pfeilen angegeben.

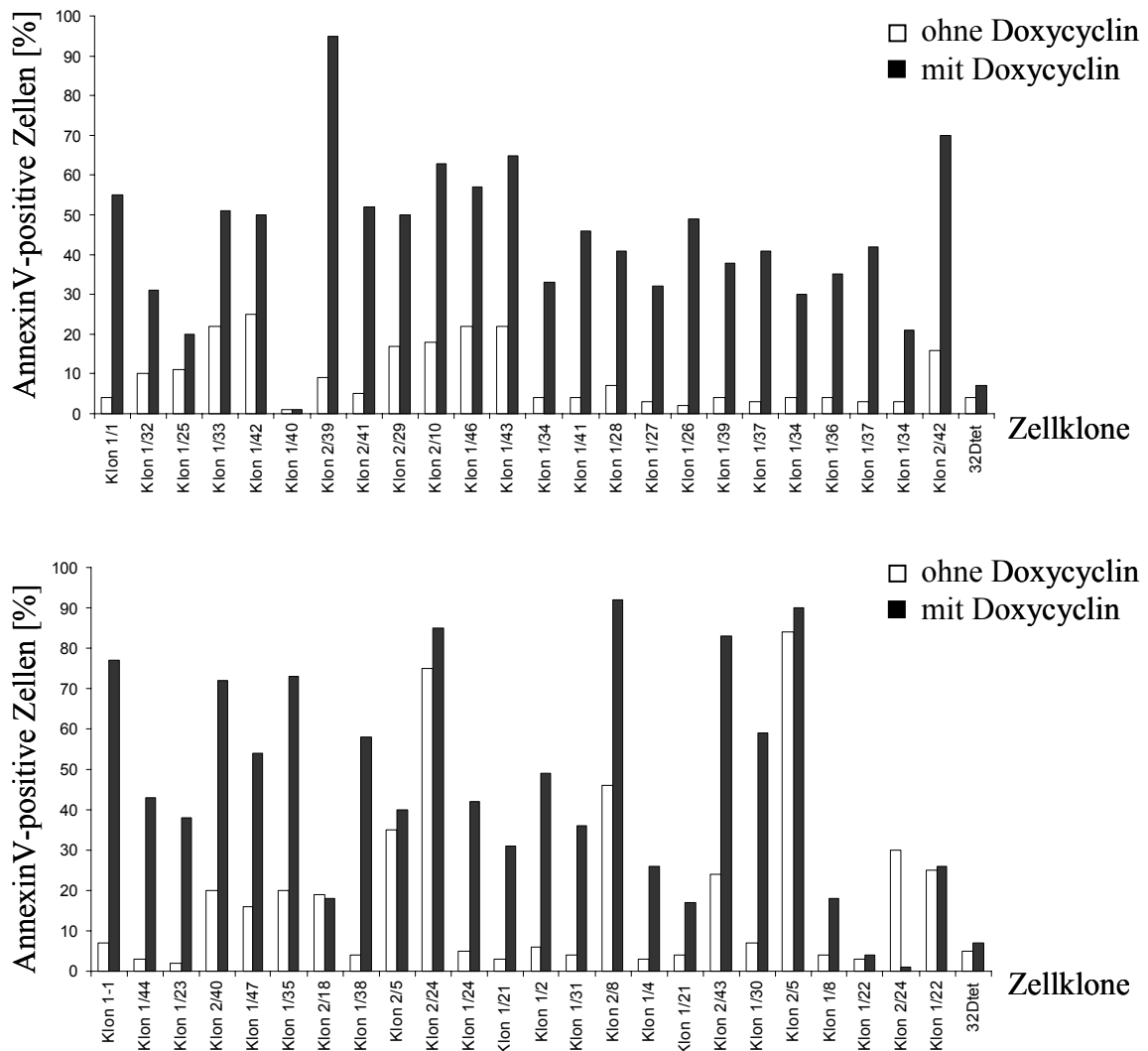
Um 32Dtet Klone herzustellen, die Bcr-Abl Doxycyclin-reguliert exprimieren, wurden die Zelllinien 32tet1 und 32Dtet2 mit pBIL-b/a mittels Elektroporation transfiziert und zur Selektion ein Puromycin-Resistenzgen (pApuro) verwendet. Die Zellen wurden stets in IMDM-Medium mit 10 % FCS und 10 % Wehi-3B-Überstand angezogen. In den resultierenden Mischklonen 32Dtet1 b/a und 32Dtet2 b/a wurde die Expression und Regulierbarkeit von Bcr-Abl durch Doxycyclin mittels Westernblot überprüft (Abbildung 9). Im Westernblot konnte gezeigt werden, dass Bcr-Abl in den Mischklonen exprimiert wurde und durch Doxycyclin-Zugabe die Expression reduziert wurde.



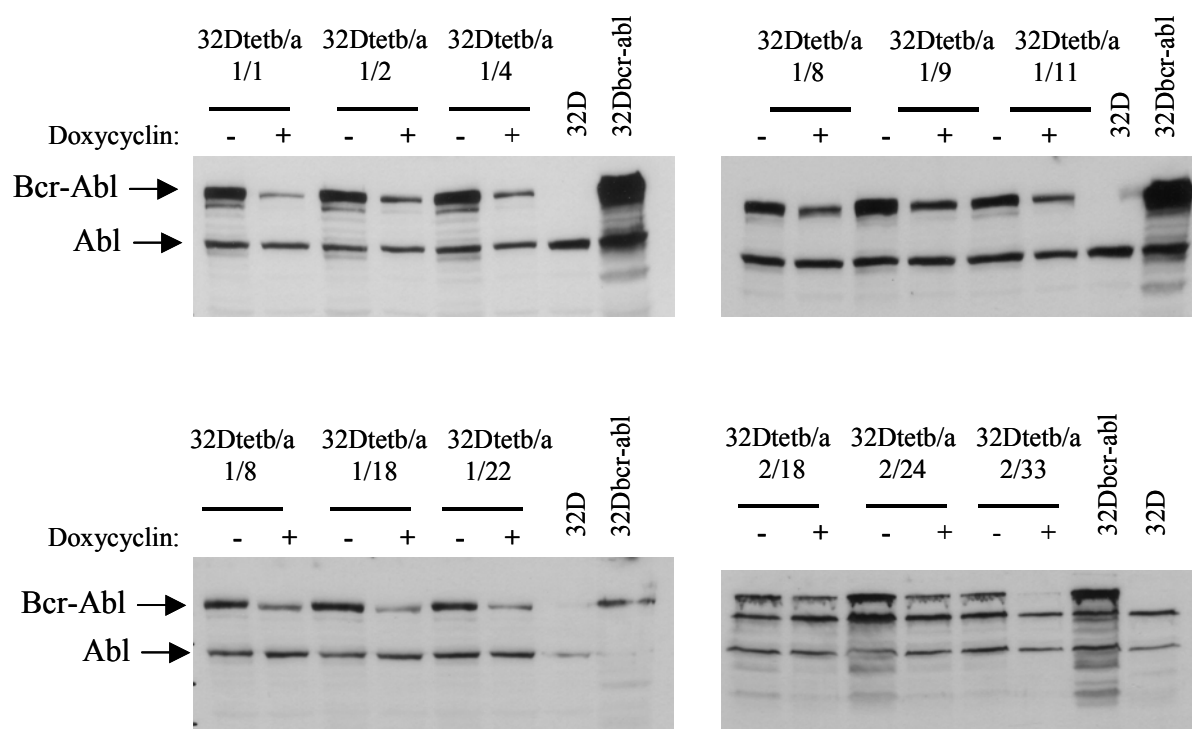
**Abbildung 9: Kontrolle der Expression und Doxycyclin-Regulierbarkeit von Bcr-Abl in den polyklonalen Zellkulturen 32Dtet1 b/a und 32Dtet2 b/a.** Zur Konstruktion von 32D-Zelllinien, in denen die Bcr-Abl-Expression durch Doxycyclin reguliert werden kann, wurden die Zelllinien 32Dtet1 und 32Dtet2 (exprimieren den Transkriptionsaktivator tTA) mit 19  $\mu$ g pBIL-b/a und 1  $\mu$ g pApuro elektroporiert. Die Zellen wurden für 7 Tage mit 0,5  $\mu$ g/ml Puromycin selektiert. Die daraus resultierenden polyklonalen Zelllinien 32Dtet1 b/a und 32Dtet2 b/a wurden ohne (-) und mit (+) 2  $\mu$ g/ml Doxycyclin für 72 h angezogen. Anschließend wurde Proteinrohextrakt aus den Zellen präpariert und die Bcr-Abl Expression wurde mittels Westernblot durch c-Abl-Antikörper analysiert (Spur 1 – 4). Zur Positivkontrolle der Bcr-Abl-Expression wurde Lysat aus 32Dbcr-abl-Zellen aufgetragen (Spur 5). Zur Ladekontrolle gleicher Proteinmengen wurde  $\beta$ -Tubulin mittels Antikörpern detektiert.

Um Einzelzellklone zu generieren, wurden die Zellen in 96-Well Platten vereinzelt und angezogen. Das Ziel war, 32Dtetb/a-Klone zu identifizieren, in denen Bcr-Abl exprimiert wird, aber im nicht-induzierten Zustand (mit Doxycyclin) nur geringe Hintergrundexpression von Bcr-Abl vorhanden ist. Die Bcr-Abl-Expression wurde zunächst durch einen Apoptose-Assay mittels AnnexinV-Färbung funktionell getestet. Dieser Assay beruhte auf der Wachstumsfaktor-Abhängigkeit der Klone im induzierten Zustand: Ohne Doxycyclin sollten die richtigen Klone in Wachstumsfaktor-freiem Medium durch die Bcr-Abl-Expression überleben, da Bcr-Abl IL-3-unabhängige Proliferation vermittelt. Bei Abschalten der Bcr-Abl-Expression durch Doxycyclin sollten Wachstumsfaktor-abhängige Zellen im Medium ohne IL-3 sterben. In Abbildung 10 ist die Anzahl apoptotischer Zellen mit und ohne Doxycyclin der einzelnen 32Dtetb/a-Klone dargestellt. Die Klone zeigen sehr unterschiedliche Induktion der Apoptose mit Doxycyclin. Es wurden die Klone identifiziert, die ohne Doxycyclin möglichst geringe Apoptose und mit Doxycyclin eine möglichst hohe Anzahl apoptotischer Zellen zeigen. Zusätzlich zum funktionellen Assay wurde in einem Teil der Klone die Bcr-Abl-Expression und Regulierbarkeit mittels Immunoblot getestet, wie für die Mischklone beschrieben (Abbildung 11). Die Immunoblots zeigen, dass Bcr-Abl in den Einzelzellklonen exprimiert wird und durch Doxycyclin in den meisten Klonen die Expression von Bcr-Abl reduziert wird. Auf diese Weise wurden Wachstumsfaktor-abhängige

32Dtetb/a Einzelzellklone isoliert, mit möglichst hoher Bcr-Abl Expression und möglichst geringer Basalexpression. Basierend auf den Westernblots und den funktionalen Assays wurden die Klone 32Dtet b/a 1/1, 32Dtet b/a 2/11 und 32Dtet b/a 2/39 für weitere Studien ausgewählt.



**Abbildung 10: Kontrolle der Expression und Doxycyclin-Regulierbarkeit von Bcr-Abl in Einzelzellklonen von 32Dtet1 b/a und 32Dtet2 b/a durch AnnexinV-Assay.** Die polyklonalen Zellkulturen 32Dtet1 b/a und 32Dtet2 b/a wurden vereinzelt und mit Nummern benannt. Um die Doxycyclin-Regulierbarkeit von Bcr-Abl in 32Dtetb/a-Klonen funktionell zu testen, wurden die Zellen für 24 h ohne (weiße Balken) und mit (schwarze Balken) Doxycyclin (2  $\mu$ g/ml) in IL-3-freiem Medium inkubiert. Nach 24 h wurde der Anteil apoptotischer Zellen der Ansätze durch AnnexinV-Färbung und FACS-Analyse bestimmt. Da Bcr-Abl Wachstumsfaktor-unabhängiges Wachstum in den Zellen erzeugt, sollten die Zellen ohne Doxycyclin bei Bcr-Abl-Expression nicht apoptotisch sein. Mit Doxycyclin sollte in Doxycyclin-regulierbaren Klonen die Bcr-Abl-Expression abgeschaltet werden und ein Großteil der Zellen sollte apoptotisch werden. Gezeigt ist ein Teil der Ergebnisse aller durchgeführten Tests.



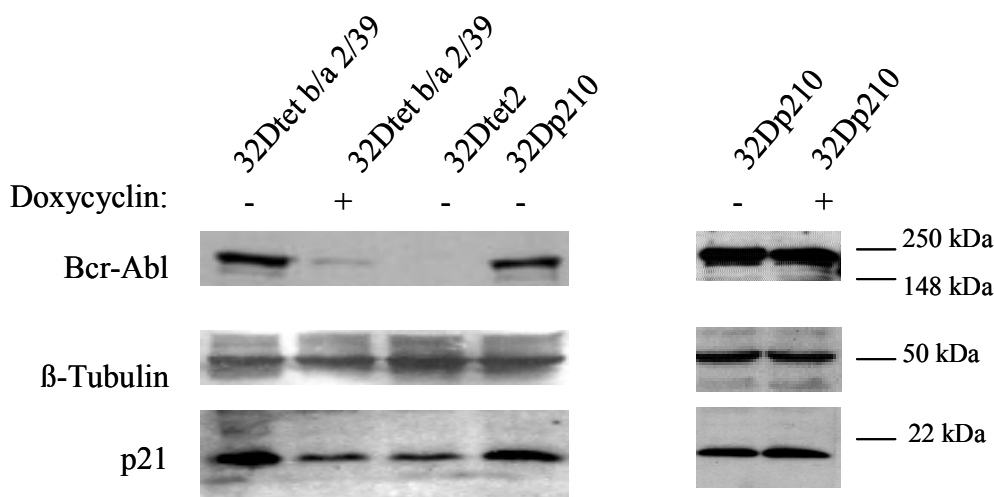
**Abbildung 11: Testen der Expression und Doxycyclin-Regulierbarkeit von Bcr-Abl in Einzelzellklonen von 32Dtet1 b/a und 32Dtet2 b/a durch Immunoblot.** Die polyklonalen Zellkulturen 32Dtet1 b/a und 32Dtet2 b/a wurden vereinzelt und mit Nummern benannt. In ungefähr 20 Einzelzellklonen wurde die Doxycyclin-regulierbare Expression von Bcr-Abl untersucht. Hierzu wurden die Zellklone jeweils für 48 h ohne (-) und mit (+) 2 µg/ml Doxycyclin inkubiert und anschließend Proteinlysate präpariert. Die Expression von Bcr-Abl wurde jeweils mittels Immunoblot durch c-Abl-Antikörper überprüft. Es wurden jeweils gleiche Proteinmengen geladen. Zur Negativkontrolle wurde Lysat aus 32D-Zellen geladen, zur Positivkontrolle der Bcr-Abl-Expression wurde Lysat aus 32Dbcr-abl-Zellen verwendet.

#### 4.1.3 Die Expression von p21 wird in Abhängigkeit von Bcr-Abl reversibel hochreguliert

Um zu überprüfen, ob die p21-Expression durch Bcr-Abl direkt reguliert wird, wurde die p21-Expression in den Zelllinien 32Dtet b/a 1/1, 32Dtet b/a 2/11 und 32Dtet b/a 2/39 in Korrelation zur Bcr-Abl-Expression untersucht. Dazu wurde die Bcr-Abl-Expression in den Zelllinien durch Doxycyclin reguliert. Außerdem wurden 32Dp210-Zellen, die Bcr-Abl stabil exprimieren mit und ohne Doxycyclin kultiviert, um einen unspezifischen Effekt von Doxycyclin auf die p21-Expression auszuschließen. Die Analyse der p21-Expression erfolgte mittels Westernblot, parallel dazu wurde die erfolgreiche Bcr-Abl-Regulation kontrolliert. In Abbildung 12 ist zu sehen, dass bei Abschalten der Bcr-Abl-Expression durch Doxycyclin in



Klon 32Dtet b/a 2/39 auch die p21-Expression auf das Niveau in untransformierten 32Dtet-Zellen (mit IL-3) herunterreguliert wird. Dies wurde auch in 2 weiteren Klonen bestätigt. Das Experiment zeigt, dass die Expression von p21 abhängig ist von der Expression von Bcr-Abl. In 32Dp210-Zellen wurde ein unspezifischer Effekt von Doxycyclin auf die p21-Expression ausgeschlossen. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass Bcr-Abl die Expression von p21 direkt aktiviert. Somit ist die Überexpression von p21 durch Bcr-Abl in 32Dp210-Zellen nicht auf Sekundärmutationen in Bcr-Abl-transformierten Zellen zurückzuführen.



**Abbildung 12: Die Expression von p21 wird durch die Expression von Bcr-Abl reversibel aktiviert.** 32Dtet b/a 2/39 Zellen wurden hergestellt, in denen die Expression von Bcr-Abl durch Doxycyclin abgeschaltet werden kann. Die 32Dtet b/a 2/39 Zellen wurden für 72 h ohne (-) und mit (+) 2 µg/ml Doxycyclin mit IL-3-haltigem Wehi-3B-Überstand (10%) angezogen (Spur 1 und 2). Zur Kontrolle wurden 32Dtet2 und 32Dp210-Zellen ebenfalls mit 10% Wehi-3B-Überstand angezogen (Spur 3 und 4). Außerdem wurden zur Kontrolle 32Dp210-Zellen mit (+) und ohne (-) Doxycyclin angezogen (Spur 5 und 6). Aus allen Ansätzen wurden Proteinlysate präpariert und mittels Westernblot wurde durch c-Abl-Antikörper die Bcr-Abl-Expression überprüft. Mit Antikörpern gegen p21 wurde die p21-Expression in Abhängigkeit der Bcr-Abl-Expression analysiert. Zur Ladekontrolle wurde ein β-Tubulin-Westernblot durchgeführt.

#### 4.1.4 Die Expression von p21 wird durch die Kinaseaktivität von Bcr-Abl reguliert

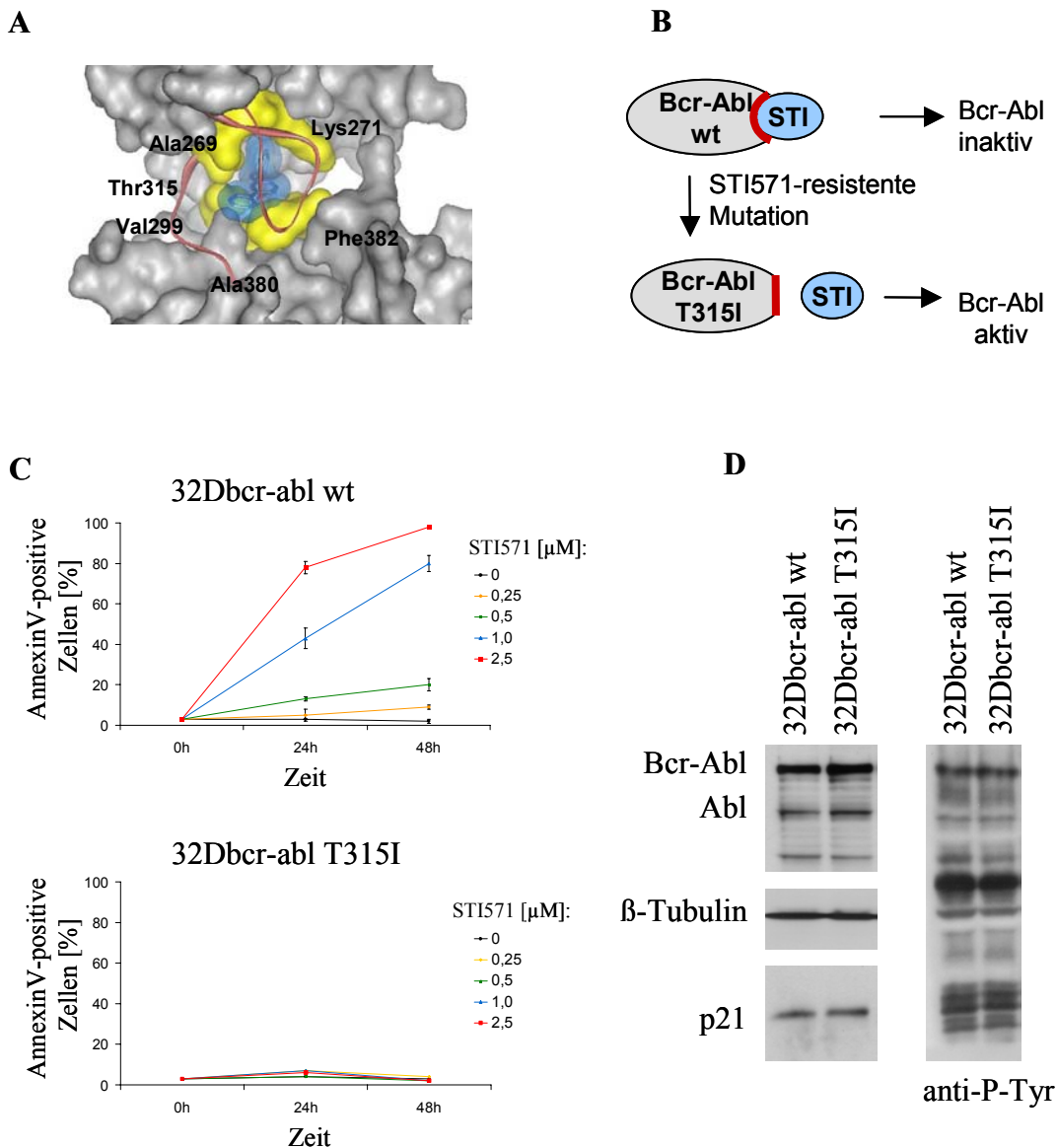
In einem weiteren System wurde untersucht, ob die Aktivierung der p21-Expression abhängig von der Kinaseaktivität von Bcr-Abl ist. Dazu wurde die Bcr-Abl-Aktivität durch den Abl-Kinase-Inhibitor STI571 (Imatinib, Gleevec®) blockiert und parallel dazu die Expression von p21 untersucht. Um die Spezifität der Inhibition zu überprüfen wurde parallel zu „Wildtyp“-Bcr-Abl (Bcr-Abl wt) eine Mutante von Bcr-Abl verwendet, die resistent gegen die Inhibition durch STI571 ist: Bcr-Abl T315I (Warmuth et al., 2003). Diese Mutante besitzt einen Aminosäureaustausch in der ATP-Bindetasche an Position 315 von Threonin zu Isoleucin.

Dadurch kann STI571 nicht mehr in die „Inhibitor-Tasche“ von Bcr-Abl binden, die benachbart zur ATP-Bindestelle liegt, und somit die Kinase-Aktivität von Bcr-Abl nicht inhibieren. ATP kann jedoch binden und die Mutante Bcr-Abl T315I besitzt immer noch eine normale Kinase-Aktivität (schematische Darstellung in Abbildung 13 A und B).

### **Konstruktion der Zelllinien 32Dbcr-abl wt und 32Dbcr-abl T315I**

Zunächst wurden 32D Zelllinien hergestellt, die entweder Bcr-Abl wt oder Bcr-Abl T315I stabil exprimieren. Hierzu wurden 32D-Zellen mit gleichen Titern von Bcr-Abl wt- oder Bcr-Abl T315I-Viren infiziert. Die rekombinanten Viren wurden hierzu mit den retroviralen Plasmiden pMSCV-bcr-abl-IRES-EGFP und pMSCV-bcr-ablT315I-IRES-EGFP produziert. Zwei Tage nach der Infektion wurden die Zellen durch Entzug des Wachstumsfaktors auf IL-3-unabhängiges Wachstum selektiert, das durch das zu selektierende Gen Bcr-Abl vermittelt wurde. Auf diese Weise wurden die Zelllinien 32Dbcr-abl wt und 32Dbcr-abl T315I konstruiert. Zur Negativkontrolle wurden 32D-Zellen mit Leervektor ohne Bcr-Abl (pMSCV-IRES-EGFP) infiziert. Sie starben bei der Selektion ohne IL-3 vollständig ab. Die erfolgreiche Infektion und Selektion wurde durch die Analyse der GFP-positiven Zellen in den Linien 32Dbcr-abl wt und 32Dbcr-abl T315I durch FACS-Analyse überprüft, da die GFP-Expression mit der Expression von Bcr-Abl gekoppelt war. Die Anzahl GFP-positiver Zellen betrug nach abgeschlossener Selektion 95 %.

Um die Expression von Bcr-Abl wt und der Mutante Bcr-Abl T315I funktionell in den Zelllinien 32Dbcr-abl wt und 32Dbcr-abl T315I zu kontrollieren, wurde die Wirkung von STI571 auf das Überleben beider Zelllinien überprüft. In Abbildung 13 C ist zu sehen, dass 32Dbcr-abl wt Zellen sensibel gegen STI571 sind und mit steigender Konzentration an STI571 sterben. Im Gegensatz dazu sind die 32Dbcr-abl T315I- Zellen resistent gegen STI571 und überleben trotz steigender STI571-Konzentrationen. Zusätzlich zur funktionellen Analyse der Zelllinien wurde in den 32Dbcr-abl wt und 32Dbcr-abl T315I Zellen die Expression von Bcr-Abl und p21 mittels Westernblot analysiert (Abbildung 13 D). Der Westernblot zeigt, dass beide Zelllinien gleiche Mengen an Bcr-Abl und p21 exprimieren. Um zu überprüfen, ob Bcr-Abl in beiden Zelllinien die gleiche Kinase-Aktivität zeigt, wurde in den Proteinlysaten beider Zelllinien die Phosphotyrosin-Phosphorylierung durch einen Anti-Phosphotyrosin-Antikörper im Westernblot untersucht. In Abbildung 13 D ist zu sehen, dass 32Dbcr-abl wt und 32Dbcr-abl T315I Zellen eine gleich starke Phosphotyrosin-Phosphorylierung im Gesamtzellysat aufweisen.

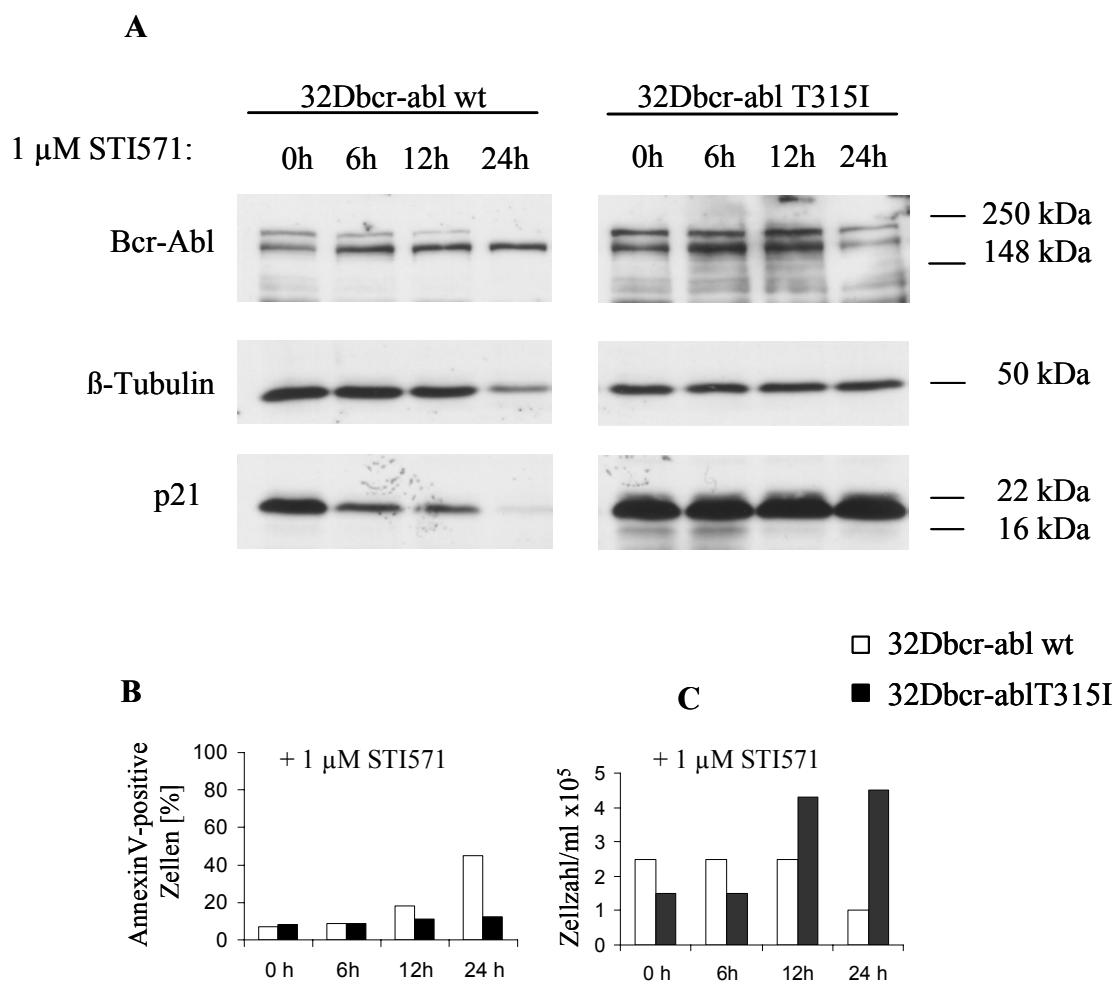


**Abbildung 13: Funktionelle Kontrolle der Generierung der Zelllinie 32Dbcr-abl wt und der STI571-resistenten Zelllinie 32Dbcr-abl T315I.** **A)** Dargestellt ist der Bindungsmodus des STI571-Derivats an die Abl-Kinase. Ein STI571-Derivat (blau) bindet in eine definierte Tasche (Aminosäuren gelb dargestellt) der Abl-Kinase (Schindler et al., 2000). **B)** Der Austausch der Aminosäure Threonin 315 gegen Isoleucin in der Bindetasche von Bcr-Abl führt zu einer Blockade der STI571-Bindung. Dadurch wird die Bcr-Abl T315I Mutante generiert, die nicht mehr durch STI571 inhibiert werden kann (Warmuth et al., 2003). Durch ihre Expression in 32D-Zellen wurden STI571-resistente 32D-Zellen hergestellt. **C)** Um die Expression von Bcr-Abl wt und Bcr-Abl T315I in den Zelllinien 32Dbcr-abl wt und 32Dbcr-abl T315I funktionell zu bestätigen, wurde die toxische Wirkung und Kinetik von STI571 in beiden Zelllinien getestet. Beide Zelllinien wurden mit verschiedenen Konzentrationen an STI571 (0 - 2,5 μM) für 72 h inkubiert. Die Anzahl apoptotischer Zellen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten durch AnnexinV-Messungen bestimmt. **D)** Außerdem wurde in den Zelllinien 32Dbcr-abl wt und 32Dbcr-abl T315I die Expression von Bcr-Abl und p21 mittels Westernblots überprüft. Die Tyrosinphosphorylierung wurde in beiden Zelllinien durch einen anti-Phosphotyrosin-Antikörper (PY-99, Santa Cruz) getestet.

### **Die Expression von p21 in Abhängigkeit der Kinaseaktivität von Bcr-Abl**

Um zu untersuchen, ob die Expression von p21 durch die katalytische Aktivität der Bcr-Abl-Kinase aktiviert wird, wurde in den Zelllinien 32Dbcr-abl wt die Bcr-Abl-Kinase durch STI571 blockiert. Mittels Westernblot wurde die Auswirkung der Bcr-Abl-Blockade und somit die Auswirkung von STI571 auf das Expressionsniveau von p21 überprüft. Außerdem wurde in den Ansätzen die Wirkung von STI571 auf das Überleben der Zellen durch AnnexinV-Messung und Bestimmung der Lebendzellzahl kontrolliert. In Abbildung 14 A (linker Westernblot) ist zu sehen, dass die p21-Expression schon nach 6h STI571-Inkubation reduziert wird. Auch nach 12 h ist die Abnahme der p21-Expression zu sehen. Nach 24 h ist die p21-Expression stark reduziert, allerdings wurde in den 32Dbcr-abl wt Zellen nach 24 h durch 1  $\mu$ M STI571 auch Apoptose induziert (40% apoptotische Zellen, Abbildung B) und die Lebendzellzahl war gegenüber dem Zeitpunkt 0 reduziert (Abbildung 14 C). Deshalb kann dieser Zeitpunkt nicht mehr für die korrekte Analyse der p21-Expression gewertet werden. Auch die  $\beta$ -Tubulin-Konzentration ist zu diesem Zeitpunkt in den Zellen auf Grund der einsetzenden Apoptose vermindert. Dennoch zeigt auch der 24 h-Wert, dass die p21-Expression bei Blockade der Bcr-Abl-Kinaseaktivität durch STI571 herunterreguliert wird. Um einen unspezifischen inhibitorischen Effekt von STI571 in Bcr-Abl-transformierten 32D-Zellen auszuschließen, wurde zur Kontrolle auch in der Zelllinie 32Dbcr-abl T315I die Auswirkung von STI571 auf das p21-Expressionsniveau kontrolliert. In dieser Zelllinie kann Bcr-Abl T315I auf Grund der Mutation nicht blockiert werden. In Abbildung 14 A (rechter Westernblot) ist zu sehen, dass p21 in dieser Zelllinie nicht durch STI571 herunterreguliert wird. Unspezifische Effekte von STI571 auf die p21-Expression können deshalb durch dieses Kontrollexperiment ausgeschlossen werden. Somit zeigen die Ergebnisse dieses Versuchs, dass p21 durch die katalytische Aktivität der Bcr-Abl-Kinase aktiviert wird, denn eine Blockade der Bcr-Abl-Aktivität durch STI571 führt zur Reduktion der p21-Expression.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse aus Kapitel 4.1, dass Bcr-Abl die Expression von p21 in 32D-Zellen induziert. Dies führt zur Überexpression von p21 im Vergleich zu normalen 32D-Zellen. Die Expression von p21 wird durch die Kinaseaktivität von Bcr-Abl reguliert.



**Abbildung 14: Die Expression von p21 wird durch die Kinaseaktivität von Bcr-Abl induziert.**

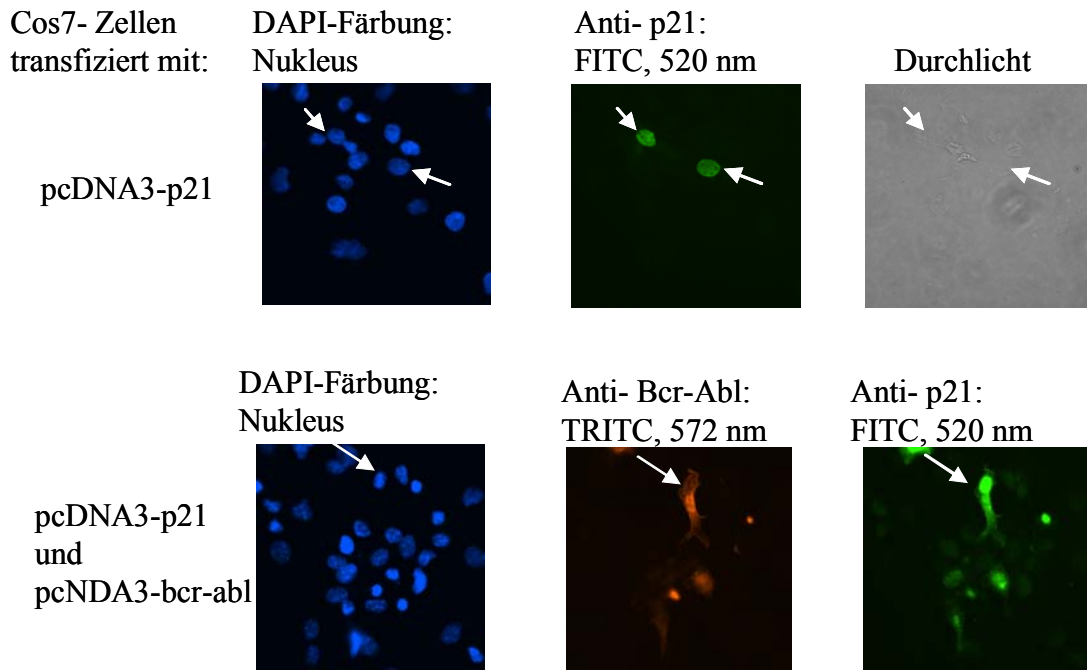
**A)** Die Zelllinien 32Dbcr-abl wt und 32Dbcr-abl T315I wurden mit 1  $\mu$ M STI571 inkubiert. Aus den Ansätzen wurden zum Zeitpunkt 0 und nach 6, 12 und 24 h Proteinlysate präpariert. Mittels Westernblot wurde die Expression von p21 in den Proteinlysaten zu den jeweiligen Zeitpunkten analysiert. Die Bcr-Abl-Expression wurde ebenfalls mittels Westernblot durch einen c-Abl-Antikörper überprüft. Zur Ladekontrolle wurde ein  $\beta$ -Tubulin-Westernblot durchgeführt. **B)** Die Anzahl apoptotischer Zellen wurde in den 32bcr-abl wt Zellen (weiße Balken) und 32Dbcr-abl T315I Zellen (schwarze Balken) zum Zeitpunkt 0 und nach 6, 12 und 24 h nach STI571-Inkubation durch AnnexinV-Färbung bestimmt. **C)** Parallel zur Apoptose wurde die Lebendzellzahl von 32bcr-abl wt Zellen (weiße Balken) und 32Dbcr-abl T315I Zellen (schwarze Balken) nach Trypanblaufärbung zu den Zeitpunkten 0, 6, 12 und 24 h bestimmt.

## 4.2 Der Einfluss von Bcr-Abl auf die zelluläre Lokalisation von p21

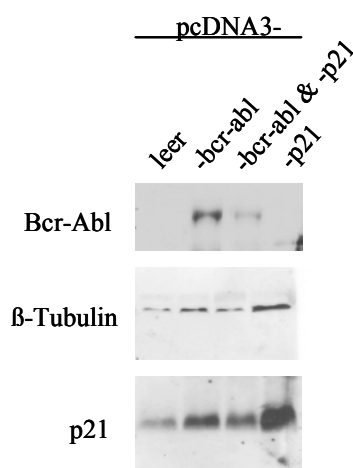
p21 kann sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma von Zellen lokalisiert sein. Die nukleäre Lokalisation von p21 spricht für eine Zellzyklus-inhibitorische Funktion von p21, die zytoplasmatische Lokalisation wird mit der anti-apoptotischen Funktion von p21 korreliert. Um Hinweise auf die Funktion von p21 zu erhalten, wurde die Lokalisation von p21 in zwei unterschiedlichen Systemen untersucht. In Cos7-Zellen, die auf Grund ihres adhärenen Wachstums für die Untersuchung der zellulären Lokalisation eines Proteins sehr gut geeignet sind, und in 32D-Zellen, die ein relevantes hämatopoetisches Zellsystem für die Untersuchung der Funktion von Bcr-Abl sind.

### 4.2.1 Die Bcr-Abl-abhängige Lokalisation von p21 in Cos7-Zellen

Die zelluläre Lokalisation von p21 in Abhängigkeit von Bcr-Abl wurde zunächst in Cos7-Zellen untersucht, da adhärente Zellen besonders für Immunfluoreszenz-Experimente zur Bestimmung der zellulären Lokalisation von Proteinen geeignet sind. Dazu wurden Cos7-Zellen mit pcDNA3-p21 und pcDNA3-bcr-abl cotransfiziert und anschließend im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Zur Kontrolle erfolgte jeweils eine Einzeltransfektion der Plasmide. In einem Teil der Zellen wurde mittels Westernblot die erfolgreiche Transfektion und Expression von p21 und Bcr-Abl überprüft (Abbildung 16). Der Westernblot zeigt, dass p21 und Bcr-Abl in den Cos7-Zellen exprimiert werden. Parallel dazu wurde mittels *in-situ*-Immunfluoreszenz die Lokalisation von p21 und Bcr-Abl in den Cos7-Zellen analysiert (Abbildung 15). Der Hintergrund des endogenen p21 war so gering, dass er bei der eingestellten Belichtungszeit nicht zu detektieren war. Dies ist in Abbildung 15 (obere Reihe) zu sehen: Mit der DAPI-Färbung sind weitaus mehr Zellkerne angefärbt, als durch die Immunfärbung von p21. Die Fluoreszenzbilder zeigen, dass p21 bei Einzeltransfektion in transfizierten Zellen nur im Kern von Cos7-Zellen lokalisiert ist. Dagegen ist p21 bei Coexpression mit Bcr-Abl sowohl im Kern als auch im Zytoplasma der Zellen zu detektieren (Abbildung 15, untere Reihe). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Expression von Bcr-Abl in Cos7-Zellen die Lokalisation von überexprimiertem p21 verändert: p21 wird durch die Expression von Bcr-Abl im Zytoplasma lokalisiert. Da jedoch Cos7-Zellen kein hämatopoetisches Zellsystem sind, sollte auch die Lokalisation von p21 in Bcr-Abl-transfizierten hämatopoetischen Zellen untersucht werden. Hierzu erfolgte eine Analyse der p21-Lokalisation in 32Dp210-Zellen, die bereits in Kapitel 4.1 verwendet wurden.



**Abbildung 15: Die Lokalisation von p21 in Cos7-Zellen in Abhängigkeit der Bcr-Abl-Expression.** Um den Einfluss von Bcr-Abl auf die zelluläre Lokalisation von p21 zu untersuchen, wurden Cos7-Zellen mit pcDNA3-bcr-abl und pcDNA3-p21 cotransfiziert (untere Reihe). Zur Kontrolle erfolgte eine Einzeltransfektion von Cos7-Zellen mit pcDNA3-p21 (obere Reihe). Durch *in-situ*-Immunfluoreszenz wurde die Lokalisation von p21 und Bcr-Abl im Fluoreszenzmikroskop überprüft. Zur Detektion des anti-p21-Antikörpers wurde ein FITC-markierter sekundärer Antikörper eingesetzt. Zur Detektion von Bcr-Abl wurde ein Antikörper gegen c-Abl verwendet, der Sekundärantikörper war mit TRITC markiert. Zur Markierung des Zellkerns wurden die Zellen zusätzlich zur Immunfluoreszenzfärbung mit dem Farbstoff DAPI angefärbt.



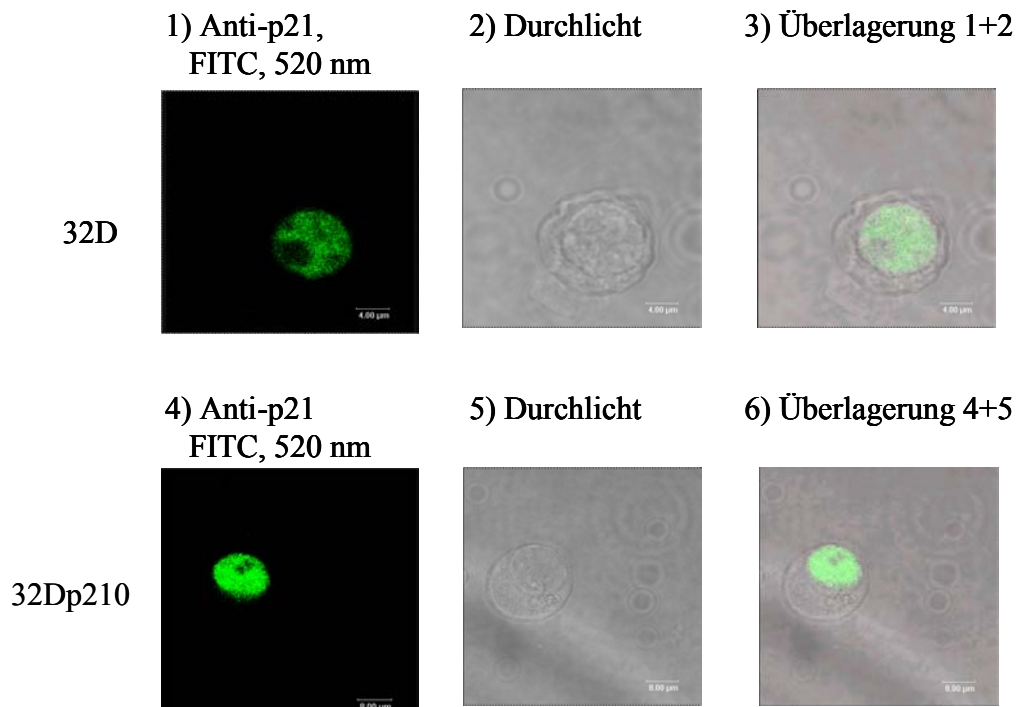
**Abbildung 16: Kontrolle der transienten Expression von p21 und Bcr-Abl in Cos7-Zellen.** Zur Lokalisation von p21 durch Immunfluoreszenz in Cos7-Zellen wurden Cos7-Zellen mit den Plasmiden pcDNA3-p21 und pcDNA3-bcr-abl entweder einzeln transfiziert (Spur 2 und 4) oder kotransfiziert (Spur 3). Zur Kontrolle wurde der Leervektor pcDNA3 transfiziert (Spur 1). Aus den transfizierten Zellen wurden Proteinlysate präpariert. Die erfolgreiche Transfektion und die Expression von Bcr-Abl und p21 wurden durch Westernblots überprüft. Antikörper gegen p21 oder c-Abl wurden verwendet. Zur Ladekontrolle wurde ein  $\beta$ -Tubulin-Westernblot durchgeführt.

#### 4.2.2 Die Bcr-Abl-abhängige Lokalisation von p21 in 32D-Zellen

In 32D-Zellen wurde untersucht, ob die Lokalisation von p21 durch Bcr-Abl verändert wird. Dazu wurde die Lokalisation von p21 in untransfizierten 32D-Zellen und Bcr-Abl-transformierten 32D-Zellen untersucht. Die stabil mit Bcr-Abl infizierten 32D-Zellen aus Kapitel 4.1.1, 32Dp210, wurden hierzu verwendet. Mit beiden Zelllinien wurde eine *in-situ*-Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt, die im Methodenteil für Suspensionskulturzellen beschrieben wird. Die stabile Expression von Bcr-Abl und die endogene Expression von p21 wurden bereits in Westernblots überprüft (Kap. 4.1.1, Abbildung 4). In den Fluoreszenzbildern in Abbildung 17 ist zu erkennen, dass p21 sowohl in 32D als auch in 32Dbcr-abl Zellen ausschließlich im Zellkern lokalisiert ist. Somit wurde die nukleäre Lokalisation von p21 durch die Bcr-Abl-Expression in 32D-Zellen nicht verändert. Da das hämatopoetische 32D-Zellsystem für die Untersuchung von Bcr-Abl relevanter ist als die Cos7-Zelllinie, kann davon ausgegangen werden, dass p21 in Bcr-Abl-positiven hämatopoetischen Zellen im Zellkern lokalisiert ist. Die zytoplasmatische Lokalisation von p21 kann in Cos7-Zellen von der Überexpression von p21 herrühren, welches eventuell zusätzlich durch Bcr-Abl hochreguliert wird. In 32D-Zellen wurde dagegen nur die endogene Expression von p21 untersucht.

In den 32D-Zellen ist auch gut zu erkennen, dass das Fluoreszenzsignal in 32Dbcr-abl-Zellen (Abbildung 17, untere Reihe) stärker ist als in 32D-Zellen (Abbildung 17, obere Reihe). Dies kann auf die Aktivierung der Expression von p21 durch Bcr-Abl zurückgeführt werden, die in Kapitel 4.1 ausführlich in 32D-Zellen gezeigt wurde. Wie aus der Einleitung hervorgeht, ist die zytoplasmatische Lokalisation von p21 in manchen zellulären Systemen mit einer anti-apoptotischen Funktion von p21 korreliert (Asada et al., 1999; Zhou et al., 2001). Dagegen deutet die Lokalisation von p21 im Zellkern darauf hin, dass p21 eine Zellzyklusregulatorische Funktion ausübt (LaBaer et al., 1997). Allein aus den p21-Lokalisationsstudien kann jedoch nicht auf die Funktion von p21 in Bcr-Abl-positiven Zellen geschlossen werden. Deshalb wurde im anschließenden Kapitel die biologische Funktion von p21 in der Proliferation und in der Apoptose in Bcr-Abl-transformierten Zellen funktionell untersucht.



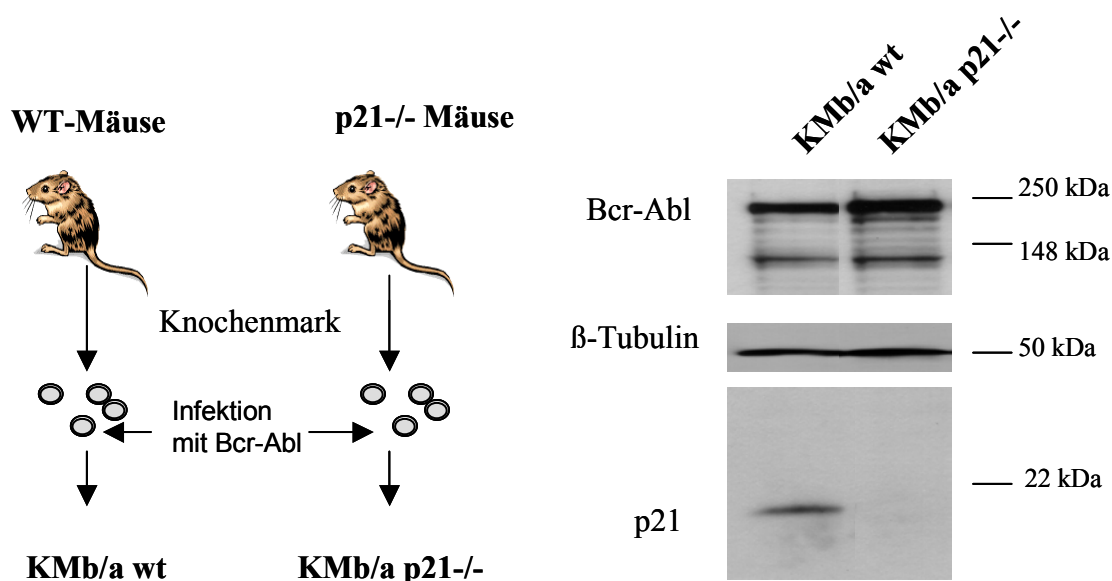


**Abbildung 17: Die Lokalisation von p21 in Bcr-Abl-positiven 32D-Zellen.** Die Lokalisation von p21 wurde in 32D-Zellen (1-3) und Bcr-Abl-transformierten 32D-Zellen, 32Dp210-Zellen, (4-6) durch *in-situ*-Immunfluoreszenz überprüft. Dazu wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen p21 und einem FITC-markierten Sekundärantikörper angefärbt. Die Analyse erfolgte im konfokalen Mikroskop. Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Bildausschnitt.

### 4.3 Die biologische Funktion von p21 in der Proliferation Bcr-Abl-positiver Zellen

In Kapitel 4.1 wurde gezeigt, dass p21 durch Bcr-Abl in einer hämatopoetischen Zelllinie hochreguliert wird. Zunächst erscheint es paradox, dass in einer transformierten Zelle ein potentieller Proliferationsinhibitor durch das Onkogen selbst hochreguliert wird. p21 kann jedoch abhängig vom zellulären Kontext und seinem Expressionsniveau die Proliferation nicht nur inhibieren, sondern auch aktivieren. Deshalb stellte sich die Frage, welche biologische Funktion p21 in der Bcr-Abl positiven Zellen erfüllt: Aktiviert oder reduziert p21 die Proliferation Bcr-Abl-transformierter Zellen? Und welchen Einfluss hat p21 auf die Apoptose Bcr-Abl-transformierter Zellen?

Um diese Frage zu klären, wurde die Funktion von p21 mit Hilfe von p21-„Knockout“-Zellen (p21<sup>-/-</sup> Zellen) im Vergleich zu normalen Zellen mit p21-Expression jeweils in Bcr-Abl-positiven Zellen untersucht. Als Model für hämatopoetische Zellen wurden Knochenmarkzellen aus der Maus gewählt. Das Knochenmark wurde aus p21-„Knockout“-Mäusen präpariert und parallel dazu aus den normalen Kontrollmäusen. Beide Knochenmarkpopulationen wurden mit Bcr-Abl infiziert (Abbildung 18). Dazu wurde rekombinanter Retrovirus hergestellt, der das Konstrukt pMSCV-bcr-abl-IRES-EGFP verpackte. Nach der Infektion beider Zellpopulation wurden die Zellen auf Wachstumsfaktor-unabhängige Proliferation selektiert, die durch die Expression von Bcr-Abl vermittelt wird. Zwei Wochen nach der Selektion erfolgte die Kontrolle der Bcr-Abl Expression sowohl durch Analyse der Anzahl GFP-positiven Zellen, da die Bcr-Abl Expression über eine interne Ribosomen-Bindestelle (IRES) mit der GFP Expression gekoppelt wurde, als auch durch einen Westernblot mit Proteinlysaten beider Zelllinien. Der „Knockout“ von p21 wurde ebenfalls durch Immunoblot kontrolliert (Abbildung 18). Die Westernblots zeigen, dass beide Zelllinien Bcr-Abl exprimierten. Die p21<sup>-/-</sup> Knochenmarkzellen zeigten keine p21-Expression. Die entstandenen primären Zelllinien werden als KMb/a p21<sup>-/-</sup> und KMb/a wt bezeichnet.



**Abbildung 18: Konstruktion und Kontrolle der Zelllinien KMB/a wt und KMB/a p21<sup>-/-</sup>:** Knochenmarkszellen aus „Wildtyp“ (wt) Mäusen und p21<sup>-/-</sup> „Knockout“ (p21<sup>-/-</sup>) Mäusen wurden mit Bcr-Abl infiziert, um die Zelllinien KMB/a wt und KMB/a p21<sup>-/-</sup> zu generieren. Die Expression von Bcr-Abl und der „Knockout“ von p21 wurden mittels Westernblot überprüft. Zur Ladekontrolle wurde die  $\beta$ -Tubulin-Expression überprüft.

Obwohl in den folgenden Experimenten die Knochenmarkszellen ohne Differenzierungsfaktor inkubiert wurden, sollte zur Kontrolle untersucht werden, ob das Fehlen von p21 die Differenzierung von Bcr-Abl-positiven Knochenmarkszellen verändert. Denn es sollte sichergestellt werden, dass für alle folgenden Experimente Zellen mit gleichem Differenzierungsgrad verglichen werden. Dazu wurde der Differenzierungsstatus der Knochenmarkszellen KMB/a p21<sup>-/-</sup> und KMB/a wt durch FACS-Analyse einer Auswahl an hämatopoetischen Oberflächenmarkern zwei und vier Wochen nach der Infektion überprüft. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Bcr-Abl-positiven Knochenmarkzelllinien aus WT und p21<sup>-/-</sup> Mäusen sowohl nach 2 als auch nach 4 Wochen nicht im Differenzierungszustand unterscheiden. Beide Zelllinien entwickeln sich wie erwartet in diesem Zellkulturmodell in die lymphatische Richtung. Das Fehlen von p21 beeinflusst im untersuchten Zeitraum nicht die Differenzierung der Bcr-Abl-transformierten Knochenmarkszellen.

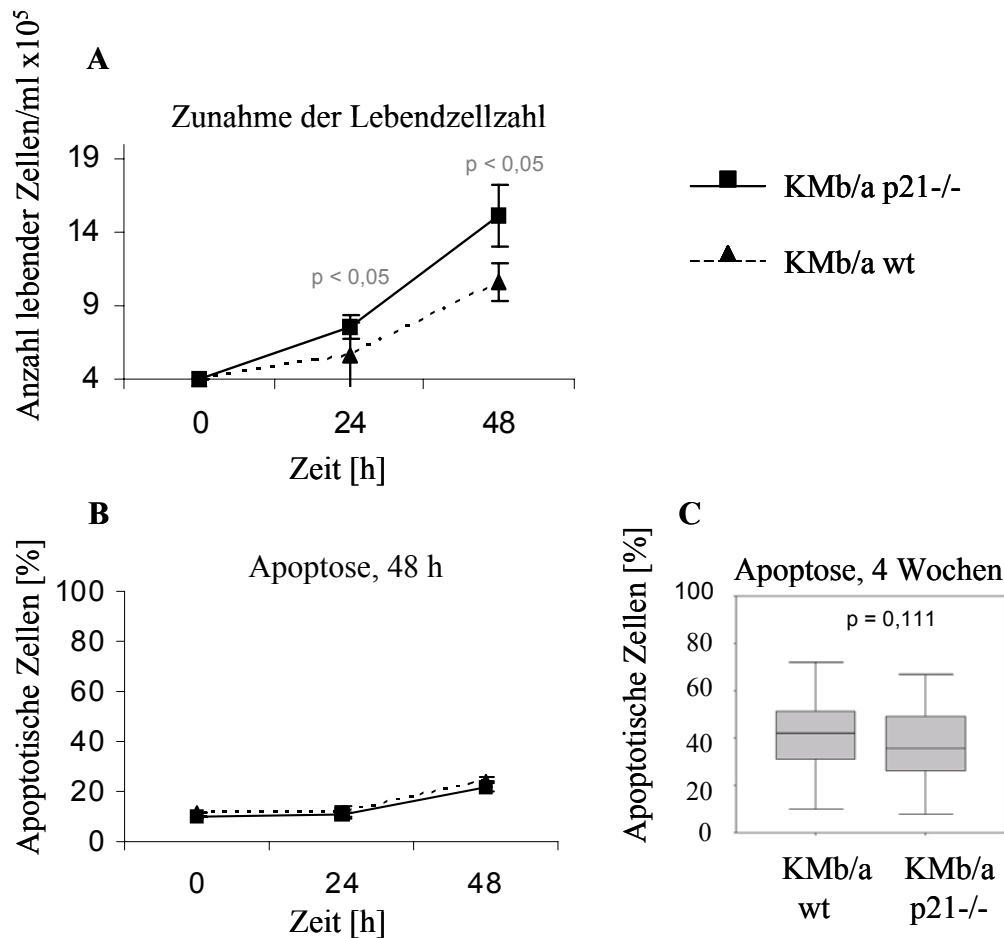
Oberflächenmarker hämatopoetischer Zellen		KMb/a wt	KMb/a p21-/-
<b>B/T-Zell-Marker:</b>	CD45R/B220	98 %	98 %
<b>B-Zell-Marker:</b>	CD19 (alle Stadien)	98 %	98 %
	CD25 (aktivierte)	4 %	4 %
<b>T-Zell-Marker:</b>	CD4	0 %	0 %
	CD8	0 %	0 %
<b>Myeloide Marker:</b>	Gr-1	0 %	0 %
	Mac1	4 %	4 %
<b>Stammzell-Marker:</b>	Sca-1	2 %	2 %

**Abbildung 19: Der Differenzierungsstatus von KMb/a p21-/- und KMb/a wt Zellen ist identisch.** Der Differenzierungsstatus der Zelllinien KMb/a p21-/- und KMb/a wt wurde 2 Wochen nach der Infektion untersucht. Dazu wurden die hämatopoetischen Oberflächenmarker der beiden Zelllinien durch Antikörper wie im Kapitel Methoden beschrieben charakterisiert. Durch FACS-Analyse wurde der prozentuale Anteil der Zellen bestimmt, die den jeweils untersuchten Oberflächenmarker exprimieren.

#### 4.3.1 In Bcr-Abl-transformierten Knochenmarkzellen verlangsamt p21 die Proliferation

Um den Einfluss von p21 auf die Proliferation in Bcr-Abl-positiven hämatopoetischen Zellen zu untersuchen, wurde die Zunahme der Lebendzellzahl der beiden primären Zelllinien KMb/a p21-/- und KMb/a wt im Zeitraum von 48 h verglichen (Abbildung 20 A). Die Experimente wurden 2 Wochen nach der Infektion der Zellen durchgeführt. Parallel zur Lebendzellzahl wurde untersucht, ob p21 die Apoptose beider Zelllinien beeinflusst (Abbildung B und C). Die Apoptose entspricht hier der endogenen Apoptose bei normaler Kultivierung der Zellen und ist nicht durch äußere Einflüsse oder toxische Substanzen induziert. Die Apoptose in beiden Zelllinien könnte die Zunahme der Lebendzellzahl beeinflussen. Deshalb wurde parallel zur Lebendzellzahl der Prozentsatz apoptotischer Zellen durch AnnexinV-Messung bestimmt. Die Ergebnisse in Abbildung 20 zeigen, dass das Fehlen von p21 das Wachstum der Bcr-Abl transformierter Knochenmarkzellen beschleunigt, da KMb/a p21-/- Zellen schneller wachsen als KMb/a wt Zellen (Abbildung 20 A). Die Apoptose wird durch den p21-„Knockout“ in den Bcr-Abl-positiven Zellen nicht beeinflusst, da beide Zelllinien über den Zeitraum von 48 h den gleichen Prozentsatz an apoptotischen Zellen aufweisen (Abbildung B). Auch über einen

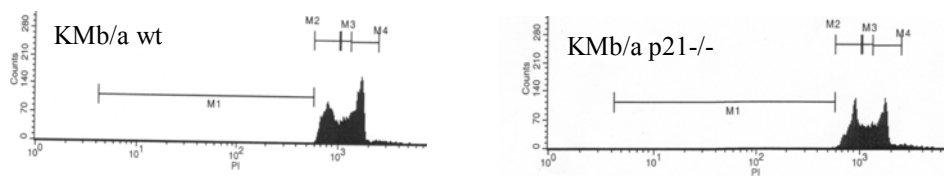
Zeitraum von vier Wochen ist die mittlere Verteilung der Anzahl apoptotischer Zellen nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung C). Somit zeigen die Untersuchungen zur Rolle von p21 in Bcr-Abl-positiven Knochenmarkzellen, dass p21 die Proliferation abschwächt und die Apoptose nicht beeinflusst. Dieses Ergebnis wird auch durch die Lokalisationsexperimente aus Kapitel 4.2 bestätigt: p21 ist in Bcr-Abl-positiven Zellen ausschließlich im Nukleus und nicht im Zytoplasma lokalisiert. Dies spricht dafür, dass p21 keine anti-apoptotische Rolle in 32D-Zellen spielt, sondern eine Zellzyklus-inhibitorische Funktion ausübt.



**Abbildung 20: p21 verlangsamt die Proliferation von Bcr-Abl positiven murinen Knochenmarkzellen.** **A)** Das Wachstum von KMb/a p21<sup>-/-</sup> Zellen (durchgezogene Linie) und KMb/a wt Zellen (gestrichelte Linie) wurde durch den Vergleich der Zunahme der Lebendzellzahl untersucht. Dazu wurden  $4 \times 10^5$  Zellen/ml in 6-Well Platten eingesät. Die Lebendzellzahl wurde nach 24 und 48 h durch Trypanblau-Ausschluss bestimmt. Die Zunahme der absoluten Zellzahl/ml beider Zelllinien wurde graphisch dargestellt. **B)** Parallel zur Lebendzellzahl wurde die Anzahl apoptotischer Zellen durch AnnexinV-Messung nach 24 und 48 h bestimmt. **C)** Der Einfluss von p21 auf die Apoptose wurde untersucht. Hierzu wurde die Apoptose von KMb/a wt Zellen und KMb/a p21<sup>-/-</sup> Zellen über einen Zeitraum von 4 Wochen im Abstand von jeweils 2 Tagen durch AnnexinV-Messung bestimmt. Für beide Zelllinien ist jeweils der Median und die mittlere Abweichung aller Messungen dargestellt.

Um die Rolle von p21 in der Proliferation zu klären wurde auch der Einfluss des p21-„Knockouts“ auf die Verteilung der Zelllinien KMb/a wt und KMb/a p21<sup>-/-</sup> in den Zellzyklusphasen kontrolliert. Hierzu wurden parallel zur Untersuchung der Proliferation Zellzyklusmessungen in den beiden primären Zelllinien KMb/a p21<sup>-/-</sup> und KMb/a wt zwei Wochen nach der Infektion durchgeführt. Beide Zellpopulationen wurden nach 24 h mit Propidiumiodid gefärbt wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben. Dann wurde der Anteil der Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus mittels FACS-Analyse bestimmt (Abbildung 21). Die Zellen wurden nicht synchronisiert, da dies bis zu einem gewissen Grad einen unterschiedlichen toxischen Stimulus für die beiden Zellpopulationen darstellen könnte und so ein unterschiedlicher Einfluss auf die Apoptose beider Zellpopulationen und damit auf ihre Proliferation entstehen könnte. Somit wurde durch dieses Experiment die Zellzyklusprogression nicht erfasst. Die beiden Zelllinien zeigen keinen deutlichen Unterschied in der Verteilung der Zellzyklusphasen. Somit hat p21 in Bcr-Abl-positiven hämatopoetischen Zelllinien keinen deutlichen Einfluss auf die Zellzyklusphasen-Verteilung. Dies ist im Vergleich zweier proliferierender Zellpopulationen durchaus zu erwarten. Ein deutlicher Unterschied in der Zellzyklusphasenverteilung von Zellpopulationen ist in der Regel nur dann zu beobachten, wenn ein wachstumsinhibitorischer Einfluss auf Zellen untersucht wird, nicht jedoch ein Einfluss, der die Zellzyklusprogression verlangsamt, aber nicht vollständig inhibiert, wie dies offensichtlich durch p21 der Fall ist (Abbildung 20). Um diese Beobachtung mittels einer weiteren und präziseren Methode zu untersuchen, wurde die DNA-Syntheserate der beiden Zellpopulationen KMb/a p21<sup>-/-</sup> und KMb/a wt untersucht.

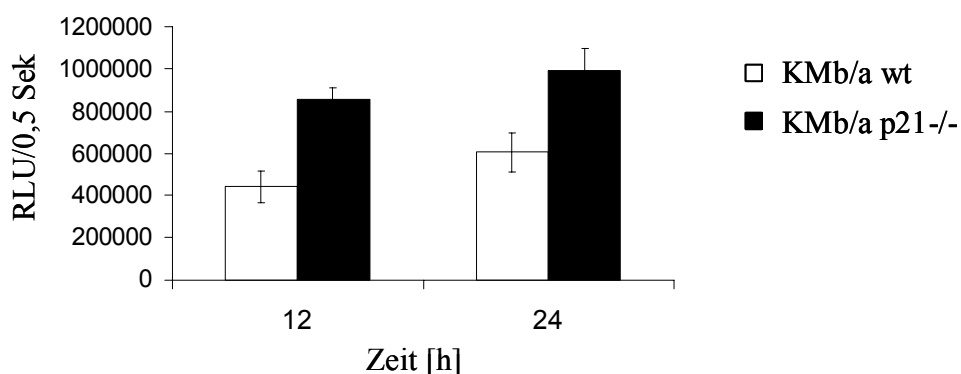
	G1	S	G2/M
<b>KMb/a wt</b>	39%	19%	45%
<b>KMb/a p21<sup>-/-</sup></b>	38%	22%	42%



**Abbildung 21: Die Zellzyklusverteilung in den Zelllinien KMb/a wt und KMb/a p21<sup>-/-</sup>.** In den Zelllinien KMb/a wt und KMb/a p21<sup>-/-</sup> wurde durch PI-Färbung und FACS-Analyse die Zellzyklusphasenverteilung nach Kultivierung der Zellen für 24 h bestimmt. Dargestellt ist die Verteilung der Zellen im Zellzyklus und die quantitative Auswertung der FACS-Messung.

### 4.3.2 In Bcr-Abl-positiven Zellen verlangsamt p21 die DNA-Synthese

Um die Ergebnisse aus Kapitel 4.3.1 zu untermauern, wurde die Proliferation der beiden Zelllinien KMb/a wt und KMb/a p21<sup>-/-</sup> durch Bestimmung der DNA-Syntheserate untersucht. Auf diese Weise sollte in einer klassischen Proliferationsmessung die Rolle von p21 in der Proliferation Bcr-Abl-positiver Zellen untersucht werden. Die Menge an synthetisierter DNA wurde durch den Einbau des Pyrimidin-Analogs 5-Bromo-2'-Deoxyuridine (BrdU) gemessen. Die Quantifizierung des in die DNA eingebauten BrdUs erfolgte immunologisch mittels eines Antikörpers, der mit einer Peroxidase gekoppelt war. In einer Chemilumineszenz-Reaktion wurden die Relativen Lichteinheiten bestimmt (RLU), welche proportional sind zur Menge an synthetisierter DNA (Abbildung 22). Die Anzahl apoptotischer Zellen wurde parallel durch AnnexinV-Messung kontrolliert und war in beiden Zelllinien identisch. Abbildung 22 zeigt, dass die DNA-Syntheserate in KMb/a p21<sup>-/-</sup> Zellen im Vergleich zu KMb/a wt Zellen erhöht ist. Somit reduziert die Expression von p21 in Bcr-Abl transformierten hämatopoetischen Zellen die DNA-Synthese. Dies bestätigt die Ergebnisse aus Kapitel 4.3.1: p21 reduziert die Proliferation in Bcr-Abl-positiven hämatopoetischen Zellen. Bestätigt wird die Proliferationsinhibierende Funktion von p21 auch durch die Lokalisationsexperimente in Kapitel 4.2.



**Abbildung 22: Die DNA-Syntheserate in den Zelllinien KMb/a wt und KMb/a p21<sup>-/-</sup>.** Die DNA-Syntheserate in KMb/a wt Zellen (weiße Balken) und KMb/a p21<sup>-/-</sup> Zellen (schwarze Balken) wurde nach 12 und 24 h bestimmt. Hierzu wurden  $5 \times 10^5$  Zellen/ml in 96-Well-Platten ausgesät und jeweils 6 parallele Ansätze durchgeführt. Die Menge an synthetisierter DNA wurde durch den Einbau des Pyrimidin-Analogs 5-Bromo-2'-Deoxyuridine (BrdU) in die DNA nach 12 und 24 h gemessen. Die immunologische Detektion des in die DNA eingebauten BrdUs erfolgte mittels eines Antikörpers, der mit einer Peroxidase gekoppelt war. In einer Chemilumineszenz-Reaktion wurden die Relativen Lichteinheiten (RLU) bestimmt, welche proportional sind zur Menge an synthetisierter DNA.

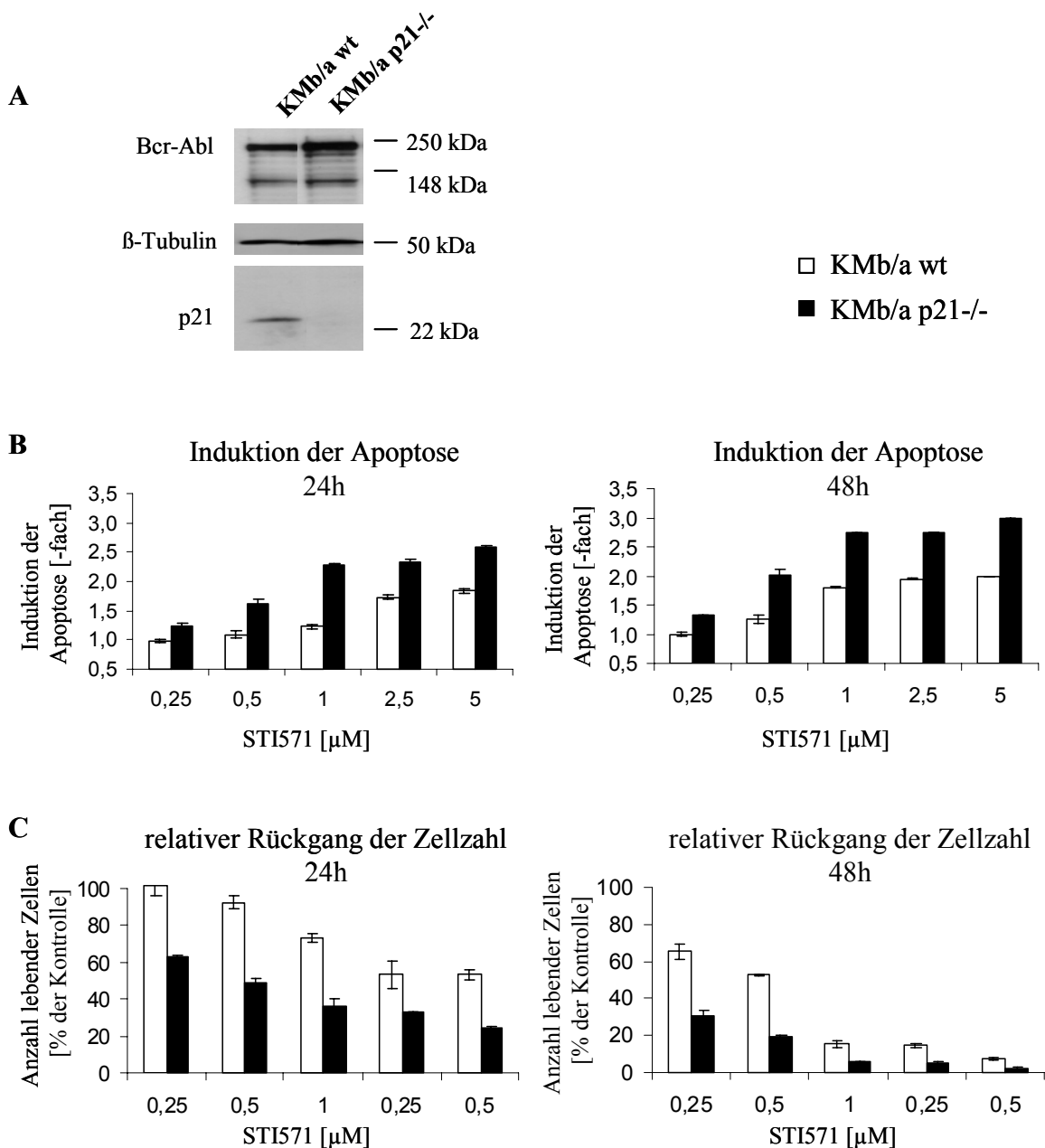
## **4.4 Die biologische Rolle von p21 in der Medikament-induzierten Apoptose in Bcr-Abl positiven hämatopoetischen Zellen**

Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass p21 die Proliferation Bcr-Abl-positiver Zellen reduziert. Das Überleben und die Apoptose wurden jedoch durch p21 in Bcr-Abl-positiven Knochenmarkzelllinien nicht beeinflusst. Da jedoch aus der Literatur bekannt ist, dass Bcr-Abl die Resistenz gegen verschiedene Chemotherapeutika vermittelt, sollte als nächstes untersucht werden, ob p21 Bcr-Abl-positive Zellen vor Medikament-induzierter Apoptose schützt. Hierfür wurden zwei Medikamente mit unterschiedlichem Wirkungsmechanismus verwendet: Der Abl-Kinase-Inhibitor STI571 und das Zytostatikum Taxol.

### **4.4.1 p21 reduziert die STI571-induzierte Apoptose in Bcr-Abl-positiven Knochenmarkzellen**

Um zu untersuchen, ob p21 eine Rolle in der STI571-induzierten Apoptose spielt, wurde der Einfluss des p21-„Knockouts“ auf die STI571-induzierte Apoptose in Bcr-Abl-positiven Zellen im Vergleich zu normalen Bcr-Abl-positiven Zellen untersucht. Hierzu wurden die primären Zelllinien KMb/a p21<sup>-/-</sup> und KMb/a wt verwendet, deren Konstruktion in Kapitel 4.3 beschrieben wurde. Die fehlende p21-Expression in KMb/a p21<sup>-/-</sup> Zellen und die Bcr-Abl-Expression in beiden Zelllinien wurde jeweils im Westernblot bestätigt (Abbildung 23 A). Zur Untersuchung der Rolle von p21 in der STI571-induzierten Apoptose, wurde die Anzahl apoptotischer Zellen nach STI571-Inkubation in beiden Zelllinien durch AnnexinV-Messung bestimmt. Parallel dazu wurde die Anzahl überlebender Zellen nach Trypanblaufärbung dokumentiert. Zur Normierung der Apoptoserate wurde die Anzahl apoptotischer Zellen in STI571-behandelten Zellen auf die Anzahl apoptotischer Zellen in STI571-unbehandelten Zellen standardisiert. Auf diese Weise wurde die Induktionsrate der STI571-induzierten Apoptose ermittelt (Abbildung 23 B). Die Lebendzellzahlen wurden ebenfalls auf die unbehandelte Kontrolle normiert, um so den relativen Rückgang der Lebendzellzahl verfolgen zu können (Abbildung 23 C). Wie zu erwarten, sterben die Bcr-Abl-positiven Zellen mit STI571. Jedoch zeigen KMb/a p21<sup>-/-</sup> Zellen eine deutlich höhere Apoptoserate als KMb/a wt Zellen (Abbildung 23 B). In umgekehrter Korrelation dazu wird die Lebendzellzahl in KMb/a p21<sup>-/-</sup> Zellen durch STI571 stärker reduziert als in KMb/a wt Zellen.



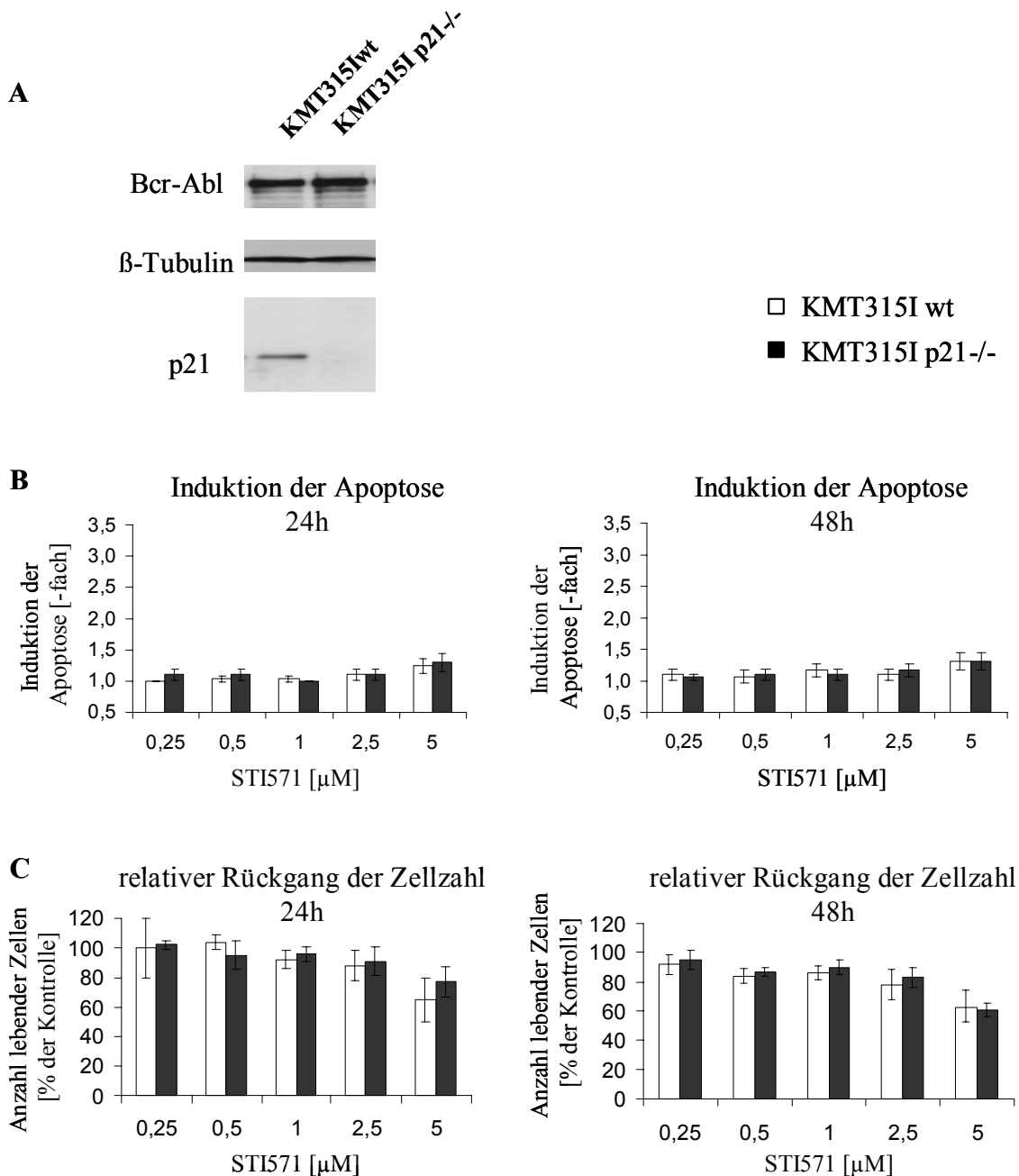


**Abbildung 23: p21 reduziert die STI571-induzierte Apoptose in Bcr-Abl positiven Knochenmarkszellen.** A) Westernblot zur Kontrolle der Bcr-Abl-Expression und des p21-„Knockouts“ in den Knochenmarkszelllinien KMB/a wt und KMB/a p21<sup>-/-</sup>. B) Die Zelllinien KMB/a wt (weiße Balken) und KMB/a p21<sup>-/-</sup> (schwarze Balken) wurden in der Konzentration  $4 \times 10^5$  Zellen/ml in 6-Well-Platten ausgesät und mit verschiedenen Konzentrationen des Abl-Kinase-Inhibitors STI571 inkubiert. Parallel dazu wurden unbehandelte Zellen zur Kontrolle inkubiert. Die Anzahl apoptotischer Zellen wurde durch AnnexinV-Messung bestimmt. Die Induktion der Apoptose wurde berechnet, indem der Prozentsatz apoptotischer Zellen in den Ansätzen mit STI571 auf den entsprechenden Prozentsatz in unbehandelten Zellen normiert wurde. C) Die Lebendzellzahl in den Ansätzen wurde durch Trypanblau-Ausschluss und Zählen der Zellen bestimmt. Der Prozentsatz lebender Zellen in den Proben wurde normiert auf den Prozentsatz der lebenden Zellen einer unbehandelten Kontrolle. Dadurch wurde der relative Rückgang der Lebendzellzahl bestimmt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das Fehlen von p21 Bcr-Abl-transformierte Knochenmarkzellen gegenüber STI571-induzierter Apoptose sensibilisiert. p21 schützt also Bcr-Abl-transformierte Knochenmarkzellen vor STI571-induzierter Apoptose. Diese Experimente wurden in zwei weiteren unabhängig infizierten Knochenmarkzelllinien wiederholt und bestätigt.

### **Der Knockout von p21 sensibilisiert STI571-resistente Knochenmarkzellen nicht gegen Apoptose**

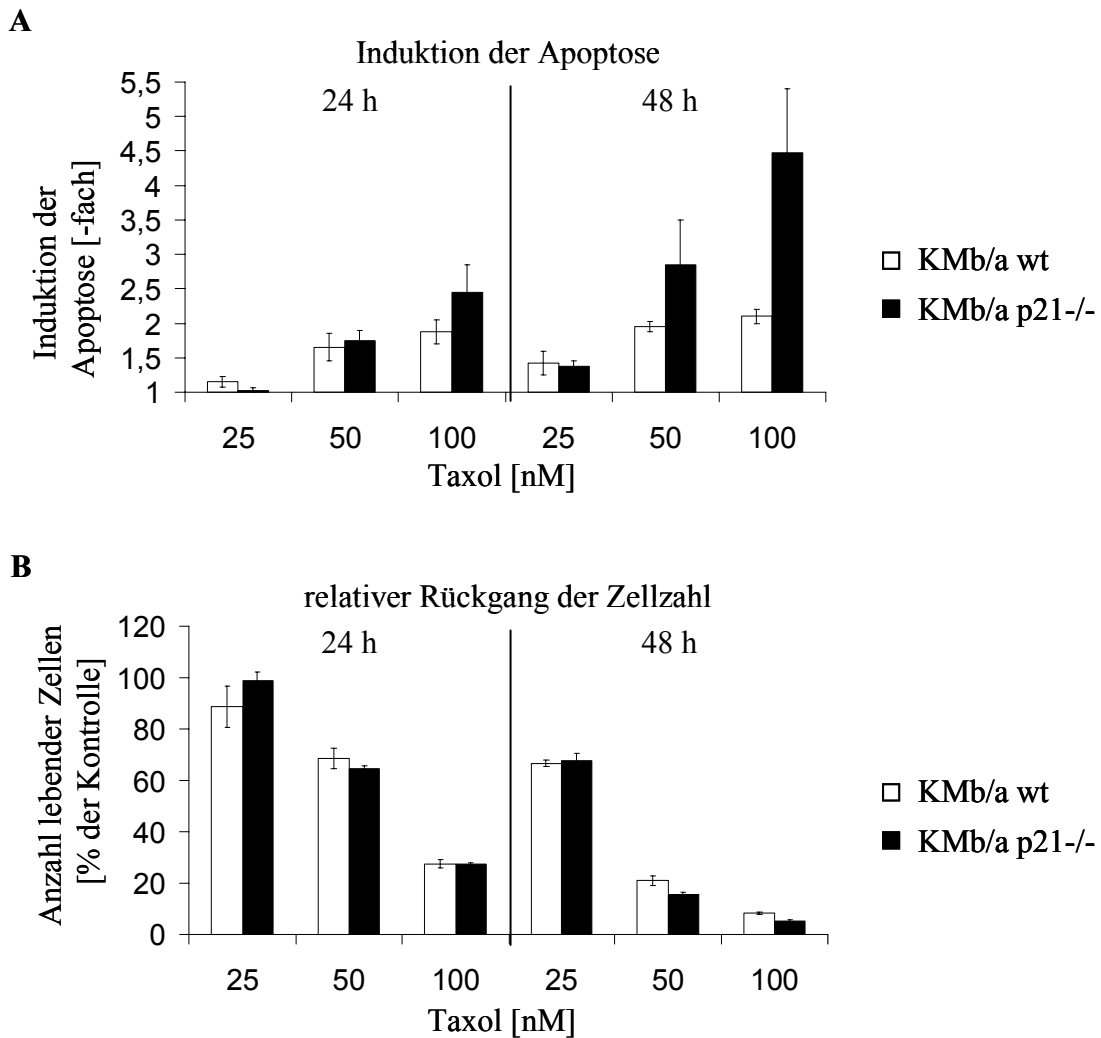
STI571 inhibiert die Kinaseaktivität von Bcr-Abl und induziert so Apoptose in Bcr-Abl-transformierten Zellen. Die Spezifität der STI571-induzierten Apoptose sollte durch ein Kontrollexperiment überprüft werden. Hierfür wurde die STI571-resistente Mutante Bcr-Abl T315I eingesetzt. Zur Herstellung von normalen und p21<sup>-/-</sup> Knochenmarkzellen, die Bcr-Abl T315I exprimieren, wurde Knochenmark aus normalen und p21<sup>-/-</sup> Mäusen mit bcr-abl T315I infiziert. Anschließend erfolgte die Selektion durch Wachstumsfaktorentzug. Die Bcr-Abl-Expression wurde durch GFP-Analyse und durch Westernblot überprüft. Auch der p21-„Knockout“ wurde durch Immunoblot bestätigt (Abbildung 24 A). Auf diese Weise wurden die primären Zelllinien KMT315I p21<sup>-/-</sup> und KMT315I wt konstruiert. Beide Zelllinien wurden mit verschiedenen STI571-Konzentrationen inkubiert. Durch AnnexinV-Messung wurde die Anzahl apoptotischer Zellen bestimmt. Parallel dazu wurde die Lebendzellzahl durch Trypanblau-Ausschluss ermittelt. Zur Normierung der Apoptoserate wurde die Anzahl apoptotischer Zellen in STI571 behandelten Zellen auf die Anzahl apoptotischer Zellen in STI571 unbehandelten Zellen standardisiert (Abbildung 24 B). Auf die gleiche Weise wurden die Lebendzellzahlen auf eine unbehandelte Kontrolle normiert (Abbildung 24 C). Die Ergebnisse zeigen, dass STI571 keinen apoptotischen Effekt auf KMT315I p21<sup>-/-</sup> und KMT315I wt ausübt. Dies war zu erwarten, da die STI571-resistente Mutante Bcr-Abl T315I in den Zellen exprimiert wurde. Deshalb zeigt dieses Kontrollexperiment, dass STI571 in Knochenmarkzellen, wie auch in 32D-Zellen, keinen unspezifischen apoptotischen Effekt ausübt. Gleichzeitig zeigen diese Experimente, dass in STI571 resistenten Zellen die Resistenz gegenüber STI571 durch eine Modulation von p21 nicht aufgehoben werden kann. Dies war zu erwarten, da in Kapitel 4.1 gezeigt wurde, dass p21 ein Kinase-abhängiges Zielmolekül von Bcr-Abl ist. Somit bestätigt dieses Kontrollexperiment nochmals biologisch-funktionell die Ergebnisse aus Kapitel 4.1.



**Abbildung 24: Einfluss des p21-„Knockouts“ auf STI571-resistente, mit Bcr-Abl T315I transformierte Knochenmarkzellen.** **A)** Knochenmarkzellen aus wt und p21<sup>-/-</sup> Mäusen wurden mit bcr-abl T315I infiziert. Mittels Westernblot wurde die Expression der Mutante Bcr-Abl T315I und der p21-„Knockout“ in den Knochenmarkzelllinien KMT315I wt und KMT315I p21<sup>-/-</sup> überprüft. **B)** Die Zelllinien KMT315I wt und KMT315I p21<sup>-/-</sup> wurden mit verschiedenen Konzentrationen des Abl-Kinase-Inhibitors STI571 inkubiert. Parallel dazu wurden unbehandelte Zellen zur Kontrolle mitgeführt. Nach 24 und 48 h wurde jeweils die Anzahl apoptotischer Zellen durch AnnexinV-Messung bestimmt. Die Induktion der Apoptose wurde berechnet, indem der Prozentsatz apoptotischer Zellen in den Ansätzen mit STI571 auf den entsprechenden Prozentsatz in unbehandelten Zellen normiert wurde. **C)** Die Lebendzellzahl in den Ansätzen wurde durch Trypanblau-Ausschluss und Zählen der Zellen bestimmt. Der Prozentsatz lebender Zellen in den Proben wurde normiert auf den Prozentsatz der lebenden Zellen unbehandelter Kontrollen.

#### **4.4.2 p21 reduziert die Taxol-induzierte Apoptose in Bcr-Abl-positiven Knochenmarkzellen**

Um zu untersuchen, ob p21 Bcr-Abl-transformierte Knochenmarkzellen auch vor Taxol-induzierter Apoptose schützt, wurden die Zelllinien KMb/a p21<sup>-/-</sup> und KMb/a wt (Konstruktion siehe Kapitel 4.3) mit verschiedenen Taxol-Konzentrationen inkubiert. Die Anzahl apoptotischer Zellen wurde durch AnnexinV-Messung bestimmt. Parallel dazu wurde die Lebendzellzahl untersucht. Zur Normierung der Apoptoserate wurde die Anzahl apoptotischer Zellen in STI571-behandelten Zellen auf die Anzahl apoptotischer Zellen in STI571-unbehandelten Zellen standardisiert (Abbildung 25 A). Auf die gleiche Weise wurden die Lebendzellzahlen auf eine unbehandelte Kontrolle normiert, um so den relativen Rückgang der Lebendzellzahl und somit den Einfluss von p21 auf das Überleben der Zellen zu ermitteln (Abbildung 25 B). Nach 24 h Taxol-Inkubation ist die geringe Apoptoserate der beiden Zelllinien KMb/a wt und KMb/a p21<sup>-/-</sup> in etwa gleich. Nach 48 h zeigen jedoch die KMb/a p21<sup>-/-</sup> Zellen mit Taxol eine deutlich höhere Apoptoserate als die KMb/a wt Zellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass p21 Bcr-Abl-positive Knochenmarkzellen vor Taxol-induzierter Apoptose schützt. Im Rückgang der Lebendzellzahl ist dagegen zwischen beiden Zelllinien kein deutlicher Unterschied zu detektieren. Das ist auf den Wirkungsmechanismus von Taxol zurückzuführen und darauf, dass die schnellere Proliferation von p21-negativen Zellen ihre erhöhte Apoptoserate kompensiert. Darauf wird in Kapitel 5.3 ausführlich eingegangen. Der Unterschied in der Taxol-induzierten Apoptoserate beider Zelllinien zeigt jedoch, dass das Fehlen von p21 Bcr-Abl-transformierte Knochenmarkzellen für Taxol-induzierte Apoptose sensibilisiert. Daraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass p21 die Taxol induzierte Apoptose in Bcr-Abl transformierten Knochenmarkzellen reduziert und bis zu einem gewissen Grad vor Taxol-induzierter Apoptose schützt. Diese Experimente wurden in zwei weiteren unabhängig infizierten Knochenmarkzelllinien wiederholt und bestätigt.



**Abbildung 25: p21 reduziert die Taxol-induzierte Apoptose in Bcr-Abl transformierten murinen Knochenmarkszellen.** **A)** KMb/a p21<sup>-/-</sup> und KMb/a wt Zellen wurden in 6-Well-Platten mit einer Dichte von  $4 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät und mit verschiedenen Taxol-Konzentrationen inkubiert. Die Apoptose wurde durch AnnexinV-Messung bestimmt. Die Induktion der Apoptose wurde berechnet, indem der Prozentsatz apoptotischer Zellen in den Ansätzen mit Taxol auf den entsprechenden Prozentsatz in unbehandelten Zellen normiert wurde. **B)** Die Lebendzellzahl in den Ansätzen wurde durch Trypanblau-Ausschluss und Zählen der Zellen bestimmt. Der Prozentsatz lebender Zellen in den Proben wurde normiert auf den Prozentsatz der lebenden Zellen unbehandelter Kontrollen. Auf diese Weise wurde der relative Rückgang der Lebendzellzahl ermittelt.

## 5 Diskussion

### 5.1 Bcr-Abl aktiviert die Expression des Zellzyklusinhibitors p21<sup>Waf1/Cip1</sup>

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass in 32D-Zellen die Expression des Zellzyklusinhibitors p21 durch Bcr-Abl hochreguliert wird (Kapitel 4.1). Außerdem wurde in Bcr-Abl-transformierten Zellen die Expression von p21 nicht mehr deutlich durch den Wachstumsfaktor IL-3 reguliert: Während in untransformierten IL-3-abhängigen 32D-Zellen die p21-Expression bei Entzug des Wachstumsfaktors deutlich abnahm, wurde sie in Bcr-Abl-transformierten Zellen nur geringfügig reduziert. Dies ist durch die Substitution des Wachstumsfaktors IL-3 durch Bcr-Abl und die daraus resultierende konstitutive Aktivierung von Wachstumssignalen zu erklären. Es wurde gezeigt, dass die Expression von Bcr-Abl zum Verlust der Wachstumsfaktorabhängigkeit von Zelllinien führt (Hariharan et al., 1988; Daley und Baltimore, 1988). In 32Dp210-Zellen wurde bei Wachstumsfaktorentzug eine geringe Abnahme der p21-Expression beobachtet. Dies lässt darauf schließen, dass p21 zwar durch Bcr-Abl hochreguliert wurde, aber auch IL-3 einen geringen Einfluss auf die p21-Expression nahm. Der potentielle Einwand war, dass ein Einfluss von Sekundärmutationen auf die p21-Regulation in den Bcr-Abl-transformierten 32D-Zellen nicht ausgeschlossen werden konnte (Korsmeyer et al., 1992). Um zu untersuchen, ob die p21-Expression tatsächlich durch Bcr-Abl aktiviert wurde und nicht durch sekundäre Mutationen in den IL-3-unabhängigen, Bcr-Abl-transformierten 32D-Zellen, wurde ein Doxycyclin-regulierbares System für die Expression von Bcr-Abl in 32D-Zellen etabliert. Auch in diesen Zellen korrelierte die Expression von p21 mit der von Bcr-Abl: Bei Abschalten der Bcr-Abl-Expression wurde die p21-Expression auf das Niveau von IL-3-abhängig wachsenden 32D-Zellen reduziert. Im Gegensatz zu den 32Dp210-Zellen proliferierten die Doxycyclin-induzierbaren Zellen ohne Bcr-Abl-Expression nur in Abhängigkeit von Wachstumsfaktor IL-3. An Hand dieses Systems konnte bewiesen werden, dass die Aktivierung der p21-Expression direkt durch Bcr-Abl vermittelt wird.

Bcr-Abl beeinflusst die zelluläre Signaltransduktion nicht nur mittels seiner Kinaseaktivität (Warmuth et al., 1999). Src-Kinasen werden zum Beispiel auch durch Kinase-inaktive Mutanten von Bcr-Abl aktiviert (Warmuth et al., 1997). In dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob die Regulation der p21-Expression durch die katalytische Aktivität der Bcr-

Abl-Kinase reguliert wird. Hierzu wurde die Kinaseaktivität von Bcr-Abl durch den Inhibitor STI571 blockiert. Der Inhibition der Bcr-Abl-Kinase durch STI571 folgte schon nach 6 h eine Abnahme der p21-Expression. Proteinkinase-Inhibitoren können jedoch auch unspezifische Effekte ausüben, falls sie weitere Kinasen in der Zelle blockieren. Um dies auszuschließen, wurde auch die STI571-resistente Bcr-Abl-Mutante T315I in 32D-Zellen exprimiert (Gorre et al., 2001; Warmuth et al., 2003). Durch STI571 wurde in dieser 32D-Zelllinie keine Reduktion der p21-Expression beobachtet. Dies zeigt, dass die verminderte Expression von p21 durch STI571 nur auf der Inhibition der Bcr-Abl-Kinaseaktivität beruhte. Somit konnte gezeigt werden, dass p21 ein Kinase-abhängiges Zielmolekül der Bcr-Abl-aktivierten Signaltransduktion ist.

Mögliche Signalwege, die zu einer Aktivierung der p21-Expression führen könnten, wären der STAT5- und Akt-Signalweg, die beide durch die Bcr-Abl-Kinase aktiviert werden (Ilaria und Van Etten, 1996; Skorski et al., 1995). In verschiedenen zellulären Systemen wurde gezeigt, dass durch STAT5 die p21-Transkription aktiviert wird (Gartel und Tyner, 1999). Die Akt-vermittelte Phosphorylierung von p21 führt zu einer Stabilisierung und zur verminderten Degradation von p21 (Li et al., 2002). Akt könnte so zu einer Hochregulation von p21 führen. Die Beteiligung beider Signalwege an der p21-Regulation war jedoch nicht Thema der vorliegenden Arbeit. Vor weiterführenden Untersuchungen sollte zuerst die biologische Funktion von p21 in Bcr-Abl-positiven Zellen geklärt werden.

## **5.2 p21<sup>Waf1/Cip1</sup> reduziert die Proliferation Bcr-Abl-positiver Zellen**

Zunächst erschien es paradox, dass ein Onkoprotein direkt ein als Zellzyklusinhibitor bekanntes Protein hochreguliert. Deshalb stellte sich die Frage, welche biologische Funktion p21 in Bcr-Abl transformierten Zellen spielt. Denn p21 hat abhängig vom zellulären Kontext, seiner Lokalisation und seinem Expressionsniveau konträre Funktionen in der Zelle: p21 kann den Zellzyklus und die Proliferation sowohl inhibieren als auch aktivieren (Sherr und Roberts, 1999). Außerdem kann p21 sowohl eine anti-apoptotische als auch Apoptose-induzierende Funktion ausüben. Es sollte daher die Frage geklärt werden, ob p21 die Proliferation in Bcr-Abl-positiven Zellen inhibiert oder aktiviert und ob p21 die Apoptose in Bcr-Abl-positiven Zellen beeinflusst.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass p21 die Proliferation Bcr-Abl-transformierter Zellen reduziert. Diese Eigenschaft von p21 konnte aus Ergebnissen mit Bcr-Abl-positiven p21-

„Knockout“-Knochenmarkzellen gezeigt werden. Das Fehlen von p21 korrelierte mit einer erhöhten DNA-Syntheserate und einer erhöhten Proliferation der Bcr-Abl-transformierten murinen Knochenmarkzellen. p21 wirkt also in Bcr-Abl-positiven Zellen als klassischer Proliferationsinhibitor (Sherr und Roberts, 1995). Doch trotz Hochregulation des Proliferations-inhibierenden p21 wachsen Bcr-Abl-positive Zellen. Das ist dadurch zu erklären, dass die Proliferations-fördernden Signalwege, die durch Bcr-Abl aktiviert werden, im Nettoeffekt die Proliferations-reduzierende Wirkung von p21 überwiegen. Durch Bcr-Abl werden direkt auch wachstumsfördernde Signalwege unabhängig von Wachstumsfaktoren aktiviert. Bcr-Abl erhöht die Expression von CyclinD, welches den Eintritt in die G1-Phase des Zellzyklus vermittelt. Auch eine Erhöhung der Aktivität von Cyclin-abhängigen Kinasen durch Bcr-Abl wurde gezeigt (Parada et al., 2001). Dadurch vermittelt Bcr-Abl direkt einen Wachstumsfaktor-unabhängigen Ablauf des Zellzyklus in CML-Patientenzellen und 32D-Zellen (Cortez et al., 1997; Jonuleit et al., 1998). Auch das Zellzyklus-inhibitorische Protein p27 wird durch Bcr-Abl durch einen PI3-Kinase-abhängigen Signalweg inhibiert. Es ist also anzunehmen, dass die aktivierten mitogenen Stimuli und verminderten inhibitorischen Einflüsse die abschwächende Wirkung von p21 kompensieren.

Weiterhin wurde die Rolle von p21 in Bcr-Abl positiven Zellen im Hinblick auf die Apoptose untersucht. Die Apoptose entspricht hier der endogenen Apoptose der Zellpopulationen in Kultur und ist nicht durch äußere Einflüsse oder toxische Substanzen induziert. Die Apoptose der Bcr-Abl-transformierten Knochenmarkzellen in Kultur wurde jedoch nicht durch p21 verändert. Eine stärkere Zunahme der Lebendzellzahl in Bcr-Abl-positiven p21-„Knockout“-Knochenmarkzellen gegenüber p21-„Wildtyp“-Zellen ist daher vor allem auf die Reduktion der Proliferationsrate durch p21 zurückzuführen und eher nicht auf eine Förderung der Apoptose durch p21. Die Apoptose der Zellen unterschied sich weder in Versuchen über zwei Tage hinweg, noch zeigte sich ein Unterschied in der durchschnittlichen Apoptose der Zellkulturen nach einer regelmäßigen Kontrolle über 4 Wochen.

Somit zeigen die Untersuchungen zur Rolle von p21 in Bcr-Abl-positiven Zellen, dass p21 die Proliferation reduziert und die Apoptose nicht beeinflusst. Diese Daten korrelieren mit den Ergebnissen zur zellulären Lokalisation von p21 in 32D-Zellen in Kapitel 4.2 dieser Arbeit: p21 ist in Bcr-Abl-positiven 32D-Zellen ausschließlich im Kern lokalisiert. Die nukleäre Lokalisation von p21 korreliert mit einer Zellzyklus-regulatorischen Funktion (La Baer et al., 1997), während die zytoplasmatische Lokalisation mit einer anti-apoptotischen Wirkung von p21 korreliert (Asada et al., 1999; Yu et al., 1998). Da p21 in Bcr-Abl-positiven Zellen, die keiner Stressituation ausgesetzt waren, nicht im Zytoplasma lokalisiert war, sondern



ausschließlich im Zellkern, ist anzunehmen, dass p21 hier keine anti-apoptotische Funktion besitzt. Somit unterstützen die Lokalisationsexperimente dieser Arbeit die Ergebnisse aus den Experimenten zur Funktion von p21 in Bcr-Abl-positiven Zellen.

Da in der vorliegenden Arbeit in einem p21-„Knockout“-System gezeigt wurde, dass p21 die Proliferation Bcr-Abl-positiver Zellen reduziert, stellt sich die Frage, welche Rolle p21 bei der Entstehung der CML spielt. Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse wäre anzunehmen, dass der Krankheitsverlauf der CML bei Fehlen von p21 aggressiver verlaufen würde. Ähnliche Ergebnisse wurden in p53-„Knockout“-Mäusen gezeigt (Martin-Caballero et al., 2001). Bisher gibt es jedoch keine Untersuchungen, die eine einheitliche Funktion von p21 als Tumorsuppressor bestätigen (Roninson, 2002). In einigen Tumoren führte der Verlust von p21 zwar zur Tumorprogression (Komiya et al., 1997; Lu et al., 1998; Zirbes et al., 2000; Kapranos et al., 2001). Es gibt jedoch Hinweise auf eine Korrelation zwischen erhöhter Expression von p21 und einer verstärkten Tumorprogression (Baretton et al., 1999; Aaltomaa et al., 1999; Ferrandina et al., 2000). In anderen Arbeiten spielt p21 keine Rolle in der Tumorprogression (Elledge et al., 1998; Baekelandt et al., 1999). Die Erklärung für die unterschiedliche Auswirkung von p21 auf die Tumorentstehung ist, dass p21 sowohl Eigenschaften eines Tumorsuppressors, als auch eines Onkoproteins besitzt: Einerseits verleiht die negativ-proliferative Funktion p21 die Eigenschaften eines Tumorsuppressors, andererseits zeigen die bisher eindeutig identifizierten anti-apoptotischen Funktionen von p21, dass es ein Potential als Onkoprotein besitzt (Gartel und Tyner, 2002). Die unterschiedliche Ausprägung dieser gegensätzlichen Eigenschaften in verschiedenen Tiermodellen kann auf die multifunktionalen und konträren Eigenschaften von p21 zurückgeführt werden (Kapitel 1.4). Diese sind abhängig vom jeweiligen zellulären Kontext und deshalb ist anzunehmen, dass sie auch vom onkogenen Stimulus beeinflusst werden. Dass in manchen Tumoren keine Auswirkung von p21 oder des p21-„Knockouts“ auf die Tumorentwicklung beobachtet wird, ist dadurch zu erklären, dass p21 ein vergleichsweise wenig potentes Onkogen oder wenig potenter Tumorsuppressor ist. Dafür spricht, dass umfangreiche Studien zu der Beobachtung gelangen, dass p21-Mutationen in humanen Krebserkrankungen äußerst selten sind (Shiohara et al., 1994; McKenzie et al., 1997; Patino-Garcia et al., 1998). Zudem wirken sich Mutationen von anderen Tumorsuppressoren, wie p53 und p16, die in ähnlichen Signalwegen wie p21 eine Rolle spielen, deutlich gravierender auf die Tumorentstehung aus und treten zudem bei weitem häufiger auf. Es scheint nötig zu sein, die Rolle von p21 für jede Krebserkrankung neu zu definieren. Die Frage, ob p21 in Bcr-

Abl-positiven Zellen eine Rolle als Tumorsuppressor spielt, lässt sich nur in weiterführenden Arbeiten in Tiermodellen eindeutig klären.

### **5.3 p21<sup>Waf1/Cip1</sup> reduziert die STI571- und Taxol-induzierte Apoptose in Bcr-Abl-positiven Zellen**

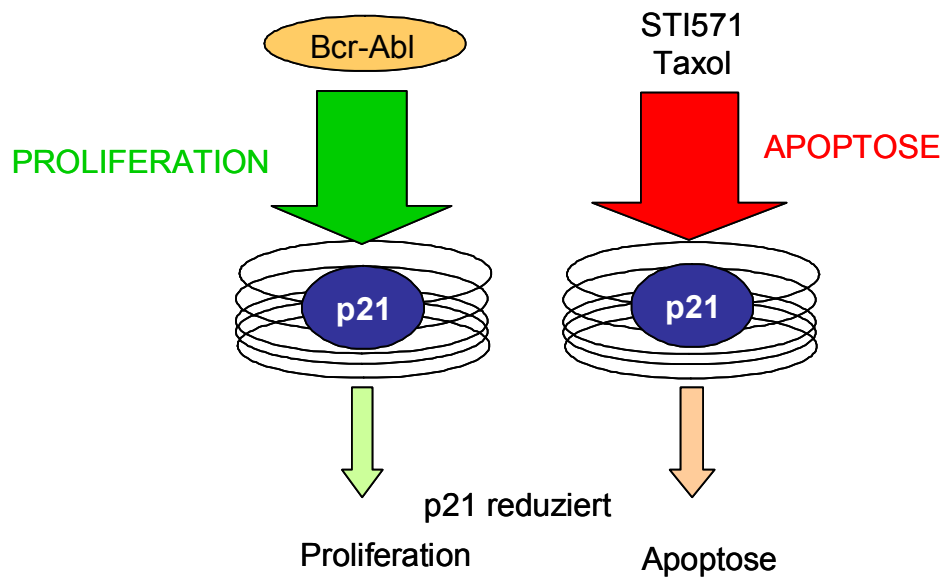
Im Rahmen dieser Arbeit wurde kein Einfluss von p21 auf die Apoptose in Bcr-Abl positiven Zellen beobachtet. Dennoch wurde eine anti-apoptotische Funktion von p21 in der STI571- und Taxol-induzierten Apoptose gefunden. In vielen Publikationen wurde gezeigt, dass p21 eine Resistenz gegen Medikament-induzierte Apoptose vermittelt (Gartel und Tyner, 2002). Sowohl in p21-positiven (KMb/a wt) als auch in p21-negativen (KMb/a p21<sup>-/-</sup>) Bcr-Abl-transformierten Zellen induzierte der Abl-Kinase-Inhibitor STI571 Apoptose. Dabei zeigten p21-negative Zellen eine deutlich erhöhte STI571-induzierte Apoptoserate im Vergleich zu p21-positiven Zellen. p21-negative Zellen waren somit sensitiver gegenüber STI571-induzierter Apoptose. Auch die relative Lebendzellzahl reduzierte sich beim Fehlen von p21 deutlich gegenüber p21-positiven Zellen. Dies zeigt, dass p21 die apoptotische Wirkung von STI571 abschwächt.

Auch die Taxol-induzierte Apoptose wurde durch den Verlust von p21 erhöht. In p21-negativen Zellen erfolgte eine 5-fache Induktion der Apoptose, während zum Vergleich in p21-positiven Zellen nur eine maximal 2-fache Induktion erfolgte. p21 stellt hier einen Schutzmechanismus vor Taxol-induzierter Apoptose dar, auch wenn die Bcr-Abl-transformierten p21<sup>-</sup> „Wildtyp“-Knochenmarkzellen hier nicht komplett resistent waren gegen Taxol. Es ist bekannt, dass Bcr-Abl Schutz vor Taxol-induzierter Apoptose vermittelt (Jamieson et al., 1999). Ein weiterer biologisch-funktioneller Beweis für den Bcr-Abl-abhängigen Schutz vor Apoptose wurde in 32D-Zellen gezeigt, in denen der Apoptoseschutz von der Menge an exprimiertem Bcr-Abl abhängig ist (Cambier et al., 1998). Ein genauer Mechanismus hierfür ist jedoch noch nicht bekannt. In einer aktuellen Publikation wurde bisher in Bcr-Abl-positiven Zellen die p21-Expression und seine zytoplasmatische Lokalisation mit dem Schutz vor Etoposid-induzierter Apoptose korreliert (Keeshan et al., 2003). Eine eindeutige Validierung von p21 als Apoptose-Schutz wurde hingegen in diesem Versuchmodell nicht erreicht. Ganz im Gegensatz zur Situation mit STI571 zeigte sich im relativen Rückgang der Lebendzellzahl nach Taxol-Inkubation kein deutlicher Unterschied zwischen p21-positiven und -negativen Zellen. Dies ist auf die unterschiedlichen

Mechanismen der Taxol- und STI571-induzierten Apoptose zurückzuführen und den unterschiedlichen Einfluss von Taxol und STI571 auf die p21-Expression. Taxol inhibiert die Mikrotubuli und induziert nach einer Phase des G2/M-Arrests Apoptose (Horwitz, 1992). Taxol führt außerdem nicht zur Reduktion der p21-Expression, wie dies durch die Blockade von Bcr-Abl durch STI571 der Fall ist. Vielmehr wurde gezeigt, dass Taxol die p21-Expression in manchen Zellen erhöht (Yu et al., 1998). Somit bleibt in p21-positiven Zellen die p21-Expression nach Taxol-Zugabe erhöht. Diese Zellen sind dann zwar teilweise vor Apoptose geschützt, gleichzeitig ist aber auch die Proliferation der (noch) nicht apoptotischen Zellen reduziert im Vergleich zu p21-negativen Zellen. Letztere wiederum zeigen zwar eine stärkere Induktion der Apoptose, da hier der Schutz vor Apoptose durch p21 entfällt, dafür wachsen alle (noch) nicht-apoptotischen Zellen schneller, was den Unterschied in der Lebendzellzahl ausgleicht. Somit kompensiert die erhöhte Proliferation von p21-negativen Zellen ihre erhöhte Taxol-induzierte Apoptoserate, was sich im fehlenden Unterschied im Rückgang der Lebendzellzahl zeigt. Im Gegensatz zu Taxol inhibiert STI571 spezifisch Bcr-Abl und führt, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, zur Verminderung der Bcr-Abl-abhängigen p21-Expression. Somit wird durch STI571 das p21-Expressionsniveau in den p21-positiven Zellen allmählich an die p21-„Knockout“-Situation angeglichen. Damit wurde der Schutz vor Apoptose reduziert, was sich in einem im Vergleich zu Taxol geringeren Unterschied des Apoptosegrades von p21-positiven zu p21-negativen Zellen widerspiegelt. Jedoch zeigt sich hier im Gegensatz zur Taxol-induzierten Apoptose ein deutlicher Unterschied im Rückgang der Lebendzellzahl.

#### **5.4 Eine duale Rolle von p21<sup>Waf1/Cip1</sup> in Bcr-Abl-positiven Zellen**

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass p21 eine duale Rolle in Bcr-Abl-positiven hämatopoetischen Zellen ausübt, denn p21 reduziert sowohl die Proliferation, als auch die STI571- und Taxol-induzierte Apoptose. Damit hat p21 die gleiche reduzierende Wirkung in zwei entgegengesetzten zellulären Phänomenen: In der durch Bcr-Abl deregulierten und konstitutiv aktiven Proliferation und in der durch STI571- und Taxol-induzierten Apoptose. Somit wirkt p21 wie ein Stoßdämpfer oder Kompensator für überaktive oder deregulierte Signale im zellulären Netzwerk Bcr-Abl-positiver hämatopoetischer Zellen (Abbildung 26).



**Abbildung 26: Model zur Rolle von p21 in Bcr-Abl-positiven Zellen.** p21 schwächt deregulierte oder überaktive Signale ab und wirkt so wie ein „Input-abhängiger Stoßdämpfer“ der Bcr-Abl-vermittelten Proliferation und der STI571- und Taxol-induzierten Apoptose in Bcr-Abl-positiven Zellen.

Es erscheint zunächst kontrovers, dass p21 entgegen gesetzte zelluläre Phänomene dämpft und damit in die gleiche Richtung beeinflusst. Jedoch ist, wie in der Einleitung in Kapitel 1.4 dargestellt wurde, durch den aktuellen Forschungsstand belegt, dass p21 nicht nur Proliferation sondern auch Apoptose in verschiedensten zellulären Systemen regulieren kann. Dabei kann p21 abhängig vom zellulären Kontext, seinem Expressionsniveau und seiner zellulären Lokalisation konträre Rollen ausüben: p21 kann den Zellzyklus und die Proliferation sowohl inhibieren als auch aktivieren (Sherr und Roberts, 1999). Außerdem besitzt p21 sowohl anti-apoptotische als auch Apoptose-induzierende Funktion (Gartel und Tyner, 2002).

In einem Grossteil der Arbeiten zu p21 in verschiedensten Zellkultur-Modellen wurde entweder eine Funktion von p21 als Zellzyklusregulator untersucht, oder eine Funktion von p21 in der Apoptose geklärt. Die gleichzeitige Untersuchung der biologischen Funktion von p21 in Proliferation und Apoptose in Bcr-Abl-positiven Zellen wurde bisher nicht durchgeführt. Jedoch wurde in einigen anderen zellulären Tumormodellen die Funktion von p21 in Proliferation und Apoptose parallel im selben Zellsystem untersucht. Tian et al. zeigen, dass p21 in humanen Kolonkarzinom-Zelllinien ebenfalls sowohl die Proliferation inhibiert, als auch vor Strahlungs-induzierter Apoptose schützt (Tian et al., 2000). Ähnliches wurde in

einer weiteren humanen epithelialen Karzinom-Zelllinie von Schmidt et al. gezeigt. Hierbei schützte die Überexpression von p21 die Zellen vor der Wirkung von Taxol oder Cisplatin. Ohne Einfluss eines Chemotherapeutikums führte die induzierte Überexpression von p21 zur Arretierung der Zellen in der G1-Phase (Schmidt et al., 2001). Li et al. beobachteten in Glioblastom-Zelllinien, dass die Stabilisierung des p21-Proteinlevels ebenfalls vor Taxol-induzierter Apoptose schützt (Li et al., 2002). Jedoch wurde ohne toxischen Stimulus in diesem Zellsystem eine erhöhte Bildung aktiver CyclinD1-CDK4-p21-Komplexe gefördert und CyclinE-CDK2-Komplexe wurden nicht durch p21 inhibiert. Es konnte also angenommen werden, dass in diesem Tumormodell p21 das Überleben der Zellen fördert, indem die Proliferation aktiviert und Taxol-induzierte Apoptose inhibiert wurden.

Der gegenwärtige Forschungsstand zeigt somit, dass es kein einheitliches duales Modell zur Rolle von p21 in kanzerogenen Zellen gibt. In der zusammenfassenden Literatur wird jedoch die These vertreten, dass p21 eine „antagonistische Dualität“ besitzt, da es sowohl proliferative als auch apoptotische Signale inhibiert (Gartel und Tyner, 2002). Die duale biologische Rolle von p21 wird zudem in der gut untersuchten Funktion von p21 bei der p53-vermittelten Stress-Antwort deutlich: Hierbei inhibiert p21 den Zellzyklus, aber gleichzeitig auch die Stress-induzierte Apoptose der Zellen als Antwort auf DNA-schädigende Agenzien. Ähnlich dazu besitzen auch weitere Proteine diese gegensätzlichen biologischen Funktionen. So reguliert zum Beispiel der Transkriptionsfaktor Myc ebenfalls Proliferation und Apoptose auf dieselbe Weise: Myc aktiviert abhängig vom zellulären Kontext die Proliferation oder die Apoptose (Evan und Vousden, 2001).

Die Vielzahl an Publikationen zeigt, dass p21 unterschiedliche und multifunktionale Rollen besitzt. Daher ist es notwendig, die biologische Funktion von p21 für jeden Zelltyp und zellulären Kontext neu zu untersuchen. Ob p21 ein relevantes Ziel für eine molekulare (Kombinations-) Therapie ist, muss deshalb ebenfalls für jeden Krankheitsmechanismus neu geklärt werden. In dieser Arbeit wurde für p21 in Bcr-Abl-positiven hämatopoetischen Zellen eine „Stoßdämpfer-Funktion“ beschrieben, durch die sowohl die Bcr-Abl-aktivierte Proliferation, als auch die STI571- und Taxol-induzierte Apoptose reduziert werden. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, kann diese konträr-duale Funktion von p21 einen Einfluss auf die Biologie und Entwicklung einer Bcr-Abl-positiven Zellpopulation auch während der Medikament-induzierten Apoptose ausüben.

## 6 Zusammenfassung

Bcr-Abl ist eine onkogene Tyrosinkinase, welche die Entstehung der chronischen myeloischen Leukämie und der Philadelphia-positiven B-ALL induziert, indem sie in hämatopoetischen Zellen die Proliferation dereguliert und die Apoptose inhibiert. Ein Protein, das ebenfalls beide Vorgänge in der Zelle regulieren kann, ist der Zellzyklusinhibitor p21. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Bcr-Abl die Expression von p21 durch seine Kinaseaktivität hochreguliert. Diese Beobachtung war der Ausgangspunkt für die Frage nach der biologischen Funktion von p21 in Bcr-Abl-transformierten Zellen, denn es erschien paradox, dass in einer transformierten Zelle ein Zellzyklusinhibitor durch das Onkoprotein induziert wird. p21 kann jedoch abhängig vom zellulären Kontext und seinem Expressionsniveau in einer Zelle vielfältige und gegensätzliche Funktionen ausüben: p21 kann die Proliferation und Apoptose sowohl aktivieren als auch inhibieren. Da Bcr-Abl die p21-Expression induziert und die zelluläre Funktion von p21 vor allem über dessen Expressionsniveau reguliert wird, sollte die biologische Rolle von p21 in der Proliferation und in der Apoptose Bcr-Abl-positiver Zellen geklärt werden.

Mit Hilfe eines p21-„Knockout“-Modells in murinen Knochenmarkzellen wurde in einem biologisch-relevanten Zellkultursystem gezeigt, dass p21 die Proliferation Bcr-Abl-transformierter Zellen reduziert. Die Apoptose wurde in proliferierenden Bcr-Abl-positiven Knochenmarkzellen nicht durch p21 beeinflusst. Diese funktionalen Ergebnisse wurden durch Untersuchungen zur zellulären Lokalisation von p21 bestätigt. Obwohl p21 die Apoptose der proliferierenden Bcr-Abl-positiven Zellen nicht regulierte, wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass p21 sowohl die STI571- als auch die Taxol- induzierte Apoptose reduziert und somit eine anti-apoptotische Funktion in der Bcr-Abl-transformierten Zelle im Falle der Medikament-induzierten Apoptose ausübt. Dadurch wurde eine konträr-duale Funktion von p21 in Bcr-Abl-transformierten Zellen gezeigt: p21 ist ein abschwächender Faktor für die beiden gegensätzlichen zellulären Phänomene der Bcr-Abl-aktivierten Proliferation und der Medikament-induzierten Apoptose (ausgelöst durch STI571 oder Taxol). Damit wirkt p21 in Bcr-Abl-positiven Zellen wie ein „Input-abhängiger Stossdämpfer“, der deregulierte und überaktive zelluläre Signale kompensiert bzw. reduziert.

## 7 Literaturverzeichnis

Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M, Ala-Opas M, Kosma VM. Prognostic value and expression of p21(waf1/cip1) protein in prostate cancer. *Prostate* **1999** 39(1), 8-15.

Amarante-Mendes GP, McGahon AJ, Nishioka WK, Afar DE, Witte ON, Green DR. Bcl-2-independent Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis: protection is correlated with up regulation of Bcl-xL. *Oncogene*. **1998** 16(11), 1383-90.

Amarante-Mendes GP, Naekyung Kim C, Liu L, Huang Y, Perkins CL, Green DR, Bhalla K. Bcr-Abl exerts its antiapoptotic effect against diverse apoptotic stimuli through blockage of mitochondrial release of cytochrome C and activation of caspase-3. *Blood*. **1998** 91(5), 1700-5.

Asada M, Yamada T, Ichijo H, Delia D, Miyazono K, Fukumuro K, Mizutani S. Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. *EMBO* **1999** 18(5), 1223-34.

Baekelandt M, Holm R, Trope CG, Nesland JM, Kristensen GB. Lack of independent prognostic significance of p21 and p27 expression in advanced ovarian cancer: an immunohistochemical study. *Clin Cancer Res*. **1999** 5(10), 2848-53.

Baretton GB, Klenk U, Diebold J, Schmeller N, Lohrs U. Proliferation- and apoptosis-associated factors in advanced prostatic carcinomas before and after androgen deprivation therapy: prognostic significance of p21/WAF1/CIP1 expression. *Br J Cancer* **1999** 80(3-4), 546-55.

Bargonetti J, Manfredi JJ. Multiple roles of the tumor suppressor p53. *Curr Opin Oncol*. **2002** 14(1), 86-91.

Basu S, Kolesnick R. Stress signals for apoptosis: ceramide and c-Jun kinase. *Oncogene* **1998** 17(25), 3277-85.

Bedi A, Barber JP, Bedi GC, el-Deiry WS, Sidransky D, Vala MS, Akhtar AJ, Hilton J, Jones RJ. BCR-ABL-mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents. *Blood* **1995** 86(3), 1148-58

Bedi A, Zehnbauer BA, Barber JP, Sharkis SJ, Jones RJ. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. *Blood* **1994** 83(8), 2038-44.

Bhatia, R., Munthe, H. A., Williams, A. D., Zhang, F., Forman, S. J., und Slovak, M. L. Chronic myelogenous leukemia primitive hematopoietic progenitors demonstrate increased sensitivity to growth factor-induced proliferation and maturation. *Exp Hematol.* **2000** 8, 1401-1412.

Brugarolas J, Bronson RT, Jacks T. p21 is a critical CDK2 regulator essential for proliferation control in Rb-deficient cells. *J Cell Biol.* **1998** 141(2), 503-14.

Cambier N, Chopra R, Strasser A, Metcalf D, Elefanty AG. BCR-ABL activates pathways mediating cytokine independence and protection against apoptosis in murine hematopoietic cells in a dose-dependent manner. *Oncogene* **1998** 16(3), 335-48.

Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* **1998** 282(5392), 1318-21.

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

Carroll M, Ohno-Jones S, Tamura S, Buchdunger E, Zimmermann J, Lydon NB, Gilliland DG, Druker BJ. CGP 57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing BCR-ABL, TEL-ABL, and TEL-PDGFR fusion proteins. *Blood* **1997** 90(12), 4947-52.

Cheng T, Rodrigues N, Shen H, Yang Y, Dombkowski D, Sykes M, Scadden DT. Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science* **2000** 287(5459), 1804-8.

Cortez D, Kadlec L, Pendergast AM. Structural and signaling requirements for BCR-ABL-mediated transformation and inhibition of apoptosis. *Mol Cell Biol.* **1995** 15(10), 5531-41.

Cortez D, Reuther G, Pendergast AM. The Bcr-Abl tyrosine kinase activates mitogenic signaling pathways and stimulates G1-to-S phase transition in hematopoietic cells. *Oncogene* **1997** 15(19), 2333-42.



- Daley GQ, Baltimore D. Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210bcr/abl protein. *PNAS* **1988** 85(23), 9312-6.
- de Groot RP, Raaijmakers JA, Lammers JW, Koenderman L. STAT5 activation by BCR-Abl contributes to transformation of K562 leukemia cells. *Blood* **1999** 94(3), 1108-12.
- de Groot RP, Raaijmakers JA, Lammers JW, Koenderman L. STAT5-Dependent CyclinD1 and Bcl-xL expression in Bcr-Abl-transformed cells. *Mol Cell Biol Res Commun.* **2000** 3(5), 299-305.
- Deininger MW, Goldman JM, Lydon N, Melo JV. The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells. *Blood.* **1997** 90(9), 3691-8.
- Deutsch E, Dugray A, AbdulKarim B, Marangoni E, Maggiorella L, Vaganay S, M'Kacher R, Rasy SD, Eschwege F, Vainchenker W, Turhan AG, Bourhis J. BCR-ABL down-regulates the DNA repair protein DNA-PKcs. *Blood.* **2001** 97(7), 2084-90.
- Dotto GP. p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? *Biochim Biophys Acta.* **2000** 1471(1), 43-56.
- Druker B. Current treatment approaches for chronic myelogenous leukemia. *Cancer J.* **2001** 7(1), 14-8.
- Druker B. Signal transduction inhibition: results from phase I clinical trials in chronic myeloid leukemia. *Semin Hematol.* **2001** 3(8); 9-14.
- Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med.* **1996** 2(5), 561-6.
- el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **1993** 75(4), 817-25.
- el-Deiry WS. Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol.* **1998** 8(5), 345-57.
- Elledge RM, Allred DC. Prognostic and predictive value of p53 and p21 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* **1998** 2(1-3), 79-98.

- Era T, Witte ON. Regulated expression of P210 Bcr-Abl during embryonic stem cell differentiation stimulates multipotential progenitor expansion and myeloid cell fate. *PNAS* **2000** 97(4), 1737-42.
- Faderl, S, Talpaz, M, Estrov, Z, O'Brien, S, Kurzrock, R, and Kantarjian, HM. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **1999** 341, 164-172.
- Fan Y, Borowsky AD, Weiss RH. An antisense oligodeoxynucleotide to p21(Waf1/Cip1) causes apoptosis in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther.* **2003** 2(8), 773-82.
- Ferrandina G, Stoler A, Fagotti A, Fanfani F, Sacco R, De Pasqua A, Mancuso S, Scambia G. p21WAF1/CIP1 protein expression in primary ovarian cancer. *Int J Oncol.* **2000** 17(6), 1231-5.
- Fialkow, PJ, Jacobson, RJ, and Papayannopoulou, T. Chronic myelocytic leukemia: clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage. *Am J Med* **1977** 63, 125-130.
- Flores-Rozas, H, Kelman, Z, Dean, FB, Pan, ZQ, Harper, JW, Elledge, SJ, O'Donnell, M, and Hurwitz, J. Cdk-interacting protein 1 directly binds with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalyzed by the DNA polymerase delta holoenzyme. *PNAS* **1994** 91, 8655-8659.
- Franz, WM, Berger, P, and Wang, JY. Deletion of an N-terminal regulatory domain of the c-abl tyrosine kinase activates its oncogenic potential. *EMBO J.* **1989** 8, 137-147.
- Gale RP, Horowitz MM, Ash RC, Champlin RE, Goldman JM, Rimm AA, Ringden O, Stone JA, Bortin MM. Identical-twin bone marrow transplants for leukemia. *Ann Intern Med.* **1994** 120(8), 646-52.
- Gartel AL, Tyner AL. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther.* **2002** 1(8), 639-49.
- Gartel AL, Tyner AL. Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp Cell Res.* **1999** 246(2), 280-9.
- Gesbert F, Griffin JD. Bcr/Abl activates transcription of the Bcl-X gene through STAT5. *Blood.* **2000** 96(6), 2269-76.

Gesbert F, Sellers WR, Signoretti S, Loda M, Griffin JD. BCR/ABL regulates expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 through the phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT pathway. *J Biol Chem.* **2000** 275(50), 39223-30.

Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, Sawyers CL. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science.* **2001** 293(5531), 876-80.

Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *PNAS* **1992**; 5547-5551

Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W, Bujard H. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science.* **1995** 268(5218), 1766-9.

Hariharan IK, Adams JM, Cory S. bcr-abl oncogene renders myeloid cell line factor independent: potential autocrine mechanism in chronic myeloid leukemia. *Oncogene Res.* **1988**; (4), 387-99.

Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell.* **1993** 75(4), 805-16.

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

Horita M, Andreu EJ, Benito A, Arbona C, Sanz C, Benet I, Prosper F, Fernandez-Luna JL. Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL. *J Exp Med.* **2000** 191(6), 977-84.

Horwitz SB. Mechanism of action of taxol. *Trends Pharmacol Sci.* **1992** 13(4), 134-6.

Ilaria RL Jr, Van Etten RA. P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *J Biol Chem.* **1996** 271(49), 31704-10.

Ilaria, RL, Jr., Hawley, RG, and Van Etten, RA. Dominant negative mutants implicate STAT5 in myeloid cell proliferation and neutrophil differentiation. *Blood* **1999** 93, 4154-4166.

Iolascon A, Della Ragione F, Giordani L, Serra A, Saglio G, Faienza MF. Expression of cell cycle regulatory genes in chronic myelogenous leukemia. *Haematologica* **1998** 83(9), 771-7.

Jamieson L, Carpenter L, Biden TJ, Fields AP. Protein kinase C $\alpha$  activity is necessary for Bcr-Abl-mediated resistance to drug-induced apoptosis. *J Biol Chem*. **1999** 274(7), 3927-30.

Jonuleit T, Peschel C, Schwab R, van der Kuip H, Buchdunger E, Fischer T, Huber C, Aulitzky WE. Bcr-Abl kinase promotes cell cycle entry of primary myeloid CML cells in the absence of growth factors. *Br J Haematol*. **1998** 100(2), 295-303.

Jonuleit T, van der Kuip H, Miething C, Michels H, Hallek M, Duyster J, Aulitzky WE. Bcr-Abl kinase down-regulates cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in human and murine cell lines. *Blood*. **2000** 96(5), 1933-9.

Kabarowski, JH, Allen, PB, and Wiedemann, LM. A temperature sensitive p210 BCR-ABL mutant defines the primary consequences of BCR-ABL tyrosine kinase expression in growth factor dependent cells. *EMBO J*. **1994** 13, 5887-5895.

Kapranos N, Stathopoulos GP, Manolopoulos L, Kokka E, Papadimitriou C, Bibas A, Yiotakis J, Adamopoulos G. p53, p21 and p27 protein expression in head and neck cancer and their prognostic value. *Anticancer Res*. **2001** 21(1B), 521-8.

Kasper B, Fruehauf S, Schiedlmeier B, Buchdunger E, Ho AD, Zeller WJ. Favorable therapeutic index of a p210(BCR-ABL)-specific tyrosine kinase inhibitor; activity on lineage-committed and primitive chronic myelogenous leukemia progenitors. *Cancer Chemother Pharmacol*. **1999** 44(5), 433-8.

Komiya T, Hosono Y, Hirashima T, Masuda N, Yasumitsu T, Nakagawa K, Kikui M, Ohno A, Fukuoka M, Kawase I. p21 expression as a predictor for favorable prognosis in squamous cell carcinoma of the lung. *Clin Cancer Res*. **1997** 3(10), 1831-5.

Konopka, JB, Watanabe, SM, and Witte, ON. An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell* **1984** 37, 1035-1042.

Korsmeyer SJ. Chromosomal translocations in lymphoid malignancies reveal novel proto-oncogenes. *Annu Rev Immunol*. **1992** 10, 785-807.

LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, Chou HS, Fattaey A, Harlow E. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev*. **1997** 11, 847-

862.

le Coutre P, Mologni L, Cleris L, Marchesi E, Buchdunger E, Giardini R, Formelli F, Gambacorti-Passerini C. In vivo eradication of human BCR/ABL-positive leukemia cells with an ABL kinase inhibitor. *J Natl Cancer Inst.* **1999** 91(2), 163-8.

le Coutre P, Tassi E, Varella-Garcia M, Barni R, Mologni L, Cabrita G, Marchesi E, Supino R, Gambacorti-Passerini C. Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification. *Blood* **2000** 95(5), 1758-66.

Li W, Fan J, Banerjee D, Bertino J. Overexpression of p21 waf1 decreases G2-M arrest and apoptosis induced by paclitaxel in human sarcoma cells lacking both p53 and functional Rb protein. *Mol Pharm* **1999** 55, 1088-1093

Li Y, Dowbenko D, Lasky LA. AKT/PKB phosphorylation of p21Cip/WAF1 enhances protein stability of p21Cip/WAF1 and promotes cell survival. *J Biol Chem.* **2002** 277(13), 11352-61.

Liu S, Bishop WR, Liu M. Differential effects of cell cycle regulatory protein p21(WAF1/Cip1) on apoptosis and sensitivity to cancer chemotherapy. *Drug Resist Updat.* **2003** 6(4), 183-95.

Mahon FX, Belloc F, Lagarde V, Chollet C, Moreau-Gaudry F, Reiffers J, Goldman JM, Melo JV. MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood.* **2003** 101(6), 2368-73.

Maki CG, Howley PM. Ubiquitination of p53 and p21 is differentially affected by ionizing and UV radiation. *Mol Cell Biol.* **1997** 17(1), 355-63.

Maki, CG, and Howley, PM. Ubiquitination of p53 and p21 is differentially affected by ionizing and UV radiation. *Mol Cell Biol* **1997** 17, 355-363.

Martin-Caballero J, Flores JM, Garcia-Palencia P, Serrano M. Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1)-deficient mice. *Cancer Res.* **2001** 61(16), 6234-8.

McGahon A, Bissonnette R, Schmitt M, Cotter KM, Green DR, Cotter TG. BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death. *Blood.* **1994** 83(5), 1179-87.

McKenzie KE, Siva A, Maier S, Runnebaum LB, Seshadri R, Sukumar S. Altered WAF1 genes do not play a role in abnormal cell cycle regulation in breast cancers lacking p53 mutations. *Clin. Cancer Res.* **1997**, 1669-1673.

Neshat MS, Raitano AB, Wang HG, Reed JC, Sawyers CL. The survival function of the Bcr-Abl oncogene is mediated by Bad-dependent and -independent pathways: roles for Phosphatidylinositol 3-kinase and Raf. *Mol Cell Biol.* **2000** 20(4), 1179-86.

Niculescu AB 3rd, Chen X, Smeets M, Hengst L, Prives C, Reed SI. Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol.* **1998** 18(1), 629-43.

Nishii K, Kabarowski JH, Gibbons DL, Griffiths SD, Titley I, Wiedemann LM, Greaves MF. ts BCR-ABL kinase activation confers increased resistance to genotoxic damage via cell cycle block. *Oncogene* **1996** 13(10), 2225-34.

NoWell, PC, and Hungerford, DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst* **1960** 25, 85-109.

Ogryzko VV, Wong P, Howard BH. WAF1 retards S-phase progression primarily by inhibition of cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol.* **1997** 17(8), 4877-82.

Parada Y, Banerji L, Glassford J, Lea NC, Collado M, Rivas C, Lewis JL, Gordon MY, Thomas NS, Lam EW. BCR-ABL and interleukin 3 promote haematopoietic cell proliferation and survival through modulation of cyclin D2 and p27Kip1 expression. *J Biol Chem.* **2001** 276(26), 23572-80.

Paramio JM, Segrelles C, Ruiz S, Martin-Caballero J, Page A, Martinez J, Serrano M, Jorcano JL. The ink4a/arf tumor suppressors cooperate with p21cip1/waf in the processes of mouse epidermal differentiation, senescence, and carcinogenesis. *J Biol Chem.* **2001** 276(47), 44203-11.

Patino-Garcia A, Sotillo-Pineiro E, Sierrasesumaga-Ariznabarreta. p21 WAF1 mutation is not a predominant alteration in pediatric bone tumors. *Pediatr. Res.* **1998**; 393-395.

Pendergast, AM, Muller, AJ, Havlik, MH, Maru, Y, and Witte, ON. BCR sequences essential for transformation by the BCR-ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner. *Cell* **1991** 66, 161-171.

Philipp J, Vo K, Gurley KE, Seidel K, Kemp CJ. Tumor suppression by p27Kip1 and p21Cip1 during chemically induced skin carcinogenesis. *Oncogene* **1999** 18(33), 4689-98.

Pierce, A., Owen-Lynch, P. J., Spooncer, E., Dexter, T. M., und Whetton, A. D. p210 Bcr-Abl expression in a primitive multipotent haematopoietic cell line models the development of chronic myeloid leukaemia. *Oncogene* **1998** 17, 667 - 672.

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

Roninson IB. Oncogenic functions of tumour suppressor p21(Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Lett.* **2002** 179(1), 1-14.

Rössig L, Amir S, Jadidi, Carmen Urbich, Cornel Badorff, Andreas M. Zeiher, and Stefanie Dimmeler. Akt-dependent phosphorylation of p21(Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells. *Mol Cell Biol.* **2001** 21(16), 5644-57.

Roumiantsev S, Shah NP, Gorre ME, Nicoll J, Brasher BB, Sawyers CL, Van Etten RA. Clinical resistance to the kinase inhibitor STI-571 in chronic myeloid leukemia by mutation of Tyr-253 in the Abl kinase domain P-loop. *PNAS* **2002** 99(16), 10700-5.

Rowley. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining. *Nature* **1997** 243, 290 - 293.

Salloukh HF, Laneuville P. Increase in mutant frequencies in mice expressing the BCR-ABL activated tyrosine kinase. *Leukemia* **2000** 14(8), 1401-4.

Sanchez-Garcia I, Grutz G. Tumorigenic activity of the BCR-ABL oncogenes is mediated by BCL2. *PNAS* **1995** 92(12), 5287-91.

Sanchez-Garcia I, Martin-Zanca D. Regulation of Bcl-2 gene expression by BCR-ABL is mediated by Ras. *J Mol Biol.* **1997** 267(2), 225-8.

Sawyers, CL. Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999 340, 1330-1340. Waga, S, Hannon, GJ, Beach, D, and Stillman, B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* **1994** 369, 574-578.

Sawyers, CL. Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999 340, 1330-1340. Waga, S, Hannon, GJ, Beach, D, and Stillman, B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 1994 369, 574-578.

Schuster C, Forster K, Dierks H, Elsasser A, Behre G, Simon N, Danhauser-Riedl S, Hallek M, Warmuth M. The effects of Bcr-Abl on C/EBP transcription-factor regulation and neutrophilic differentiation are reversed by the Abl kinase inhibitor imatinib mesylate. *Blood* 2003 101(2), 655-63.

Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, Gorre ME, Paquette RL, Kuriyan J, Sawyers CL. 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*. 2002 2(2), 117-25.

Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev*. 1995 9(10), 1149-63.

Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996 274(5293), 1672-7.

Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. 1999 13(12), 1501-12.

Shim J, Lee H, Park J, Kim H, Choi EJ. A non-enzymatic p21 protein inhibitor of stress-activated protein kinases. *Nature* 1996 381(6585), 804-6.

Shiohara M, El Deiry WS, Wada M, Nakamaki S, Takeuchi S, Yang R, Chen DL, Vogelstein B, Koeffler HP. Absence of WAF1 mutations in a variety of human malignancies. *Blood* 1994; 3781-3784

Sillaber C, Gesbert F, Frank DA, Sattler M, Griffin JD. STAT5 activation contributes to growth and viability in Bcr/Abl-transformed cells. *Blood* 2000 95(6), 2118-25.

Skorski T, Kanakaraj P, Nieborowska-Skorska M, Ratajczak MZ, Wen SC, Zon G, Gewirtz AM, Perussia B, Calabretta B. Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. *Blood* 1995 86(2), 726-36.

Skorski T. BCR/ABL regulates response to DNA damage: the role in resistance to genotoxic treatment and in genomic instability. *Oncogene* 2002 21(56), 8591-604.



Slupianek A, Hoser G, Majsterek I, Bronisz A, Malecki M, Blasiak J, Fishel R, Skorski T. Fusion tyrosine kinases induce drug resistance by stimulation of homology-dependent recombination repair, prolongation of G(2)/M phase, and protection from apoptosis. *Mol Cell Biol.* **2002** 22(12), 4189-201.

Steinman RA. Cell cycle regulators and hematopoiesis. *Oncogene* **2002** 21(21), 3403-13.

Suzuki A, Tsutomi Y, Akahane K, Araki T, Miura M. Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21WAF1 and IAP gene family ILP. *Oncogene* 17(8), 931-9.

Tian H, Wittmack EK, Jorgensen TJ. p21 Waf1/Cip1 antisense therapy radiosensitizes human colon cancer by converting growth arrest to apoptosis. *Cancer Research* **2000** 60, 679-684

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

von Bubnoff N, Schneller F, Peschel C, Duyster J. BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia-chromosome-positive leukaemia to STI571: a prospective study. *Lancet* **2002** 359(9305), 487-91.

Warmuth M, Bergmann M, Priess A, Hauslmann K, Emmerich B, Hallek M. The Src family kinase Hck interacts with Bcr-Abl by a kinase-independent mechanism and phosphorylates the Grb2-binding site of Bcr. *J Biol Chem.* **1997** 272(52), 33260-70.

Warmuth M, Danhauser-Riedl S, Hallek M. Molecular pathogenesis of chronic myeloid leukemia: implications for new therapeutic strategies. *Ann Hematol.* **1999** 78(2), 49-64.

Warmuth M, Simon N, Mitina O, Mathes R, Fabbro D, Manley PW, Buchdunger E, Forster K, Moarefi I, Hallek M. Dual-specific Src and Abl kinase inhibitors, PP1 and CGP76030, inhibit growth and survival of cells expressing imatinib mesylate-resistant Bcr-Abl kinases. *Blood* **2003** 101(2), 664-72.

Xu SQ, El-Deiry WS. p21(WAF1/CIP1) inhibits initiator caspase cleavage by TRAIL death receptor DR4. *Biochem Biophys Res Commun.* **2000** 269(1), 179-90.

Yu D, Jing T, Liu B, Yao J, Tan M, McDonnell TJ, Hung MC. Overexpression of ErbB2 blocks Taxol-induced apoptosis by upregulation of p21Cip1, which inhibits p34Cdc2 kinase. *Mol Cell* **1998** 2(5), 581-91.

Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol.* **2001** 3(3), 245-52.

Zirbes TK, Baldus SE, Moenig SP, Nolden S, Kunze D, Shafizadeh ST, Schneider PM, Thiele J, Hoelscher AH, Dienes HP. Prognostic impact of p21/waf1/cip1 in colorectal cancer. *Int J Cancer* **2000** 89(1), 14-8.

## 8 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Karin Forster  
Geburtsdatum und -ort: 26.01.1973 in Kösching

### Schulbildung

Sept. 1979 – Juli 1983 Grundschule in Tacherting  
Sept. 1983 – Juli 1992 Gymnasium in Trostberg, Abschluss: Abitur, Note: 1,6

### Studium

Okt.1992 – März 1997 Studium der Diplom-Biologie an der Universität Erlangen-Nürnberg  
April 1997 – März 1998 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Erlangen-Nürnberg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Hillen,  
Thema: „Konstruktion und Charakterisierung von eukaryontischen Genexpressionskassetten mit reduziertem Basalniveau“, Note: „sehr gut“ (1,0)  
März 1998 Erwerb des Diploms in Biologie, Gesamtnote: „sehr gut“ (1,0)

### Praktische Tätigkeit

Okt. 1994 Industriepraktikum, Abteilung Forschung und Entwicklung von Naturstoffen, Degussa in Trostberg, Betreuer: Dr. J. Heidlas  
April 1998 – März 1999 Genzentrum der LMU München, Arbeitsgruppe Prof. Dr. R. Baumeister, Thema: „Das Tetracyclin-induzierbare Genexpressionssystem für die Genregulation im Nematoden *C. elegans*.“

### Promotion

seit April 1999 Promotion am Institut für Biochemie, Lehrstuhl für Chemie/Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Hallek,  
Thema: „Untersuchung der biologischen Effekte des Zellzyklusregulators p21<sup>Waf1/Cip1</sup> auf Proliferation und Apoptose Philadelphia-positiver Leukämien.“

### Stipendien

Promotionsstipendium des Boehringer Ingelheim Fonds

## Publikationen

“The cell cycle regulatory protein p21 (Waf1/Cip1) attenuates both proliferation and drug-induced apoptosis in Bcr-Abl transformed murine bone marrow cells.” **Forster K**, Obermeier A, Mitina O, Simon N, Warmuth M, Hallek M. *Manuskript eingereicht*

“The effects of Bcr-Abl on C/EBP transcription-factor regulation and neutrophilic differentiation are reversed by the Abl kinase inhibitor imatinib mesylate.” Schuster C, **Forster K**, Dierks H, Elsässer A, Behre G, Simon N, Danhauser-Riedl S, Hallek M, Warmuth M. *Blood* **2003** Jan 15;101(2): 655-63

“Dual-specific Src and Abl kinase inhibitors, PP1 and CGP76030, inhibit growth and survival of cells expressing imatinib mesylate-resistant Bcr-Abl kinases.” Warmuth M, Simon N, Mitina O, Mathes R, Fabbro D, Manley PW, Buchdunger E, **Forster K**, Moarefi I, Hallek M. *Blood* **2003** Jan 5; 101(2): 664-72

“Tetracycline-inducible expression systems with reduced basal activity in mammalian cells.” **Karin Forster**, Vera Helbl, Thomas Lederer, Stefanie Urlinger, Nicole Wittenburg and Wolfgang Hillen. *Nucleic Acid Research* **1999**, Vol. 27, 2

“Improvement of Microbiological Quality of Foodstuffs by Propane Extraction Processes.” Sylvia Kreuth, **Karin Forster** and Jürgen Heidlas. *Food Marketing and Technology* **1995**, Vol.9, No. 1. Feb.

## Präsentationen auf internationalen Kongressen

“The cell cycle regulatory protein p21 (Waf1/Cip1) acts as a shock absorber by attenuating both drug-induced apoptosis and proliferation in Bcr-Abl transformed murine bone marrow cells.” *K. Forster, Posterpräsentation auf dem Kongress “Annual Meeting of the American Society of Hematology”, Dez. 2003, San Diego, CA, USA*

“The loss of the cyclin dependent kinase inhibitor p21 (Waf1/Cip1) sensitizes Bcr-Abl transformed hematopoietic cells to STI571 (Gleevec®).” *K Forster, Vortrag auf der Jahrestagung der Deutsch-Österreichisch-Schweizerischen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie, Okt. 2003, Basel, Schweiz*

“The cell cycle regulator p21 Waf1/Cip1: An absorber for proliferation and drug-induced apoptosis in Bcr-Abl transformed hematopoietic cells.” *K Forster, Posterpräsentation auf dem Kongress “Oncogenes and Growth Control”, Aug. 2003, La Jolla, CA, USA*

“Establishment of the Tetracycline-inducible system for gene regulation in the nematode *C. elegans*.” *K Forster, Posterpräsentation auf dem Europäischen C. elegans-Kongress, Sanger Center, 1998, Cambridge, Großbritannien*