

**β-Catenin:  
Studien zur onkogenen Stabilisierung in der  
akuten myeloischen Leukämie und  
zu WNT Signalweg unabhängigen Funktionen  
im hämatopoetischen System**

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld

vorgelegt von

**Sina Hehn**

- Bielefeld/Frankfurt am Main · März 2011 -



Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Uwe Manthe

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Dierks

Universität Bielefeld  
Fakultät für Chemie  
Biochemie I  
Universitätsstraße 25  
33615 Bielefeld

2. Gutachter: Prof. Dr. Hubert Serve

Universitätsklinikum Frankfurt  
Zentrum der inneren Medizin, ZIM II  
Hämatologie/Onkologie  
Theodor-Stern-Kai 7  
60590 Frankfurt am Main



Teile dieser Arbeit wurden publiziert in:

Tickenbrock L, **Hehn S**, Sargin B, Evers G, Ng PR, Choudhary C, Berdel WE, Müller-Tidow C, Serve H. (2008) Activation of Wnt signaling in cKit-ITD mediated transformation and imatinib sensitivity in acute myeloid leukemia. *Int J Hematol*, **88**, 174-180.

Tickenbrock L, **Hehn S**, Sargin B, Choudhary C, Bäumer N, Buerger H, Schulte B, Müller O, Berdel WE, Müller-Tidow C, Serve H. (2008) Activation of Wnt signalling in acute myeloid leukemia by induction of Frizzled-4. *Int J Oncol*, **33**, 1215-1221.



*Wenn man studiert ... ist Wissenschaft neu und wunderbar,  
und alles, was bekannt ist, wird so aufgenommen,  
als habe man es schon immer gewußt.*

*Erst viel später,  
nach jahrelanger Forschung mit fehlgeschlagenen und gelungenen Experimenten,  
mit falschen Spuren, überraschenden Ergebnissen und Augenblicken echter Erkenntnis  
wird einem klar, wie hart man sich jedes Körnchen Wissen erarbeiten muß,  
wie jeder Fortschritt sich auf die gesammelten Fortschritte der Vergangenheit gründet,  
wie jedes Experiment ein Teil des fortlaufenden Stromes der Wissenschaft ist,  
ein Teil des wachsenden Schatzes menschlichen Wissens,  
das uns aus der Dunkelheit geführt hat.*

ROBERT L. SINSHEIMER



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT .....</b>	<b>3</b>
<b>3. EINLEITUNG .....</b>	<b>5</b>
3.1. AKUTE MYELOISCHE LEUKÄMIE.....	5
3.1.1. <i>Das „Two-Hit“ Modell der AML.....</i>	7
3.1.2. <i>Die hämatopoetischen Rezeptortyrosinkinasen KIT und FLT3.....</i>	7
3.1.2.1. <i>KIT und FLT3 Mutationen in der Leukämie.....</i>	9
3.2. WNT SIGNALTRANSDUKTION.....	10
3.2.1. <i>Der kanonische WNT Signalweg.....</i>	11
3.2.2. <i>WNT Signaltransduktion in der AML .....</i>	13
3.2.3. <i>Frizzled 4 .....</i>	15
3.2.4. <i>β-Catenin .....</i>	17
3.2.4.1. <i>β-Catenin Funktionen im Zellzyklus und in der Mitose .....</i>	19
<b>4. ZIEL DER ARBEIT .....</b>	<b>21</b>
<b>5. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>23</b>
5.1. MATERIAL.....	23
5.1.1. <i>Chemikalien.....</i>	23
5.1.2. <i>Lösungen und Puffer.....</i>	23
5.1.3. <i>Sonstige Materialien .....</i>	25
5.1.4. <i>Antikörper.....</i>	26
5.1.5. <i>Enzyme und rekombinante Proteine .....</i>	27
5.1.6. <i>Vektoren und cDNA.....</i>	27
5.1.7. <i>Oligonukleotide.....</i>	28
5.1.8. <i>Bakterienstämme .....</i>	30
5.1.9. <i>Zelllinien .....</i>	31
5.1.10. <i>Medien .....</i>	32
5.1.11. <i>Geräte.....</i>	32
5.1.12. <i>Software.....</i>	33

5.2.	METHODEN .....	34
5.2.1.	<i>Molekularbiologische Methoden</i> .....	34
5.2.1.1.	Herstellung chemokompetenter Bakterienzellen .....	34
5.2.1.2.	Transformation von kompetenten Bakterienzellen .....	34
5.2.1.3.	Plasmidpräparation aus Bakterienzellen.....	34
5.2.1.4.	Polymerasekettenreaktion.....	34
5.2.1.5.	Restriktionsverdau.....	35
5.2.1.6.	Ligation.....	36
5.2.1.7.	Zielgerichtete Mutagenese .....	36
5.2.1.8.	DNA Sequenzierung .....	37
5.2.1.9.	Gateway-Klonierung.....	37
5.2.1.10.	Agarosegelelektrophorese .....	37
5.2.1.11.	Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen.....	38
5.2.1.12.	RNA Isolierung .....	38
5.2.1.13.	DNase Behandlung und reverse Transkription.....	38
5.2.1.14.	Real-Time PCR.....	39
5.2.1.15.	Luziferaseassay.....	40
5.2.2.	<i>Zellbiologische Methoden</i> .....	41
5.2.2.1.	Kultivierung von Suspensionszellen .....	41
5.2.2.2.	Kultivierung von adhärenenten Zellen .....	41
5.2.2.3.	Gewinnung von WEHI Überstand (10 × WEHI) .....	41
5.2.2.4.	Gewinnung von Kontroll konditioniertem und WNT3A konditioniertem Medium.....	42
5.2.2.5.	Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen.....	42
5.2.2.6.	Calciumphosphat Transfektion.....	42
5.2.2.7.	Herstellung retroviraler Überstände.....	43
5.2.2.8.	Infektion muriner Zellen mit retroviralen Überständen.....	43
5.2.2.9.	Durchflußzytometrische Analysen (FACS Analyse) .....	43
5.2.2.10.	Elektroporation von 32D Zellen .....	44
5.2.2.11.	Kolonieassay .....	44
5.2.2.12.	Zytozentrifugation.....	45
5.2.2.13.	Isolation von murinem Knochenmark .....	45
5.2.3.	<i>Proteinbiochemische Methoden</i> .....	46
5.2.3.1.	Immunfluoreszenzfärbung.....	46
5.2.3.2.	Herstellung von Proteinlysaten aus Zelllinien.....	46
5.2.3.3.	Herstellung von Proteinlysaten aus Mausgewebe .....	47
5.2.3.4.	Bestimmung der Proteinkonzentration (BCA Test) .....	47
5.2.3.5.	Immunopräzipitation .....	47
5.2.3.6.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	47
5.2.3.7.	Westernblotting.....	48
5.2.3.8.	Expression von GST-Fusionsproteinen.....	48
5.2.3.9.	CBB Färbung von Polyacrylamidgelen.....	49
5.2.3.10.	GST Pull-down.....	50
5.2.3.11.	<i>In vitro</i> Transkription und Translation.....	50
5.2.3.12.	Kinaseassay .....	51
6.	ERGEBNISSE.....	53
6.1.	AKTIVIERUNG DES WNT SIGNALWEGS DURCH INDUKTION VON FRIZZLED 4 IN DER AML.....	53
6.1.1.	<i>Blasten von AML Patienten exprimieren Frizzled 4 mRNA</i> .....	53
6.1.2.	<i>Frizzled 4 Färbung von Gewebearrays</i> .....	54
6.1.3.	<i>FZD4 wird in verschiedenen Zelllinien exprimiert</i> .....	55
6.1.4.	<i>In AML Blasten wird Frizzled 4 Protein hoch exprimiert</i> .....	56
6.1.5.	<i>Eine mittlere FZD4 Expression korreliert mit einem schlechteren Gesamtüberleben</i> .....	57
6.1.6.	<i>Stabile Expression von Frizzled 4 in 32D Zellen</i> .....	58
6.1.7.	<i>WNT3A abhängige Aktivierung des kanonischen WNT Signalwegs durch FZD4</i> .....	60

6.2.	DIE ONKOGENE REZEPTORTYROSINKINASE KIT-ITD AKTIVIERT DEN KLASSISCHEN WNT SIGNALWEG .....	63
6.2.1.	<i>Stabile Expression von KIT wt und KIT-ITD in 32D Zellen.....</i>	63
6.2.2.	<i>KIT-ITD induziert die Expression von Frizzled 4.....</i>	64
6.2.3.	<i>KIT-ITD erhöht die Stabilität des <math>\beta</math>-Catenin Proteins .....</i>	65
6.2.4.	<i>TCF4 abhängige Aktivierung des c-Myc Promotors durch ITD.....</i>	66
6.2.5.	<i>Dominant negatives TCF4 inhibiert klonales Wachstum ITD transformierter Zellen .....</i>	67
6.2.6.	<i>ITD reprimiert die Expression von <math>\beta</math>-Catenin mRNA.....</i>	69
6.2.7.	<i>Stabilisierung von <math>\beta</math>-Catenin durch ITD abhängige GSK3 Inhibition.....</i>	71
6.2.8.	<i>Inhibition onkogener RTK Aktivität beeinträchtigt die <math>\beta</math>-Catenin Stabilität und erniedrigt die GSK3 Phosphorylierung .....</i>	72
6.2.9.	<i>In 32D KIT-ITD ist <math>\beta</math>-Catenin an aminoterminalen, regulatorischen Resten phosphoryliert.....</i>	75
6.3.	$\beta$ -CATENIN IST EIN NEUES SUBSTRAT VON AURORA KINASE B .....	78
6.3.1.	<i>Phospho-<math>\beta</math>-Catenin bindet an mitotische Strukturen.....</i>	78
6.3.1.1.	<i>Phospho-<math>\beta</math>-Catenin (S33/37/T41) ist an den Zentrosomen lokalisiert.....</i>	78
6.3.1.2.	<i>Phospho-<math>\beta</math>-Catenin (T41/S45) bindet an Kinetochore .....</i>	80
6.3.2.	<i>Klonierung und Mutagenese von EGFP-<math>\beta</math>-Catenin für die Infektion myeloischer Vorläuferzellen .....</i>	82
6.3.3.	<i>Expression von EGFP-<math>\beta</math>-Catenin wt und Mutanten in 32D Zellen.....</i>	84
6.3.4.	<i><math>\beta</math>-Catenin Assoziation mit subzellulären Strukturen geht der N-terminalen Phosphorylierung voraus.....</i>	86
6.3.5.	<i>In der Mitose colokalisiert phospho-<math>\beta</math>-Catenin mit Aurora Kinase B.....</i>	88
6.3.6.	<i>AIM1 Expression im hämatopoetischen System.....</i>	91
6.3.7.	<i>Aurora Kinase B interagiert mit <math>\beta</math>-Catenin.....</i>	92
6.3.7.1.	<i>Aurora Kinase B interagiert mit <math>\beta</math>-Catenin unabhängig vom Phosphorylierungsstatus der aminoterminalen Domäne .....</i>	94
6.3.7.2.	<i>AIM1 bindet an die aminoterminalen Hälfte von <math>\beta</math>-Catenin .....</i>	94
6.3.8.	<i>Aurora Kinase B phosphoryliert <math>\beta</math>-Catenin.....</i>	95
6.4.	$\beta$ -CATENIN INTERAGIERT MIT DEM WD40 PROTEIN RACK1.....	97
6.4.1.	<i>In vitro transkribierte und translatierte Proteine binden <math>\beta</math>-Catenin .....</i>	97
6.4.2.	<i>Die Armadillo Domäne von <math>\beta</math>-Catenin interagiert mit CapZ<math>\alpha</math>2 und Rack1 in vitro .....</i>	98
6.4.3.	<i><math>\beta</math>-Catenin und Rack1 sind in vivo Bindungspartner.....</i>	99
7.	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>101</b>
7.1.	DIE ROLLE VON FZD4 IN DER PATHOGENESE DER AML .....	102
7.2.	WNT SIGNALTRANSDUKTION ALS MEDIATOR ITD VERMITTELTER LEUKÄMISCHER TRANSFORMATION .....	105
7.3.	IDENTIFIKATION NEUER INTERAKTIONSPARTNER BRINGT $\beta$ -CATENIN IN VERBINDUNG MIT MITOSE.....	108
8.	<b>LITERATUR .....</b>	<b>115</b>
9.	<b>ANHANG .....</b>	<b>I</b>
	ABKÜRZUNGEN .....	III
	DANKSAGUNG .....	IX
	CURRICULUM VITAE .....	XI



# 1. ZUSAMMENFASSUNG

Deregulation des evolutionär konservierten klassischen WNT Signalwegs wurde in einer Vielzahl von Krebserkrankungen identifiziert. Hierzu gehört auch die akute myeloische Leukämie (AML), eine maligne Erkrankung der myeloischen Entwicklungsreihe des blutbildenden Systems. Kennzeichen aktiver WNT Signaltransduktion ist die Akkumulation des multifunktionalen Proteins  $\beta$ -Catenin, das als obligatorischer Transkriptionsaktivator dieser Kaskade fungiert und durch AML assoziierte Mutationen aberrant stabilisiert wird. Dies konnte unter anderem für die interne Tandemduplikation (ITD) der hämatopoetischen Rezeptortyrosinkinase (RTK) FLT3 gezeigt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Mechanismen untersucht, die zur onkogenen Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin in der AML führen.

Dabei konnte zum einen unter Verwendung eines Gewebearrays eine deutlich erhöhte Expression des WNT Rezeptors Frizzled 4 (FZD4) im Knochenmark von AML Patienten im Vergleich zu normalem Knochenmark nachgewiesen werden. In der Untersuchung wurde FZD4 Protein in 82,5 % der analysierten AML Knochenmärker (118/143) und im Gegensatz dazu in nur 7 % der Proben gesunder Spender (2/30) detektiert. Funktionell führte die Expression von FZD4 in einem myeloischen Zellkulturmodell zu einer WNT3A abhängigen, DKK1 sensitiven  $\beta$ -Catenin Akkumulation. In diesem Zusammenhang konnte FZD4 als spezifischer Rezeptor von WNT3A identifiziert werden.

Zum anderen wurde eine neuartige, aberrante Verknüpfung zwischen ITD vermittelter Signaltransduktion und der klassischen WNT Signalkaskade charakterisiert. Zu diesem Zweck wurde zunächst der Einfluss der seltenen ITD Mutation der FLT3 verwandten RTK KIT auf den WNT Signalweg untersucht. Ektopische Expression von KIT-ITD in der myeloischen Progenitorzelllinie 32D induzierte die Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin und aktivierte die TCF abhängige Transkription des WNT Zielgens c-Myc. Gleichzeitige

Transfektion mit einer dominant-negativen Variante von TCF4 hemmte hingegen das Kolonienwachstum KIT-ITD transformierter Zellen. Die Akkumulation von  $\beta$ -Catenin konnte in FLT3- und KIT-ITD exprimierenden Zellen auf einen gemeinsamen, posttranskriptionellen Mechanismus zurückgeführt werden. Beide onkogenen RTKs induzierten die inhibitorische Phosphorylierung der  $\beta$ -Catenin regulierenden Kinase GSK3, die durch Behandlung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor PKC412 reversiert werden konnte.

Im kanonischen WNT Signalweg sowie *downstream* von bekannten Onkogenen der AML aktiviert stabilisiertes  $\beta$ -Catenin die Transkription von WNT Zielgenen. Daneben spielt das Protein aber auch eine Rolle in der Zelladhäsion und wurde mit der Organisation der Zentrosomen in Verbindung gebracht.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass aminoterminal phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin in der Mitose nicht degradiert wird, sondern in Abhängigkeit von seinem Phosphorylierungsmuster unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen aufweist. Phospho- $\beta$ -Catenin (T41/S45) konnte mit Aurora Kinase B (AIM1) colokalisiert werden, einer mitotischen Kinase, die in Microarray Analysen von AML Blasten im Vergleich zu gesunden CD34 positiven Vorläuferzellen signifikant überexprimiert war. Mittels GST Pull-down Experimenten wurde die Bindung von AIM1 und  $\beta$ -Catenin nachgewiesen und  $\beta$ -Catenin konnte als neues Substrat der Kinase identifiziert werden. Die *in vivo* Verifizierung einer weiteren Interaktion zwischen  $\beta$ -Catenin und Rack1, einem Adapterprotein mit vielfältigen Aufgaben, das zuvor als potentieller Bindungspartner von  $\beta$ -Catenin in einem *yeast two hybrid screen* gefunden worden war, unterstreicht die multifunktionale Rolle von  $\beta$ -Catenin im hämatopoetischen System, die über seine Funktion als Transkriptionsaktivator des WNT Signalwegs hinausgeht.

Zusammengenommen erlauben die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten neue Einblicke in die Regulation und Funktionsweise von  $\beta$ -Catenin im hämatopoetischen System sowie in der AML. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie veranschaulichen darüber hinaus die zentrale Rolle von  $\beta$ -Catenin in der Leukämieentstehung und als potentielles Zielprotein für die Entwicklung neuer Therapien.

## 2. ABSTRACT

Deregulation of the highly conserved canonical WNT signaling pathway has been found in a variety of cancers including acute myeloid leukemia (AML), a malignant disease of the myeloid lineages of the blood. A hallmark of active WNT signal transduction is the accumulation of the multifunctional protein  $\beta$ -Catenin which serves as obligatory transcriptional activator of this cascade.  $\beta$ -Catenin is aberrantly stabilized by AML associated mutations such as the internal tandem duplication (ITD) of the hematopoietic receptor tyrosine kinase (RTK) FLT3. The present study focuses on mechanisms leading to the oncogenic stabilization of  $\beta$ -Catenin in AML.

Analysis of tissue arrays revealed an increased expression of the WNT receptor Frizzled 4 (FZD4) in AML bone marrow compared to normal bone marrow. The immunostaining detected FZD4 protein in 82.5 % of biopsies from AML patients (118/143), but it was only found in 7 % of samples from healthy donors (2/30). Functionally, the expression of FZD4 induced a WNT3A-dependent, DKK1-sensitive  $\beta$ -Catenin accumulation in a myeloid cell line model. In this context the specific interaction of FZD4 and WNT3A could be demonstrated.

In addition a novel and aberrant interconnection between ITD-mediated signal transduction and the canonical WNT pathway was characterized by analyzing the effect of the oncogenic FLT3-related RTK KIT-ITD on WNT signaling. Ectopic expression of KIT-ITD in the myeloid progenitor cell line 32D induced the stabilization of  $\beta$ -Catenin and activated TCF-dependent transcription of the well-known WNT target gene c-Myc. By contrast, cotransfection with dominant-negative TCF4 inhibited the colony formation of KIT-ITD transformed cells. Accumulation of  $\beta$ -Catenin could be attributed to a common, posttranscriptional mechanism in FLT3- and KIT-ITD expressing cells. Both of these oncogenic RTKs induced the inhibition of the  $\beta$ -Catenin regulating kinase GSK3 by

phosphorylation, which could be reversed by treatment with the tyrosine kinase inhibitor PKC412.

$\beta$ -Catenin activates the transcription of WNT target genes downstream of Frizzled receptors and AML associated oncogenes, respectively. Besides that it plays an important role in cell adhesion and was linked to a centrosomal function.

Here, phosphorylated  $\beta$ -Catenin typically targeted for proteosomal degradation was shown to display distinct subcellular localizations in mitosis depending on its phosphorylation pattern. Phospho- $\beta$ -Catenin (T41/S45) colocalized with Aurora kinase B (AIM1) at the kinetochores of condensed chromosomes. This mitotic kinase was significantly overexpressed in AML blasts compared to normal CD34 positive progenitor cells and was identified as a novel  $\beta$ -Catenin interaction partner. Furthermore, AIM1 was able to phosphorylate  $\beta$ -Catenin *in vitro*. Together with the finding that  $\beta$ -Catenin *in vivo* also binds to the adapter protein Rack1, that was initially identified as a potential  $\beta$ -Catenin interaction partner in a yeast two hybrid screen, these results emphasize the multifunctional role of  $\beta$ -Catenin in the hematopoietic system.

In conclusion, the present work shows novel regulatory mechanisms and functions of  $\beta$ -Catenin in the hematopoietic system and in AML. Besides this, the study indicates a central role for  $\beta$ -Catenin in leukemogenesis and as a potential target for the development of new therapeutic strategies.

# 3. EINLEITUNG

Die Entstehung und Entwicklung multizellulärer Organismen sowie die Homöostase adulter Gewebe beruhen auf einer strikten Kontrolle von Proliferation, Differenzierung und Apoptose jeder einzelnen Zelle. Die Regulation dieser Prozesse erfolgt durch eine Vielzahl externer Signale, die von den Zellen über membranständige Rezeptoren registriert und an das Innere der Zellen weitergeleitet werden. Hier werden die Signale mit Hilfe von Signaltransduktionskaskaden potenziert und in eine Zellantwort umgesetzt. Um die verschiedenen Informationen, die Zellen gleichzeitig erreichen, verarbeiten zu können, sind viele Signalwege miteinander vernetzt oder können sich gegenseitig regulatorisch beeinflussen. Daher können Mutationen und Deregulationen einzelner Komponenten der Signalkaskaden dazu führen, dass neue Vernetzungen zwischen Signalwegen entstehen und Kaskaden aberrant aktiviert werden.

## 3.1. Akute myeloische Leukämie

Die Hämatopoese ist ein komplexer Vorgang, bei dem aus einer begrenzten Anzahl pluripotenter hämatopoetischer Stammzellen (HSC) reife Blutzellen aller myeloischen und lymphatischen Entwicklungslinien entstehen. Im gesunden Knochenmark wird dieser Prozess durch verschiedene Zytokine und Transkriptionsfaktoren reguliert, die die Expression linienspezifischer Gene aktivieren und Proliferation sowie Differenzierung einleiten. Durch maligne Transformation einer Vorläuferzelle kann die Kontrolle dieses Prozesses verloren gehen und Blutkrebs entstehen.

Eine Form des Blutkrebses, die akute myeloische Leukämie (AML), ist eine aggressive und bösartige Erkrankung der myeloischen Entwicklungsreihe des blutbildenden Systems.

Hierbei führt die klonale Proliferation differenzierungsgestörter Vorläuferzellen zur Anreicherung funktionell unreifer leukämischer Blasten im Knochenmark und peripheren Blut, die nach und nach die normale Hämatopoese verdrängen<sup>1</sup>. AML gilt mit einem Altersmedian von 60 Jahren als Krankheit der älteren Menschen<sup>2</sup>. Sie tritt mit einer Häufigkeit von zwei bis drei Erkrankungen/100000 Einwohnern auf und ist damit die häufigste Subform akuter Leukämien im Erwachsenenalter<sup>3</sup>.

Da AML eine Erkrankung mit großer klinischer und biologischer Heterogenität ist, wurde 1976 die *French-American-British* (FAB) Klassifizierung eingeführt, die eine AML anhand morphologischer und zytochemischer Eigenschaften der leukämischen Blasten diagnostiziert und einteilt<sup>4, 5</sup>. Später wurde die FAB Klassifizierung von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) überarbeitet und durch die Einteilung in nur vier therapierelevante Hauptgruppen vereinfacht (Tabelle 1)<sup>6, 7</sup>. Neben morphologischen Merkmalen werden bei der WHO Klassifizierung auch immunphänotypische, genetische und klinische Besonderheiten berücksichtigt.

**Tabelle 1: WHO Klassifizierung der akuten myeloischen Leukämie.** (t: Translokation; *AML1*: acute myeloid leukemia 1 protein; *ETO*: eighty-twenty-one; *PML*: promyelocytic leukemia protein; *RARα*: Retinolsäurerezeptor α; inv: Inversion; *CBFβ*: core binding factor β; *MYH11*: myosin, heavy chain 11; *MLL*: mixed lineage leukemia protein-1)

#### AML mit spezifischen zytogenetischen Veränderungen

AML mit Translokation t(8;21)(q22;q22), *AML1/ETO*  
 Akute Promyelozytenleukämie (APL) (AML mit t(15;17)(q22;q11-12), *PML/RARα* und Varianten (FAB M3))  
 AML mit abnormen Eosinophilen im Knochenmark (inv(16)(p13q22) oder t(16;16)(p13;q22), *CBFβ/MYH11*)  
 AML mit 11q23(*MLL*)-Anomalien

#### AML mit multilineärer Dysplasie

mit vorausgegangenem myelodysplastischen/myeloproliferativen Syndrom  
*de novo* AML ohne vorausgegangen Syndrom

#### AML und myelodysplastisches Syndrom (MDS), therapieassoziiert

assoziiert mit alkylierenden Substanzen  
 assoziiert mit Epidopophyllotoxin (Topoisomerase II Inhibitor)  
 andere

#### AML, nicht anderweitig klassifiziert

AML mit minimaler Differenzierung (FAB M0)  
 AML ohne Ausreifung (FAB M1)  
 AML mit Ausreifung (FAB M2)  
 akute myelomonozytäre Leukämie (FAB M4)  
 akute monozytäre Leukämie (FAB M5a,b)  
 akute Erythroleukämie (FAB M6)  
 akute Megakaryoblastenleukämie (FAB M7)  
 akute Basophilenleukämie  
 akute Panmyelose mit Myelofibrose  
 myeloisches Sarkom

### 3.1.1. Das „Two-Hit“ Modell der AML

Zahlreiche *in vivo* Studien im murinen System deuten darauf hin, dass die akute myeloische Leukämie in einem Mehrstufenprozess entsteht. So konnte in transgenen Mäusen und Transplantationsmodellen gezeigt werden, dass die Expression einzelner genetischer Alterationen, die zuvor in AML Patienten identifiziert worden waren, zwar die myeloische Entwicklung beeinträchtigt, die Expansion des Stammzellpools induziert oder eine myeloproliferative Erkrankung auslösen kann, jedoch allein nicht ausreicht, um eine akute Leukämie hervorzurufen<sup>8-10</sup>. Ausgehend von dieser Tatsache entstand das „Two-Hit“ Modell, wonach mindestens zwei verschiedene Klassen von Mutationen kooperativ wirken müssen, um eine akute Leukämie zu induzieren: Eine Mutation, die zur Aktivierung einer Signaltransduktionskaskade führt und der hämatopoetischen Progenitorzelle Proliferations- und Überlebensvorteile bringt (Klasse I Mutation), und eine zweite Mutation, die hämatopoetische Transkriptionsfaktoren betrifft, die Differenzierung blockiert und der leukämischen Stammzelle die Fähigkeit zur Selbsterneuerung verleiht (Klasse II Mutation)<sup>11, 12</sup>.

Zur zweiten Klasse der Alterationen gehören balancierte chromosomale Translokationen in Regionen von Genen, die für Transkriptionsaktivatoren der normalen Hämatopoese kodieren. Die Translokation führt zur Bildung eines Fusionsproteins, das in der Folge die Zielgene des entsprechenden Transkriptionsfaktors, die für die myeloische Entwicklung der Vorläuferzelle von Nöten sind, reprimiert. Am häufigsten sind der *core binding factor* (CBF) Komplex, der Retinolsäurerezeptor  $\alpha$  und das MLL1 Protein von diesen Translokationen betroffen<sup>13-15</sup>. Neben den chromosomalen Translokationen gehören auch inhibierende Mutationen des Transkriptionsfaktors *CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$*  (C/EBP $\alpha$ ) in die Klasse der differenzierungsinhibierenden Alterationen<sup>16</sup>.

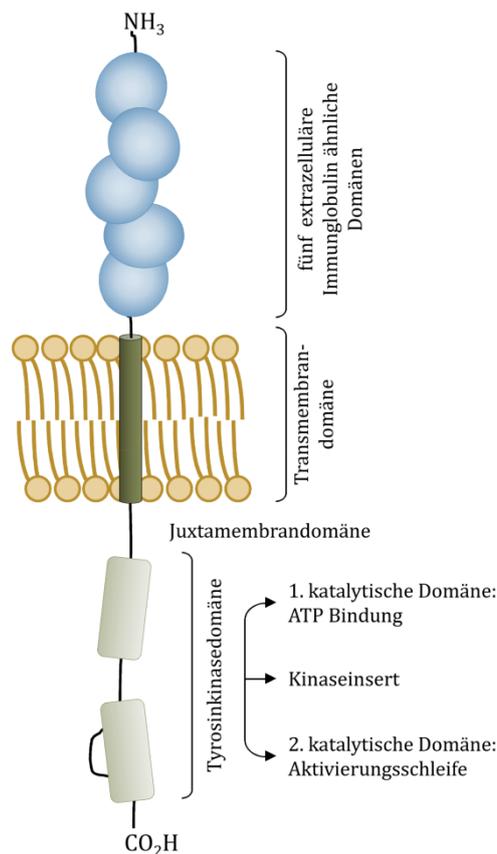
Die häufigsten Mutationen der Klasse I, die die konstitutive Aktivierung bestimmter Signalkaskaden herbeiführen und so zur Pathogenese der AML beitragen, betreffen Nukleophosmin (NPM1)<sup>17</sup>, *rat sarcoma* (RAS)<sup>18</sup> und die Rezeptortyrosinkinasen (RTK) *FMS-like tyrosine kinase 3* (FLT3) und Stammzellfaktorrezeptor KIT.

### 3.1.2. Die hämatopoetischen Rezeptortyrosinkinasen KIT und FLT3

FLT3 (CD135) und der Rezeptor des Stammzellfaktors (SCF) KIT (CD117) gehören ebenso wie *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR), *colony-stimulating factor 1* (CSF1) und *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) zur Klasse III der Rezeptortyrosin-

kinasen (RTKIII). RTKIII werden charakterisiert durch eine extrazelluläre Domäne bestehend aus fünf Immunglobulin ähnlichen Einheiten, eine einzelne Transmembrandomäne gefolgt von der Juxtamembrandomäne und einer durch ein hydrophobes Kinaseinsert zweigeteilten Tyrosinkinasedomäne<sup>19, 20</sup> (Abbildung 1). Sowohl KIT als auch FLT3 können als unreif N-glykosyliertes, intrazelluläres Protein von 140 kDa und als komplex glykosylierter Oberflächenrezeptor von 160 kDa nachgewiesen werden<sup>21, 22</sup>. Beide Rezeptoren werden von lymphatischen und myeloischen Progenitorzellen und KIT zusätzlich von hämatopoetischen Stammzellen exprimiert<sup>20, 23-25</sup>.

Die Bindung ihrer jeweiligen dimeren Liganden, FLT3 Ligand (FL) bzw. SCF, induziert die Dimerisierung der monomeren Rezeptoren und ermöglicht so die Transphosphorylierung bestimmter Tyrosinreste in der sogenannten Aktivierungsschleife und der Juxtamembrandomäne der Rezeptoren<sup>26, 27</sup>. Der Phosphorylierung folgt eine Konformationsänderung in die katalytisch aktive Konformation und die Induktion nachgelagerter



**Abbildung 1: Schematische Darstellung einer RTKIII.** RTKs der Klasse III besitzen eine extrazelluläre Domäne, die aus fünf Immunglobulin ähnlichen Einheiten gebildet wird und stark glykosyliert ist, eine einzelne Transmembrandomäne gefolgt von einer Juxtamembrandomäne und einer durch eine hydrophobe Insertion zweigeteilte Kinasedomäne. Die erste katalytische Domäne trägt die Adenosintriphosphat (ATP) Bindungstasche, die zweite die sogenannte Aktivierungsschleife.

Signalkaskaden. Beide Rezeptoren rekrutieren Mitglieder der *Rous sarcoma* (SRC) Kinase Familie sowie die Adapterproteine *growth factor receptor-bound protein 2* (GRB2) und *GRB2-associated binding protein 2* (GAB2). Des Weiteren aktivieren FLT3 und KIT den Janus Kinase (JAK)/*signal transducer and activator of transcription* (STAT), den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Proteinkinase B (PKB/Akt) und den RAS/mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) Signalweg, welche kontextspezifisch Proliferations-, Differenzierungs- und Überlebenssignale vermitteln<sup>28-37</sup>.

### 3.1.2.1. *KIT und FLT3 Mutationen in der Leukämie*

Wildtypisches FLT3 und KIT werden auf der Oberfläche von 70 bis 90 % der leukämischen Blasten von AML Patienten exprimiert<sup>38-43</sup>. Bei etwa einem Drittel der Patienten mit normalem Karyotyp kann darüber hinaus eine Mutation des FLT3 Rezeptors identifiziert werden. Es treten vor allem zwei Arten von FLT3 Aberrationen auf: Am häufigsten ist die interne Tandemduplikation (ITD) der Exons 14 und 15, die für die Juxtamembrandomäne kodieren. Hier erfolgt eine Insertion von drei bis 400 Aminosäuren in das Leseraster<sup>44</sup>. ITD Mutationen sind bei ca. 25 % der adulten und bei 12 % der pädiatrischen AMLs nachweisbar und mit einer schlechten Prognose verbunden<sup>45-49</sup>. Punktmutationen in der Aktivierungsschleife der Tyrosinkinasedomäne (TKD), die zum Austausch, zur Insertion oder Deletion einer Aminosäure führen, sind die zweithäufigste Form von FLT3 Mutationen (FLT3-TKD). Sie werden bei etwa 7 % der AML Patienten gefunden. In vielen Fällen kann die Substitution des Aspartatrests 835 (D835) durch Tyrosin (D835Y) nachgewiesen werden<sup>46, 50, 51</sup>. ITD und TKD Mutationen induzieren die konstitutive Phosphorylierung des Rezeptors und Aktivierung der *downstream* Signalkaskaden. Außerdem verleihen sie myeloischen Zelllinien die Fähigkeit, Zytokin unabhängig zu wachsen<sup>52</sup>.

Aktivierende Mutationen des Stammzellfaktorrezeptors wurden in verschiedenen humanen Tumoren entdeckt, darunter auch in der akuten myeloischen Leukämie<sup>53-56</sup>. In AML Patienten werden am häufigsten Insertionen und/oder Deletionen im extrazellulären Teil des Rezeptors identifiziert, die zum Verlust des Aspartatrests 419 führen. Der betroffene Abschnitt wird von Exon 8 kodiert und ist an der Dimerisierung von KIT beteiligt<sup>56, 57</sup>. Auch eine der FLT3 D835Y entsprechende Mutation der Aktivierungsschleife kann in der AML nachgewiesen werden. Im Falle des KIT ist der korrespondierende Aspartatrest 816 (D816) zumeist zu Valin (D816V), seltener zu Tyrosin, Histidin, Phenylalanin oder Isoleucin mutiert (KIT-TKD)<sup>54, 58, 59</sup>.

KIT Mutationen in der Juxtamembrandomäne, die von Exon 11 kodiert wird, gelten als häufigste Ursache des gastrointestinalen Stromatumors (GIST), wobei 7 % der GIST Patienten eine zu FLT3-ITD korrespondierende interne Tandemduplikation tragen<sup>60, 61</sup>. Kürzlich wurde die ITD Mutation auch bei drei Patienten mit AML und in vier Fällen von pädiatrischer, akuter promyelozytärer Leukämie identifiziert. Bei den adulten Patienten wurde eine Insertion von 14 bis 18 Aminosäuren in Exon 11 nachgewiesen. Neun dieser Aminosäuren liegen in einem stark konservierten Bereich, der auch an der Bildung von FLT3-ITD beteiligt ist<sup>54, 62</sup>. Die pädiatrischen Leukämiepatienten trugen eine komplexe ITD Mutation unter Beteiligung der Exons 11 und 12. Es konnte gezeigt werden, dass die Mutation die konstitutive Autophosphorylierung des Rezeptors induziert und *SH2-containing protein tyrosine phosphatase 2* (SHP2), den STAT und den PI3K/Akt Signalweg aktiviert. Ebenso wie FLT3-ITD ermöglicht auch KIT-ITD das Faktor unabhängige Wachstum myeloischer Zelllinien<sup>63</sup>.

## 3.2. WNT Signaltransduktion

*Wingless/INT-1* (WNT) Signaltransduktion ist aufgrund ihrer Funktion in der Zellproliferation, der Zelldeterminierung und der Entstehung von Zellpolarität an nahezu allen Aspekten der Embryonalentwicklung beteiligt und spielt auch für die Homöostase adulter Gewebe eine wichtige Rolle. Letzteres wird besonders deutlich, wenn man die Vielzahl von Krebsarten und anderen Erkrankungen betrachtet, bei denen eine Deregulation dieser Kaskade nachzuweisen ist. In Vertebraten existieren mindestens drei verschiedene WNT Signaltransduktionskaskaden: Der klassische oder auch kanonische WNT Signalweg induziert Genexpression, Proliferation und Differenzierung, WNT/Calcium und WNT/*Jun N-terminal kinase* (JNK) Signalweg, die zusammengenommen als nicht-kanonische Signalwege bezeichnet werden, kontrollieren hingegen Zellmigration und -polarität<sup>64, 65</sup>.

Induziert wird WNT Signaltransduktion von Proteinen der WNT Familie. Diese umfasst eine Reihe cysteinreicher, N-glykosylierter Liganden mit Lipidmodifizierung. Im Menschen und in der Maus konnten jeweils 19 verschiedene WNT Liganden identifiziert werden, die klassischerweise in zwei Gruppen eingeteilt werden: Vertreter der „WNT1-Klasse“ aktivieren den kanonischen Signalweg, während die „WNT5A-Klasse“ Liganden die nicht-kanonischen Kaskaden induzieren können<sup>66-69</sup>. Neuere Untersuchungen legen jedoch nahe, dass diese Einteilung zu statisch ist und dass die Aktivierung der nachgelagerten Kaskaden stark von den untersuchten Zelltypen und Konditionen sowie den beteiligten Rezeptoren abhängt<sup>70, 71</sup>.

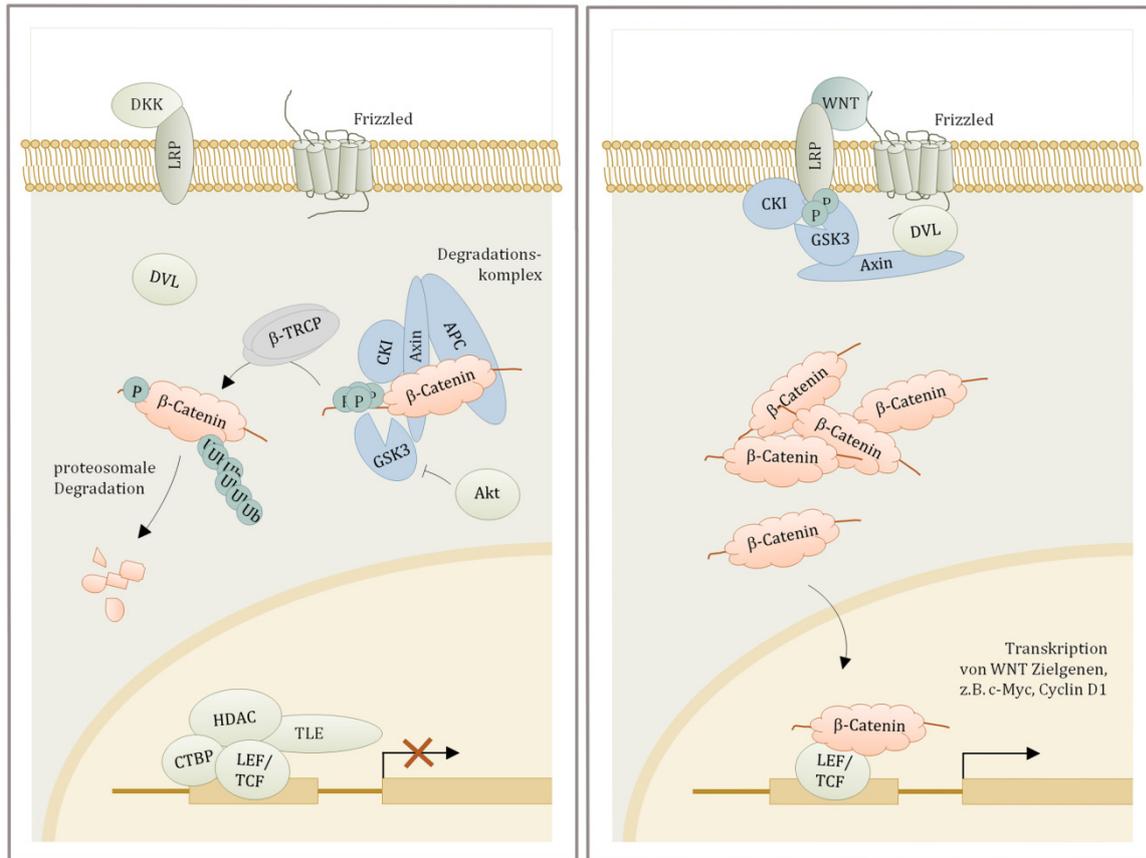
### 3.2.1. Der kanonische WNT Signalweg

Im Zentrum des klassischen WNT Signalwegs steht  $\beta$ -Catenin. Die kanonische Signaltransduktion beruht im Wesentlichen auf der Regulation von Stabilität und Verfügbarkeit dieses Proteins, das als obligatorischer Aktivator der Transkription durch Transkriptionsfaktoren der *lymphoid enhancer factor/T-cell factor* (LEF/TCF) Familie fungiert<sup>72,73</sup>.

In Abwesenheit eines WNT Liganden wird das zytosolische  $\beta$ -Catenin Proteinlevel niedrig gehalten, indem  $\beta$ -Catenin an den sogenannten Degradationskomplex bestehend aus dem Adapterprotein Axin, dem Tumorsuppressor Adenomatöses Polyposis Coli (APC) und den zwei Serin/Threoninkinasen Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3) und Casein Kinase 1  $\alpha$  (CK1 $\alpha$ ) rekrutiert wird<sup>74-77</sup> (Abbildung 2). Hier wird  $\beta$ -Catenin durch Phosphorylierung von vier stark konservierten Aminosäuren in der aminoterminalen, regulatorischen Domäne für den proteosomalen Abbau markiert. Dies geschieht in zwei Schritten: Zunächst wird  $\beta$ -Catenin durch CK1 $\alpha$  an Serin 45 (S45) und anschließend von GSK3 der Reihe nach an den Resten Threonin 41, Serin 37 und Serin 33 (T41/S37/33) phosphoryliert. Die Phosphorylierung an S45 ist dabei grundlegend für die Bindung von GSK3. Diese Kinase erkennt Motive des Typs S/T-x-x-x-pS/pT, wobei x eine beliebige Aminosäure ist. GSK3 phosphoryliert nachfolgend Serin- oder Threoninreste, die vier Aminosäuren N-terminal von der initialen Phosphorylierungsstelle liegen. Die Phosphorylierung von Threonin 41 fungiert als „Relais“, das die Modifikation der zwei verbleibenden Reste Serin 37 und Serin 33 ermöglicht<sup>74, 78, 79</sup>. Diese bilden die eigentliche Bindungsstelle für die E3 Ligase  *$\beta$ -transducin repeat containing protein* ( $\beta$ -TRCP), die  $\beta$ -Catenin polyubiquitinyliert und so für die Degradation im 26S Proteasom markiert<sup>80-85</sup>.

Unter diesen Bedingungen sind die WNT Zielgene reprimiert, da LEF/TCF große Repressorkomplexe bestehend aus den Corepressoren der Groucho/*transducin-like enhancer of split* (TLE) Familie, *c-terminal binding protein* (CTBP) und Histondeacetylasen (HDAC) an die entsprechenden Promotoren rekrutieren<sup>86-89</sup>.

Die Signalübertragung via kanonischem WNT Signalweg wird durch gleichzeitige Bindung eines WNT Liganden an ein Sieben-Transmembranprotein der Frizzled (FZD) Rezeptorfamilie und den Corezeptor *low-density-lipoprotein receptor-related protein* (LRP) 5 oder 6 induziert<sup>90</sup>. Beide LRPs sind Oberflächenmoleküle mit einer einzelnen Transmembrandomäne und teilweise redundanten Aufgaben, wobei LRP6 eine dominantere Rolle in der Embryonalentwicklung zukommt, während LRP5 entscheidend für die adulte Knochenhomöostase ist<sup>91-93</sup>.



**Abbildung 2: Die klassische WNT Signaltransduktion.** Links: In Abwesenheit eines WNT Liganden ist  $\beta$ -Catenin an den Degradationskomplex gebunden, wo es durch Phosphorylierung für den proteosomalen Abbauweg markiert wird. Gleichzeitig rekrutieren LEF/TCF Repressorkomplexe an die Promotoren von WNT Zielgenen, die Transkription ist unterbunden. WNT Antagonisten wie die Dickkopf (DKK) Proteine können die klassische WNT Signaltransduktion inhibieren, indem sie mit dem Corezeptor LRP interagieren. Rechts: Die Bindung eines WNT Liganden an Frizzled und LRP induziert einen aktiven Rezeptorkomplex, der zunächst DVL und später Axin und GSK3 an die Membran rekrutiert. Die Aktivierung des Signalwegs geht mit der Phosphorylierung von LRP und dem Zerfall des Degradationskomplexes einher.  $\beta$ -Catenin wird freigesetzt, reichert sich im Zytosol an und wandert in den Zellkern. Es verdrängt die Repressoren und induziert die Transkription von WNT Zielgenen durch Bindung von LEF/TCF an den basalen Transkriptionsapparat. (DKK: Dickkopf; P: Phosphatgruppe; Ub: Ubiquitin)

Die Bindung des WNT Liganden an FZD und LRP induziert den aktiven Rezeptorkomplex, der zunächst, wahrscheinlich unter Beteiligung heterotrimerer G-Proteine<sup>94, 95</sup>, das Adapterprotein Dishevelled (DVL) rekrutiert. DVL bindet über seine PDZ (*PDS, discs-large and ZO1*) Domäne an den C-Terminus von FZD<sup>96</sup> und rekrutiert seinerseits einen Komplex bestehend aus Axin und GSK3, wobei Axin mit geringer Affinität an die DIX (Dishevelled und Axin) Domäne von DVL bindet<sup>97-100</sup>. Zusammen mit der membranständigen Casein Kinase 1  $\gamma$  phosphoryliert GSK3 Serin- und Threoninreste im intrazellulären Teil des Corezeptors LRP, die innerhalb von fünf sich wiederholenden PP(S/T)PxS Motiven liegen. Die phosphorylierten PP(S/T)PxS Motive bilden eine hoch affine Bindungsstelle für den Axin/GSK3 Komplex, der die initiale LRP Phosphorylierung weiter verstärkt<sup>101-103</sup>.

Wie genau diese Zusammenhänge letztendlich zur Inhibition der  $\beta$ -Catenin Phosphorylierung beitragen, ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Es wurden jedoch verschiedene Beobachtungen gemacht, die Erklärungsansätze bieten. (i) Axin gilt aufgrund seiner niedrigen, zytosolischen Konzentration als limitierender Faktor der Degradationskomplexaggregation. Daher könnte seine Rekrutierung an den aktivierten Rezeptorkomplex ausreichen, um die  $\beta$ -Catenin Phosphorylierung zu unterbinden<sup>104, 105</sup>. (ii) Weiterhin konnte eine WNT induzierte Dissoziation der zytosolischen Axin/GSK3 Komplexe nachgewiesen werden, die zur Freisetzung von  $\beta$ -Catenin führt<sup>95</sup>. (iii) Andere Gruppen zeigten, dass die phosphorylierte, intrazelluläre Domäne von LRP6 oder auch nur einzelne phosphorylierte PP(S/T)PxS Motive die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin durch GSK3 *in vitro* inhibieren können<sup>106-108</sup>. (iv) Offensichtlich spielt auch die Internalisierung des ganzen Rezeptorkomplexes sowie der angelagerten, zytosolischen Proteine eine entscheidende Rolle für die langfristige Aufrechterhaltung des WNT Signals<sup>109-111</sup>. Gerade kürzlich konnte von Taelman et al. gezeigt werden, dass GSK3 mitsamt dem Rezeptorkomplex nach der Aktivierung der klassischen WNT Signaltransduktion in „multivesikulären Körpern“ (*multivesicular bodies*, MVBs) sequestriert wird. MVBs sind Endosomen mit vielen kleinen, inneren Membranvesikeln. Da das Lumen der MVB Vesikel dabei mit der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran korrespondiert, ist GSK3 durch zwei Membranen von seinem Substrat  $\beta$ -Catenin getrennt und kann dieses nicht mehr für den Abbau markieren<sup>112</sup>.

In jedem Fall wird  $\beta$ -Catenin nach Induktion des kanonischen WNT Signalwegs aus dem Degradationskomplex freigesetzt, akkumuliert im Zytosol und gelangt über einen Kernlokalisierungssignal unabhängigen und Importin unabhängigen Weg in den Nukleus<sup>113</sup>. Dort bindet es an LEF/TCF Transkriptionsfaktoren und aktiviert die Transkription von WNT Zielgenen. Nach Abbruch des WNT Signals wird  $\beta$ -Catenin von APC aus dem Zellkern transportiert, an einen neuen Degradationskomplex gebunden und abgebaut<sup>114-116</sup>.

### 3.2.2. WNT Signaltransduktion in der AML

Aberrante WNT Signaltransduktion gilt als Auslöser einer Vielzahl verschiedener Krebsarten, allen voran Darmkrebs<sup>117-119</sup>. Häufig können Mutationen eines Proteins des Degradationskomplexes nachgewiesen werden, die den Abbau von  $\beta$ -Catenin verhindern und eine konstitutive Aktivierung der Signalkaskade nach sich ziehen<sup>120-122</sup>. Es wird angenommen, dass die transformierende Wirkung des WNT Signalwegs zum Teil auf die Induktion bestimmter Zielgene wie c-Myc und Cyclin D1 zurückzuführen ist, denen selbst eine onkogene Wirkung zugeschrieben wird<sup>123-125</sup>.

Obwohl die Rolle klassischer WNT Signaltransduktion für die normale Hämatopoese und die Selbsterneuerung adulter, hämatopoetischer Stammzellen kontrovers diskutiert wird<sup>126-129</sup>, konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Aktivierung der WNT/ $\beta$ -Catenin Signalkaskade eine Voraussetzung für die Bildung von leukämischen Stammzellen der AML ist<sup>130</sup>. In vielen primären AML Blasten können hohe  $\beta$ -Catenin Konzentrationen nachgewiesen werden, die mit der Induktion der Kaskade einhergehen und darüber hinaus die Differenzierung inhibieren<sup>131</sup>. Bisher wurden jedoch keine Mutationen von  $\beta$ -Catenin, APC oder anderer Komponenten des Degradationskomplexes in Patienten mit AML beschrieben. Die Aktivierung des WNT Signalwegs in der akuten myeloischen Leukämie scheint vor allem über zwei Mechanismen zu erfolgen: (i)  $\beta$ -Catenin selbst wird *downstream* von vielen bekannten Onkogenen der Leukämogenese stabilisiert oder (ii) negative Regulatoren der Signalkaskade werden epigenetisch reprimiert.

AML assoziierte Produkte chromosomaler Translokationen wie t(8;21), t(15;17) und t(11;17) bedingen einen erhöhten zytosolischen  $\beta$ -Catenin Proteinspiegel und induzieren die Expression des  $\beta$ -Catenin Homologs Plakoglobin ( $\gamma$ -Catenin). Plakoglobin ist ein Bestandteil der Desmosomen, kann jedoch ebenso wie  $\beta$ -Catenin die Transkription von WNT Zielgenen durch Bindung an TCF/LEF Transkriptionsfaktoren aktivieren<sup>132</sup>. Darüber hinaus induziert Plakoglobin  $\beta$ -Catenin Stabilisierung und dessen nukleäre Lokalisation, wahrscheinlich durch kompetitive Bindung an den Degradationskomplex<sup>133, 134</sup>.

Auch FLT3-ITD und FLT3-TKD sind in der Lage, den kanonischen WNT Signalweg zu aktivieren. In einem Zellkulturmodell und in primären AML Blasten konnte stabilisiertes  $\beta$ -Catenin *downstream* von FLT3-ITD, aber nicht von ligandenstimuliertem Wildtyprezeptor nachgewiesen werden<sup>135</sup>. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass  $\beta$ -Catenin selbst ein Substrat der FLT3 Rezeptortyrosinkinase ist. Daher kann in Zellen mit aktivierenden FLT3 Mutationen vermehrt tyrosinphosphoryliertes, nukleäres  $\beta$ -Catenin detektiert werden<sup>136</sup>. Diese Beobachtung entspricht einem generellen Mechanismus, wonach die Tyrosinphosphorylierung von  $\beta$ -Catenin zu dessen Stabilisierung, Translokation in den Nukleus und Induktion der  $\beta$ -Catenin vermittelten Transkription beiträgt<sup>137-139</sup>.

Für verschiedene andere Proteine konnte eine regulatorische Funktion innerhalb der WNT Signalkaskade nachgewiesen werden. So spielt das Onkogen *sal-like 4* (SALL4) als potentieller Zinkfinger Transkriptionsfaktor eine Rolle in der Hämatopoese, wird aber in gesundem Knochenmark und Blut kaum nachgewiesen. Im Gegensatz dazu exprimieren sowohl AML Blasten als auch alle untersuchten AML Zelllinien SALL4 konstitutiv. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass dieses Protein mit  $\beta$ -Catenin interagiert und die klassische WNT Signaltransduktion verstärkt<sup>140, 141</sup>.

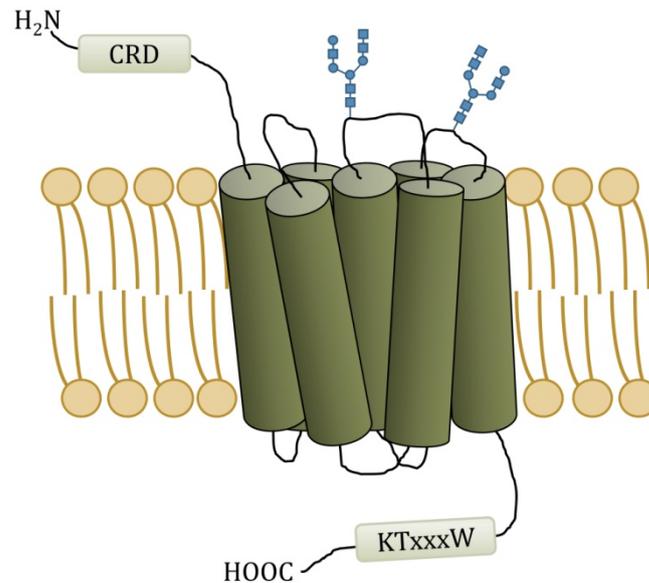
*WNT inhibitory factor 1* (WIF1), *secreted Frizzled-related proteins* (sFRPs) und die Familie der Dickkopf (DKK) Proteine sind WNT Antagonisten. WIF1 inhibiert WNT Signaltransduktion durch die Interaktion mit WNT Liganden. sFRPs binden sowohl WNT Liganden als auch Frizzled Proteine. DKK hemmt die Aktivierung der Kaskade durch die spezifische Bindung an den Corezeptor LRP<sup>142</sup>. Für alle drei Antagonisten konnte in AML Patientenmaterial Promotorhypermethylierung nachgewiesen werden. Etwa die Hälfte der Patienten mit APL, einer Variante der AML, die mit der Expression von Translokationsprodukten des Retinolsäurerezeptors  $\alpha$  assoziiert ist, tragen DNA Methylierungen des WIF1 Promotors<sup>143</sup>. Hypermethylierung des DKK1 Promotors und verschiedener sFRP Promotoren wurde in AML Patienten mit Mutationen des CBF Komplexes (CBF Leukämien) entdeckt<sup>144-146</sup>.

Neben den bereits genannten Beispielen konnten kürzlich weitere Komponenten der klassischen WNT Signaltransduktion mit AML in Verbindung gebracht werden. Analysen von primärem AML Patientenmaterial zeigten, dass auch die Gene verschiedener negativer Regulatoren der Signalkaskade durch Promotorhypermethylierung reprimiert werden. Zu den stummgeschalteten Genen gehören TLE1<sup>147</sup>, GSK3 $\beta$ , APC2, AXIN2 sowie eine Reihe von WNT Liganden<sup>148</sup>.

### 3.2.3. Frizzled 4

Frizzled 4 (FZD4) ist einer von zehn humanen Frizzled Rezeptoren<sup>149</sup>. Alle Proteine dieser Familie sind glykosylierte, sieben-Transmembrandomänen Rezeptoren mit einer zytosolischen PDZ Domäne und einer aminoterminalen cysteinreichen Domäne (CRD), die zehn invariante Cysteinreste aufweist<sup>150-152</sup>. Die extrazelluläre CRD ist nötig und ausreichend, um die Bindung von Liganden zu vermitteln (Abbildung 3). Als klassische Liganden der Frizzled Rezeptoren gelten WNT Proteine<sup>153, 154</sup>, jedoch gibt es mindestens drei weitere Proteinfamilien, die mit FZDs interagieren und nachgelagerte Signalkaskaden aktivieren können: sFRPs, R-Spondin und Norrin<sup>155-159</sup>. Dabei aktivieren verschiedene Frizzled Rezeptor/Liganden Kombinationen zum Teil spezifisch, zum Teil kontextabhängig unterschiedliche WNT Signalwege<sup>160, 161</sup>.

Frizzled 4 wird in vielen adulten Geweben exprimiert, darunter Herz- und Skelettmuskulatur, Ovarien, Darm und Leber<sup>150, 162</sup>. FZD4 *knock-out* Mäuse zeigen fortschreitende Gehörlosigkeit sowie eine progressive Degeneration der Neuronen des Kleinhirns. Außerdem fehlen ihnen die Muskelstränge, die die Speiseröhre ummanteln<sup>163</sup>.



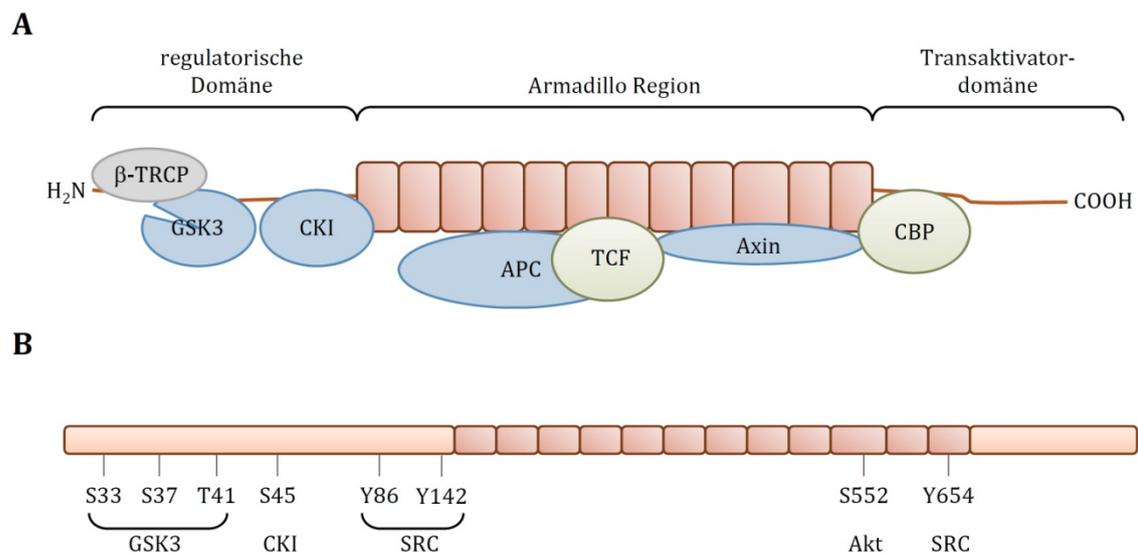
**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Frizzled 4 Struktur.** Frizzled 4 ist ein sieben-Transmembrandomänen Rezeptor, der mehrfach glykosyliert ist. In der extrazellulären, N-terminalen Domäne befindet sich die cysteinreiche Domäne (CRD), die die Bindung an WNT Liganden vermittelt. Intrazellulär trägt Frizzled 4 eine PDZ Domäne, die das Konsensusmotiv KTxxxW besitzt. Sie ist verantwortlich für die Bindung zytosolischer Komponenten klassischer WNT Signaltransduktion nach Aktivierung durch einen Liganden.

Frizzled 4 kommt vor allem in der Angiogenese eine tragende Rolle zu. Daher haben Untersuchungen dieses biologischen Prozesses sehr zur Charakterisierung der FZD4 Funktion und *downstream* Effekte in verschiedenen Systemen beigetragen. Bei Ischämie induzierter Gefäßneubildung aktiviert die Bindung von sFRP1 an FZD4 zum Beispiel eine GSK3 abhängige, aber  $\beta$ -Catenin unabhängige Kaskade, die die Reorganisation des Zytoskletts endothelialer Zellen einleitet<sup>164</sup>. Auch für die Vaskularisierung und Organogenese des Auges ist die Induktion des WNT Signalwegs durch Frizzled 4 unerlässlich. Norrie Syndrom, eine Form erblicher Blindheit, und familiäre exsudative Vitreoretinopathie (FEVR) sind zwei phänotypisch ähnliche Erkrankungen der Blutgefäßsysteme von Auge und Retina. Das Norrie Syndrom kann darüber hinaus auch geistige Behinderung und sensorisch-neuronale Taubheit hervorrufen, der eine beeinträchtigte kochleare Vaskularisierung zu Grunde liegt<sup>165, 166</sup>. Bei etwa 20 % der FEVR Fälle kann eine *loss-of-function* Mutation des Frizzled 4 Gens nachgewiesen werden, andere FEVR Patienten tragen Mutationen von LRP5<sup>167-169</sup>. Als Ursache des Norrie Syndroms wurden dagegen Mutationen des WNT Agonisten Norrin identifiziert<sup>170, 171</sup>. Im Zusammenhang mit diesen beiden Erkrankungen konnte gezeigt werden, dass Norrin hochaffin und spezifisch an Frizzled 4 bindet. Im Gegensatz zur sFRP1 induzierten nicht-kanonischen Signaltransduktion aktiviert die Interaktion von Norrin mit dem FZD4/LRP5 Rezeptorkomplex den klassischen WNT Signalweg<sup>156</sup>.

Über die Regulation der FZD4 Expression ist nur wenig bekannt. In gesunden Darmzellen wird die Frizzled 4 Expression durch WNT2 reprimiert. Dieser Mechanismus ist in Darmkrebszelllinien ohne APC und/oder mit  $\beta$ -Catenin Mutation (HCT116 bzw. RKO) gestört<sup>172</sup>. Im hämatopoetischen System kann die Expression von FZD4 durch AML assoziierte Mutationen reguliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass FLT3-ITD transformierte 32D Zellen Frizzled 4 um den Faktor 8,5 höher exprimieren als Zellen, die den Wildtyprezeptor tragen<sup>135, 173</sup>.

### 3.2.4. $\beta$ -Catenin

$\beta$ -Catenin ist ein zytoplasmatisches Protein bestehend aus drei Domänen (Abbildung 4 A). Die zentrale Armadillo Region stellt die wichtigste Domäne zur Interaktion mit anderen Proteinen dar. Sie setzt sich aus zwölf Wiederholungen von jeweils drei  $\alpha$ -Helices zusammen, die als Armadillo *repeats* bezeichnet werden. Die Armadillo *repeats* sind dicht gepackt und bilden ihrerseits eine rechtsdrehende Superhelix mit einer über die



**Abbildung 4: Domänenstruktur, Bindungspartner und Phosphorylierungsstellen von  $\beta$ -Catenin.** (A)  $\beta$ -Catenin besitzt drei Domänen: eine N-terminale, regulatorische Domäne, eine zentrale Armadillo Region (Arm) und eine carboxyterminale Transaktivator-domäne. Arm stellt die wichtigste Domäne zur Interaktion mit anderen Proteinen dar. Das Schema zeigt einige Bindungspartner und ihre ungefähren Bindungsstellen an die  $\beta$ -Catenin Struktur. (B)  $\beta$ -Catenin ist Substrat für eine Vielzahl von Serin/Threonin- und Tyrosinkinase. GSK3 und CK1 regulieren die Stabilität von  $\beta$ -Catenin durch Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten in der N-terminalen Domäne. Die Phosphorylierung von Tyrosinresten durch Kinasen der SRC Familie induziert zytosolische bzw. nukleäre Lokalisation von  $\beta$ -Catenin. Akt induzierte Phosphorylierung stabilisiert  $\beta$ -Catenin und leitet dessen Translokation in den Nukleus ein. (CBP: *CREB-binding protein*; SRC: Kinasen der SRC Familie)

gesamte Länge der Domäne gespannten, positiv geladenen Furche<sup>174</sup>. Im Gegensatz zu der starren Konformation der Armadillo Region, weisen die N- und C-terminale Domäne keine bekannte Tertiärstruktur auf, sondern sind in Lösung frei beweglich. Für die C-terminale Domäne konnte gezeigt werden, dass sie zur Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin beiträgt, indem sie nach Phosphorylierung an die Armadillo Region zurückfaltet und auf diese Weise die Bindung an den Degradationskomplex inhibiert<sup>175-177</sup>. Darüber hinaus ist die carboxyterminale Domäne, die auch als transaktivierende Domäne bezeichnet wird, vor allem an der Bindung von nukleären Proteinen beteiligt<sup>178-180</sup>. Die N-terminale Domäne ist für die Regulation der  $\beta$ -Catenin Stabilität zuständig. Sie trägt die vier invariablen Serin- und Threoninreste (S33/37/T41/S45), die in Abwesenheit eines WNT Liganden phosphoryliert werden und  $\beta$ -Catenin für den Abbau im Proteasom markieren.

$\beta$ -Catenin gehört zu einer Gruppe multifunktionaler Proteine, mit deren Hilfe sehr unterschiedliche Funktionen in einer Zelle koordiniert werden können. Im Falle des  $\beta$ -Catenins sind die Merkmale eines Adapterproteins der Zelladhäsion an die eines Transkriptionsaktivators gekoppelt<sup>181</sup>. Ursprünglich wurde  $\beta$ -Catenin als Bindungspartner von E-Cadherin in *adherens junctions* identifiziert<sup>182, 183</sup>. Diese ternären Proteinkomplexe vermitteln Calcium abhängig Zelladhäsion und Interaktionen zwischen benachbarten Zellen<sup>184, 185</sup>.  $\beta$ -Catenin dient hier als Adapterprotein zwischen dem Transmembranprotein E-Cadherin und  $\alpha$ -Catenin, welches den Komplex an das Aktin Zytoskelett bindet<sup>186-188</sup>. Später wurde entdeckt, dass  $\beta$ -Catenin als Coaktivator der Transkription die Signale des kanonischen WNT Signalwegs in den Zellkern überträgt. Hier aktiviert das Protein die Transkription von WNT Zielgenen durch Bindung von LEF/TCF an den basalen Transkriptionsapparat<sup>72, 73</sup>.

Der Pool von membranassoziiertem und zytosolischem  $\beta$ -Catenin und damit die Balance von Zelladhäsion versus WNT Signaltransduktion wird durch Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin und/oder dessen Interaktionspartnern moduliert. Diese Modifikation verändert Bindungsaffinitäten und kann dadurch sowohl die Stabilität als auch Lokalisation von  $\beta$ -Catenin regulieren. Beispielsweise erzeugt die Phosphorylierung von E-Cadherin, APC sowie Axin zusätzliche negative Ladungen, die die Affinität dieser Proteine zur positiv geladenen Armadillo Region von  $\beta$ -Catenin noch erhöhen<sup>189-192</sup>.  $\beta$ -Catenin selbst trägt eine Vielzahl von Phosphorylierungstellen, die Ziel verschiedener Kinasen sind (Abbildung 4 B, Tabelle 2). Die bereits erwähnten regulatorischen Reste in der aminoterminalen Domäne können abgesehen von CK1 und GSK3 auch von JNK und Cyclin abhängiger Kinase 2 (CDK2) phosphoryliert werden, in jedem Fall führt die Phosphorylierung jedoch zur proteosomalen Degradation von  $\beta$ -Catenin<sup>193, 194</sup>.

**Tabelle 2:  $\beta$ -Catenin Phosphorylierung.** Übersicht über Phosphorylierungsstellen, modifizierende Kinasen und Bedeutung der Phosphorylierung für die  $\beta$ -Catenin Lokalisation, Stabilität und Interaktionen.

Phosphorylierter Rest	Kinase	Effekt
S29/T112/120	Casein Kinase 2 (CK2)	fördert die Lokalisation in <i>adherens junctions</i> , reguliert Stabilität von zytosolischem $\beta$ -Catenin <sup>195</sup>
S33/37/T41	GSK3	$\beta$ -Catenin Degradation <sup>76-78</sup>
S33/37/T41	JNK	Regulation der Bildung von <i>adherens junctions</i> , $\beta$ -Catenin Degradation <sup>193</sup>
S33/37/T41/S45	CDK2	$\beta$ -Catenin Degradation <sup>194</sup>
S45	CK1	Induktion der $\beta$ -Catenin Degradation <sup>78</sup>
Y64/142/331/333	Protein Tyrosin Kinase 6 (PTK6)	inhibiert Transkription durch $\beta$ -Catenin/TCF <sup>196</sup>
Y86/654	BCR/ABL	fördert nukleäre Lokalisation und inhibiert die Bindung von Axin/GSK3 <sup>197</sup>
Y86/654	pp60 (c-SRC)	inhibiert die Bindung an E-Cadherin <sup>198</sup>
T112/120	Protein Kinase D1 (PKD1)	fördert die Lokalisation in <i>adherens junctions</i> <sup>199</sup>
Y142	FYN, FER	inhibiert die Bindung an $\alpha$ -Catenin <sup>200</sup>
S191/605	JNK2	fördert nukleäre Lokalisation <sup>201</sup>
Y489	ABL	fördert nukleäre Lokalisation <sup>202</sup>
S552	Akt	fördert $\beta$ -Catenin Stabilität und nukleäre Lokalisation <sup>203</sup>
S552/675	Protein Kinase A (PKA)	stabilisiert $\beta$ -Catenin, fördert die Bindung an <i>CREB binding protein</i> <sup>204, 205</sup>

$\beta$ -Catenin ist auch Substrat dreier Leukämie assoziierter, onkogener Tyrosinkinase. Das Translokationsprodukt *breakpoint cluster region/Abelson* (BCR/ABL), das in 95 % aller Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) und in wenigen Fällen von akuter B-lymphoblastischer Leukämie (B-ALL) identifiziert werden kann, phosphoryliert  $\beta$ -Catenin an Y86/654. Dies induziert die nukleäre Lokalisation von  $\beta$ -Catenin sowie dessen Bindung an TCF und inhibiert gleichzeitig die Interaktion mit GSK3/Axin<sup>197</sup>. Kajiguchi et al. konnten die Tyrosinphosphorylierung von  $\beta$ -Catenin durch die konstitutiv aktiven RTKs KIT-TKD und FLT3-ITD nachweisen. Die Modifikation führte zur Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin und förderte ebenfalls dessen Translokation in den Zellkern<sup>136, 206</sup>.

### 3.2.4.1. $\beta$ -Catenin Funktionen im Zellzyklus und in der Mitose

Das zytoplasmatische Level von  $\beta$ -Catenin wird strikt durch Bindung an APC und den Degradationskomplex reguliert. Unabhängig davon kann jedoch eine dynamische Regulation der  $\beta$ -Catenin Proteinkonzentration im Zellzyklus beobachtet werden. Diese steigt während der S-Phase, gipfelt in G2/M- und fällt abrupt beim Übergang in die G1-Phase. Der Anstieg

geht mit einer verminderten Interaktion zwischen  $\beta$ -Catenin und APC einher und deutet auf eine wichtige Funktion von  $\beta$ -Catenin in der G2-Phase/Mitose<sup>207</sup>. In verschiedenen, widersprüchlichen Studien konnte eine Zellzyklus spezifische Rolle für  $\beta$ -Catenin nachgewiesen werden, zum einen als positiver Regulator des G1/S-Übergangs, zum anderen als negativer Regulator, der Zellzyklusarrest induziert<sup>207-211</sup>.

Neben den bekannten Funktionen in der Zell-Zell-Adhäsion und der WNT stimulierten Transkription konnte  $\beta$ -Catenin kürzlich mit der Organisation der mitotischen Spindel an den Zentrosomen in Verbindung gebracht werden. In der Mitose lokalisiert  $\beta$ -Catenin zunächst an den Zentrosomen und wandert mit Einsetzen der Telophase in die Zentralspindel und später in die Zellteilungsfurche (Midbody). *Knock-down* Experimente zeigen, dass die Anwesenheit von  $\beta$ -Catenin an den Zentrosomen zur Trennung von Mutter- und Tochterzentrosom notwendig ist, die Abwesenheit von  $\beta$ -Catenin führt daher zur Bildung monoastraler Spindeln<sup>212, 213</sup>. Interessanterweise handelt es sich bei dem Zentrosomen gebundenen  $\beta$ -Catenin um S33/37/T41 phosphoryliertes Protein, dass nicht degradiert wird, sondern in der Interphase am Mutterzentrosom lokalisiert ist und in der Mitose auf beide Zentrosomen übergeht. In diesem Zusammenhang konnte außerdem nachwiesen werden, dass phospho- $\beta$ -Catenin wichtig für die strahlenförmige Anordnung und das Wachstum der Mikrotubuli ist<sup>214</sup>.

$\beta$ -Catenin wird Zellzyklus abhängig ebenfalls von verschiedenen Serin/Threoninkinasen phosphoryliert. Dazu gehören die zentrosomale Kinase Nek2, *cyclin-dependent kinase 2* (CDK2) und *Polo-like kinase 1* (PLK1), die neben den Kinasen der Aurora Familie zu den wichtigsten Akteuren der Mitose gehört<sup>194, 213, 215</sup>.

## 4. ZIEL DER ARBEIT

In der akuten myeloischen Leukämie ist die Aktivierung des klassischen WNT Signalwegs als Folge aktivierender Mutationen der Rezeptortyrosinkinase FLT3 von uns und anderen beschrieben worden. Dabei konnten unabhängig voneinander die Induktion der FZD4 Expression und die Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin durch FLT3-ITD nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang wurde wiederholt die Rolle von  $\beta$ -Catenin als Transkriptionsaktivator des WNT Signalwegs analysiert. Aktuelle Publikationen deuten jedoch darauf hin, dass  $\beta$ -Catenin auch an weiteren biologischen Prozessen beteiligt ist. Daher sollten in der vorliegenden Arbeit Regulationsmechanismen und WNT Signalweg unabhängige Funktionen von  $\beta$ -Catenin vor dem Hintergrund der AML untersucht und charakterisiert werden. Folgende Fragestellungen sollten dabei im Einzelnen bearbeitet werden:

- Wie erfolgt die Regulation von FZD4 in primären AML Blasten und welchen Einfluss hat die Expression des Rezeptors auf die kanonische WNT Signalkaskade?
- Welche Rolle spielt der klassische WNT Signalweg in der KIT-ITD vermittelten leukämischen Transformation?
- Über welchen Mechanismus erfolgt die Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin *downstream* der internen Tandemduplikation?
- Welche WNT Signalweg unabhängigen Funktionen übernimmt  $\beta$ -Catenin im hämatopoetischen System?



# 5. MATERIAL UND METHODEN

## 5.1. Material

### 5.1.1. Chemikalien

Alle Chemikalien und Reagenzien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Biozym Scientific GmbH (Hess. Oldendorf), Bio-Rad Laboratories GmbH (München), Lonza Ltd. (Basel, Schweiz), AppliChem GmbH (Darmstadt), Becton Dickinson GmbH (Heidelberg), Invitrogen Ltd. (Gibco®) (Paisley, Großbritannien), Mallinckrodt Baker, Inc. (J. T. Baker®) (Phillipsburg, NJ, USA), Merck (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg) und Sigma-Aldrich Co. (Fluka, Riedel-de Haën®) (St. Louis, MO, USA) in p.A.-Qualität bezogen und eingesetzt.

### 5.1.2. Lösungen und Puffer

**Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Puffer/Lösungen und ihrer Zusammensetzung.**

<b>Puffer/Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung/Herstellung</b>
2 × HBS	1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 280 mM NaCl, 50 mM HEPES, pH 6,95, steril
5 × Ladepuffer	50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 7,5 % (w/v) SDS, 25 % (v/v) Glycerol, 1 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau
6 × DNA-Ladepuffer	0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylen Cyanol FF, 30 % (v/v) Glycerol
10 × TADB-Puffer	500 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EGTA, 150 mM DTT
50 × TAE-Puffer, 1 L	242 g Tris-Base, 51 mL Eisessig, 50 μM EDTA

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung/Herstellung
AKC-Lysispuffer	340 mM NH <sub>3</sub> Cl, 10 mM KHCO <sub>3</sub> , 0,12 mM EDTA
aktiviertes Natriumorthovanadat	220 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> in Wasser herstellen, pH 9,0; aufkochen bis die Lösung farblos wird, abkühlen auf Raumtemperatur, wieder pH 9,0 einstellen; Aufkochen, Abkühlen, pH-Wert einstellen solange wiederholen, bis sich der pH-Wert nach dem Abkühlen nicht mehr verändert
Binding Puffer	50 mM HEPES (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2,5 mM EGTA, 10 % (v/v) Glycerol, 0,1 % (v/v) Tween 20, komplementieren mit 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM Natriumorthovanadat, Complete, EDTA-free
Blocking Lösung	5 % (w/v) Magermilchpulver in PBST
CaCl <sub>2</sub> -Puffer	50 mM CaCl <sub>2</sub> , 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, steril
CBB Entfärber	15 % Methanol, 7 % Eisessig, 87 % Wasser
CBB Färbelösung	0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue (R250), 45 mL Methanol, 45 mL Wasser, 10 mL Eisessig
Gewebelysispuffer	100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 % (w/v) SDS, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, komplementieren mit Complete, EDTA-free
GST-Lysispuffer (#1)	20 mM Triethanolamin, pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0,5 % (v/v) Triton X-100, 0,1 % (v/v) β-Mercaptoethanol
GST-Waschpuffer (#2)	20 mM Triethanolamin, pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,1 % (v/v) β-Mercaptoethanol
GST-Waschpuffer (#3)	20 mM Triethanolamin, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) β-Mercaptoethanol
GST-Waschpuffer (#4)	20 mM Triethanolamin, pH 7,5, 0,1 % (v/v) β-Mercaptoethanol
IF-AK Puffer	1 % (w/v) Magermilchpulver in TBS mit 0,2 % (v/v) Triton X-100
IF-Blocking Puffer	5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS mit 0,2 % (v/v) Triton X-100
IP-Ripa	150 mM NaCl, 1 % NP40, 0,5 % DOC, 50 mM Tris (pH 8,0), komplementieren mit 1 mM Natriumorthovanadat, Complete, EDTA-free
Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,5 % (w/v) SDS, pH 8,3
Methylcellulose	500 mL steriles 2 × IMDM (17,66 g IMDM-Pulver, 3,02 g NaHCO <sub>3</sub> ) herstellen, bei 4 °C lagern; 500 mL steriles Wasser zum Kochen bringen, 23 g Methylcellulose dazugeben, unter Rühren weiterkochen; wenn Verwirbelungen zu sehen sind, Methylcellulose-Lösung unter Rühren auf 37 °C abkühlen, dann 500 mL kaltes 2 × IMDM zugeben und mischen; Aliquots bei -20 °C lagern
Mg <sup>2+</sup> /ATP-Cocktail	20 mM MOPS, pH 7,2, 75 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM β-Glycerophosphat, 5 mM EGTA, 1 mM Natriumorthovanadat, 1 mM DTT
Mowiol 4-88	20 g Mowiol 4-88 in 80 mL PBS über Nacht bei Raumtemperatur rühren, 40 mL Glycerin zugeben, wieder über Nacht bei Raumtemperatur rühren; Zentrifugation für 1 h bei 10000 rpm; Überstand abnehmen und nach Zugabe von 2 mM NaN <sub>3</sub> im Dunkeln bei 4 °C lagern
PBST	0,1 % Tween 20 in PBS
RIPA-Puffer	150 mM NaCl, 1 % (v/v) NP40, 0,5 % (w/v) DOC, 0,1 % (w/v) SDS, 50 mM Tris (pH 8,0), komplementieren mit 1 mM Natriumorthovanadat, Complete, EDTA-free
TBS	25 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, pH 7,4
Transferpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, pH 8,3

### 5.1.3. Sonstige Materialien

**Tabelle 4: Verwendete Kits und sonstige Materialien.**

Materialien und Kits	Bezugsquelle
[ <sup>32</sup> P]- $\gamma$ -ATP	PerkinElmer (Waltham, MA, USA)
[ <sup>35</sup> S]-Methionin	PerkinElmer (Waltham, MA, USA)
BCA Protein Assay Kit	Pierce (Bonn)
Blasticidin S	Calbiochem® Merck (Darmstadt)
Chloroquin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Complete, EDTA-free	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
ECL Western-Blot-Detektionskit (ECL Plus)	Amersham Pharmacia (Uplala, Schweden)
G418	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Gateway® LR Clonase® Enzym Mix	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (10.000 ×)	Biotium, Inc. (Hayward, CA, USA)
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Glutathion-Agarose	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Halb-Mikro-Küvetten, 10×4 mm	Sarstedt (Nümbrecht)
Hybond-P PVDF-Membran	GE Healthcare Europe GmbH (München)
Imatinib	Novartis (Basel, Schweiz)
IMMERSOL™ 518 N	Carl Zeiss (Oberkochen)
NuPAGE® Antioxidant	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
NuPAGE® LDS 4 × LDS Sample Buffer	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
NuPAGE® Sample Reducing Agent (10 ×)	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
NuPAGE® Transfer Buffer (20 ×)	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
PBS Tabletten	GIBCO®, Invitrogen GmbH (Darmstadt)
PKC412	Novartis (Basel, Schweiz)
Polybrene	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Puromycin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Restained Protein Marker, broad range	Cell Signaling Technology Inc. (Beverly, MA, USA)
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Röntgenfilm	Agfa Graphics Germany GmbH & Co. KG (Köln)
TNT® Quick Coupled Transcription/Translation System	Promega Corporation (Madison, WI, USA)
Westernblot Luminol Reagenz	Santa Cruz Biotechnology (St. Cruz, CA, USA)

### 5.1.4. Antikörper

**Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper.** (IB: Immunblot; IP: Immunpräzipitation; IF: Immunfluoreszenz; FACS: Durchflußzytometrie; GA: Gewebearray)

Antikörper	Applikation	Quelle
Maus-anti-CD135, human, PE-gekoppelt	FACS	BD Transduction
Maus-IgG <sub>1</sub> , κ, Isotypenkontrolle, PE-gekoppelt	FACS	Laboratories (Lexington, KY, USA)
PE-Streptavidin	FACS	
Ratte-anti-CD117, murin, PE-gekoppelt	FACS	
Ratte-IgG <sub>2b</sub> , κ, Isotypenkontrolle, PE-gekoppelt	FACS	
Maus-anti-Rack1	IB	
Maus-anti-CapZ α	IB	
Maus-anti-AIM-1 (Aurora Kinase B)	IB, IF	
Maus-anti-β-Catenin	IB, IP	
Kaninchen-anti-Rpb2 (BL940)	IB	Bethyl Laboratories, Inc. (Montgomery, TX, USA)
Kaninchen-anti-Akt	IB	Cell Signaling Technology Inc. (Beverly, MA, USA)
Kaninchen-anti-phospho-Akt (Ser473) (193H12)	IB	
Kaninchen-anti-phospho-KIT (Tyr719)	IB	
Kaninchen-anti-phospho-GSK3α/β (Ser21/9)	IB	
Kaninchen-anti-phospho-Src Family (Tyr416) (100F9)	IB	
Kaninchen-anti-phospho-β-Catenin (Ser33/37/Thr41)	IB, IF	
Kaninchen-anti-phospho-β-Catenin (Thr41/Ser45)	IB, IF	
Ziege-anti-Kaninchen-Alexa Fluor® 594-konjugiert	IF	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
Ziege-anti-Maus-Alexa Fluor® 488-konjugiert	IF	
Ziege-anti-Kaninchen-HRP-konjugiert, F(ab') <sub>2</sub> Fragment	IB	Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA)
Ziege-anti-Maus-HRP-konjugiert, F(ab') <sub>2</sub> Fragment	IB	
Ziege-anti-Ratte-HRP-konjugiert, F(ab') <sub>2</sub> Fragment	IB	
Ratte-anti-Frizzled 4, biotinyliert	FACS, GA	R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, USA)
Maus-anti-EGFP	IF	Roche Applied Science (Indianapolis, IN, USA)
Kaninchen-anti-KIT (C-19)	IB	Santa Cruz Biotechnology (St. Cruz, CA, USA)
Kaninchen-anti-FLT3 (S-18)	IB	
Maus-anti-c-Src (17AT28)	IB	
Maus-anti-GSK3α/β (0011-A)	IB	
Kontroll-Maus-IgG	IP	
Maus-anti-β-Aktin (AC-40)	IB	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Maus-anti-α-Tubulin (DM1A)	IF	
Maus-anti-γ-Tubulin (GTU-88)	IF	
Kaninchen-anti-Rho GDI	IB	Upstate®, Millipore Co. (Billerica, MA, USA)

### 5.1.5. Enzyme und rekombinante Proteine

**Tabelle 6: Übersicht der in der Arbeit verwendeten Enzyme und rekombinanten Proteine.**

Protein/Enzym	Quelle
Aurora Kinase B, activ	Upstate®, Millipore Co. (Billerica, MA, USA)
DNase I	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Histon H3	Upstate®, Millipore Co. (Billerica, MA, USA)
humanes FL	Pepto Tech (Rocky Hill, NJ, USA)
murines DKK1	Kuhnert, F. et al (2004) <sup>216</sup>
murines IL3	Pepto Tech (Rocky Hill, NJ, USA)
murines IL6	Pepto Tech (Rocky Hill, NJ, USA)
murines SCF	Pepto Tech (Rocky Hill, NJ, USA)
Phusion DNA Polymerase	Finnzymes (Espoo, Finnland)
Restriktionsenzyme	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) und New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)

### 5.1.6. Vektoren und cDNA

**Tabelle 7: Verwendete Vektoren.**

Plasmid	Quelle/Referenz
c-myc del2	He, T. C. et al. (1998) <sup>123</sup>
c-myc del4	He, T. C. et al. (1998) <sup>123</sup>
pRL-Null	Promega Corporation (Madison, WI, USA)
pMY-IG	Onishi, M. et al. (1996); Kitamura, T. et al. (2003) <sup>217, 218</sup>
paulo-Gateway	Beissert, T. et al. (2008); Grignani, F. et al. (1998) <sup>219, 220</sup>
pcDNA3	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
pcDNA3-β-Catenin	war im Labor vorhanden
pcDNA3-dnTCF4	war im Labor vorhanden
pcDNA3-EGFP	war im Labor vorhanden
pGADT7	Clontech Laboratories, Inc. (Mountain View, CA, USA)
pAL-FLT3 wt	Mizuki, M. Et al. (2000) <sup>34</sup>
pAL-FLT3-ITD	Mizuki, M. et al. (2000) <sup>34</sup>
pAL-KIT wt	Corbacioglu, S. et al. (2006) <sup>63</sup>
pAL-KIT-ITD	Corbacioglu, S. et al. (2006) <sup>63</sup>
pMAM/BSL	KAKEN Pharmaceutical Co., Ltd. (New York City, NY, USA)
pENTR1A	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
pDEST™15	Invitrogen GmbH (Darmstadt)

**Tabelle 8: Verwendete cDNA.**

cDNA	Offizielles Gensymbol	GenBank Eintrag
Frizzled 4, <i>mus musculus</i>	<i>FZD4</i>	NM_008055
$\beta$ -Catenin, <i>homo sapiens</i>	<i>CTNNB1</i>	NM_001904
RNA Polymerase II, Polypeptid B, <i>homo sapiens</i>	<i>POLR2B</i>	BC023503
Rack1, <i>homo sapiens</i>	<i>GNB2L1</i>	BC032006
Capping protein $\alpha 2$ , <i>homo sapiens</i>	<i>CAPZA2</i>	NM_006136
Rho GDI $\beta$ , <i>homo sapiens</i>	<i>ARHGDIB</i>	NM_001175
Hämoglobin $\alpha 2$ , <i>homo sapiens</i>	<i>HBA2</i>	NM_000517

### 5.1.7. Oligonukleotide

**Tabelle 9: Oligonukleotide und Sonden für die Real-Time PCR.**

Oligonukleotid/Sonde mit Farbstoffen	Sequenz
fw-mu- $\beta$ -Catenin	ACTCCTGCACCCACCATCC
rev-mu- $\beta$ -Catenin	GGGCAAGGTTTCGAATCAA
mu- $\beta$ -Catenin, Probe FAM/TAMRA	ACTGGCCTCTGATAAAGGCAACTGTTGG
fw-mu-GAPDH	TTGTGCAGTGCCAGCCTC
rev-mu-GAPDH	CCAATACGGCCAAATCCG
mu-GAPDH, Probe VIC/TAMRA	TCCCGTAGACAAAATGGTGAAGGTCGGT
fw-mu-Frizzled 4	TGACAACTTTCACGCCGCT
rev-mu-Frizzled 4	AACCGAACAAGGAAGAACTGC
mu-Frizzled 4, Probe FAM/TAMRA	ATCCAGTACGGCTGCTCCAGCCAG

**Tabelle 10: Sequenzierprimer.**

Sequenzierprimer	Sequenz
1993-fw- $\beta$ -Catenin	ACCATTCCATTGTTTGTG
3'-rev- $\beta$ -Catenin	CAAGGAGACCTTCCATC
5'-fw- $\beta$ -Catenin	TTCAGAACTGTCTTTGGA
767-rev- $\beta$ -Catenin	TGTCTGGAAGCTTCCTT
BGH-rev	TAGAAGGCACAGTCGAGG
NT-rev- $\beta$ -Catenin	AGACTGTTGCTGCCAG
pENTR attL1-fw	CCTGTTAGTTAGTTACTTAAGCTCG
pENTR attL2-rev	TTGAGACACGGGCCAGAGCT
pMY-IG fw	CCCTCAAAGTAGACGGCATC
T7-fw	TAATACGACTCACTATAGGGC

**Tabelle 11: Oligonukleotide für Klonierungen.**

Primer	Sequenz	Zielvektor
5'-BamHI Rpb2	CGGGATCCCGATGGTGGCCATTGCATCATACT	pcDNA3
3'-EcoRI Rpb2	GGAATTCCTCTGACAATTCGTTCAATTC	pcDNA3
5'-KpnI Rack1	GGGGTACCCCATGGGCTGGGTACCCAGATC	pcDNA3
3'-NotI Rack1	ATTTGCGGCCGCTTTAGCCAGCAAACAGAGTTTAGC	pcDNA3
5'-EcoRI CapZ	GGAATTCATGGCGGATCTGGAGGAG	pcDNA3
3'-XhoI CapZ	CCCTCGAGGGTAGTGCCTGTAAGTGGCAC	pcDNA3
5'-BamHI RhoGDI	CGGGATCCCGATGACTGAAAAAGCCCCAGA	pcDNA3
3'-EcoRI RhoGDI	GGAATTCCTCATTCTGTCCACTCCTTCT	pcDNA3
5'-BamHI Frizzled 4	GGGGGATCCACCATGGCCTGGCCGGGCACAGG	pMY-IG
3'-NotI Frizzled 4	ATAAGAATGCGGCCGCTTATACCACAGTCTCGTTGC	pMY-IG
5'-EGFP blunt	ATGGTGAGCAAGGGCGAG	pENTR1A
3'-EGFP blunt	CTTGACAGCTCGTCCATG	pENTR1A
5'-SalI $\beta$ -Catenin	ACGCGTCGACATGGCTACTCAAGCTGATTTG	pENTR1A
3'-BamHI $\beta$ -Catenin	CGCGGATCCTTATGTGGCATGTTCTGCTACAT	pENTR1A
5'-SalI $\beta$ -Catenin ATG_Arm1	ACGCGTCGACATGCGTGCAATCCCTGAACTGA	pENTR1A
5'-SalI $\beta$ -Catenin ATG_Arm7	ACGCGTCGACATGGGTCTCCTTGGGACTCTTG	pENTR1A
3'-BamHI $\beta$ -Catenin Arm6_TAA	CGCGGATCCTTATGAAAGATTCCTGAGAGTCC	pENTR1A
3'-BamHI $\beta$ -Catenin Arm12_TAA	CGCGGATCCTTACTTGTCTCAGACATTCGG	pENTR1A

**Tabelle 12: Oligonukleotide für die zielgerichtete Mutagenese.**

Primer	Sequenz
<b><math>\beta</math>-Catenin wt <math>\rightarrow</math> S45E</b>	
BC t133g_c134a_t135a	GTGCCACTACCACAGCTCCTGAACTGAGTGGTAAAGGCAATCC
BC t133g_c134a_t135a_antisense	GGATTGCCTTTACCACTCAGTTCAGGAGCTGTGGTAGTGGCAC
<b><math>\beta</math>-Catenin S45E <math>\rightarrow</math> T41/S45E</b>	
BC S45E a121g_c122a_c123a	GACTCTGGAATCCATTCTGGTGCCACTGAAACAGCTCCTGAACT
BC S45E a121g_c122a_c123a_antisense	AGTTCAGGAGCTGTTTCAGTGGCACCAGAATGGATTCCAGAGTC
<b><math>\beta</math>-Catenin wt <math>\rightarrow</math> T41E</b>	
BC a121g_c122a_c123a	GACTCTGGAATCCATTCTGGTGCCACTGAAACAGCTCCTTCTCT
BC a121g_c122a_c123a_antisense	AGAGAAGGAGCTGTTTCAGTGGCACCAGAATGGATTCCAGAGTC
<b><math>\beta</math>-Catenin T41E <math>\rightarrow</math> S33/37/T41E</b>	
BC T41E t97g_c98a_t99a_t109g_c110a_t111a	GCAGCAACAGTCTTACCTGGACGAAGGAATCCATGAAGGTGCCAC TGAAACAGCTCCTT
BC T41E t97g_c98a_t99a_t109g_c110a_t111a_antisense	AAGGAGCTGTTTCAGTGGCACCTTCATGGATTCCCTTCGTCAGGT AAGACTGTTGCTGC

Primer	Sequenz
<b>β-Catenin wt → S45A</b>	
BC t133g	CACTACCACAGCTCCTGCTCTGAGTGGTAAAGG
BC t133g_antisense	CCTTTACCACTCAGAGCAGGAGCTGTGGTAGTG
<b>β-Catenin wt → S33A</b>	
BC t97g	AACAGTCTTACCTGGACGCTGGAATCCATTCTGGT
BC t97g_antisense	ACCAGAATGGATTCCAGCGTCCAGGTAAGACTGTT
<b>β-Catenin 33A → S33/37A</b>	
BC S33A t109g	CTGGACGCTGGAATCCATGCTGGTGCCAC
BC S33A t109g_antisense	GTGGCACCAGCATGGATTCCAGCGTCCAG
<b>β-Catenin S33/37A → S33/37/T41/S45A</b>	
BC S33/37A a121g_c123t_t133g	CATGCTGGTGCCACTGCTACAGCTCCTGCTCTGAGTGGTAAAG
BC S33/37A a121g_c123t_t133g_antisense	CTTTACCACTCAGAGCAGGAGCTGTAGCAGTGGCACCAGCATG

## 5.1.8. Bakterienstämme

**Tabelle 13: Verwendete *Escherichia coli* (*E.coli*) Stämme.**

Stamm	Genotyp	Verwendung
BL21(DE3)	F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	Expression von GST-Fusionsproteinen
DB 3.1	F- gyrA462 endA1 glnV44 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Smr) xyl5 Δleu mtl1	Amplifikation von Plasmiden, die das <i>ccdB</i> Gen tragen
DH5α	F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+), λ-	Plasmidamplifikation
XL-10 Gold	endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tetR F'[proAB lacIqZΔM15 Tn10(TetR Amy CmR)]	Amplifikation von Plasmiden nach Mutagenese PCR

### 5.1.9. Zelllinien

Soweit nicht anders angegeben wurden die aufgeführten Zelllinien von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH/DSMZ (Braunschweig) oder von der American Type Culture Collection/ATCC (Rockville, MD, USA) bezogen.

**Tabelle 14: Übersicht der in der Arbeit verwendeten Zelllinien.**

Zelllinie	Herkunft/Beschreibung, Referenz
32D Klon 3 (ACC 411)	murine myeloische Progenitorzelllinie, wächst IL3 abhängig <sup>221</sup>
HCT-116 (ACC 581)	humane Epithelialzelllinie, Dickdarmkarzinom <sup>222</sup>
HEK-293 (ACC 305)	humane, embryonale Nierenzelllinie, transformiert mit Adenovirus Typ 5 <sup>223</sup>
HeLa (ACC 57)	humane Epithelialzelllinie, Gebärmutterhalskrebs <sup>224</sup>
Jurkat (ACC 282)	humane Leukämiezelllinie, akute lymphatische Leukämie, T-Zell-Leukämie <sup>225</sup>
K562 (ACC 10)	humane Leukämiezelllinie, chronische myeloische Leukämie, Blastenkrise, exprimiert das Translokationsprodukt BCR/ABL (b3-a2) <sup>226</sup>
Kasumi-1 (ACC 220)	humane Leukämiezelllinie, akute myeloische Leukämie, exprimiert das Translokationsprodukt AML1/ETO <sup>227</sup>
KCL-22 (ACC 519)	humane Leukämiezelllinie, chronische myeloische Leukämie, exprimiert das Translokationsprodukt BCR/ABL (b2-a2) <sup>228</sup>
KG-1 (ACC 14)	humane Leukämiezelllinie, akute myeloische Leukämie <sup>229</sup>
L Cells (CRL-2648)	murine Fibroblastenzelllinie <sup>230</sup>
L WNT-3A (CRL-2647)	stabil transfizierte L Cells, die WNT3A exprimieren und den Liganden in das Medium abgeben <sup>230</sup>
ML1 (ACC 464)	humanes, follikuläres Schilddrüsenkarzinom <sup>231</sup>
MV4-11 (ACC 102)	humane Leukämiezelllinie, akute monozytäre Leukämie, exprimiert FLT3-ITD und das Translokationsprodukt MLL/AF4 (e9-e5) <sup>232</sup>
NB4 (ACC 207)	humane Leukämiezelllinie, akute promyelozytäre Leukämie, exprimiert das Translokationsprodukt PML/RAR $\alpha$ (L-Form) <sup>233</sup>
NIH3T3 (ACC 59)	murine, embryonale Fibroblastenzelllinie <sup>234</sup>
OCI-AML5 (ACC 247)	humane Leukämiezelllinie, akute myeloische Leukämie, Zytokin abhängig <sup>235</sup>
Platinum-E (PlatE) (Cell Biolabs, Inc. (San Diego, CA, USA))	eine von 293T abgeleitete Zelllinie, die stabil mit den retroviralen Strukturproteinen (gag, pol, ecotropic env) transfiziert wurde <sup>236</sup>
T-47D (HTB-133)	humane Brustkrebszelllinie <sup>237</sup>
U-87 MG (HTB-14)	humane Astrozytenzelllinie, Glioblastom Typ IV <sup>238</sup>
U937 (ACC 5)	humane, monozytäre Zelllinie, Burkitt-Lymphom <sup>239</sup>
WEHI-3B (ACC 26)	murine myelomonozytäre Leukämiezelllinie, produziert IL3 <sup>240</sup>

## 5.1.10. Medien

**Tabelle 15: Verwendete Zellkulturmedien und Zusätze.**

Medium, Zusätze	Bezugsquelle
DMED	GIBCO®, Invitrogen GmbH (Darmstadt)
Dulbecco's PBS (1 ×), steril	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Fötale Kälber Serum (FCS)	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
IMDM	Biochrom AG (Berlin)
IMDM-Pulver	GIBCO®, Invitrogen GmbH (Darmstadt)
L-Glutamin (200 mM)	GIBCO®, Invitrogen GmbH (Darmstadt)
Methylcellulose	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Pen/Strep (10000 U/mL, 10 mg/mL)	GIBCO®, Invitrogen GmbH (Darmstadt)
RPMI 1640 Medium	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
S.O.C. Medium	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
Trypsin-EDTA (10 ×)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

## 5.1.11. Geräte

**Tabelle 16: Verwendete Geräte.**

Gerät	Hersteller
AxioCam HRc	Carl Zeiss MicroImaging GmbH (Göttingen)
BioPhotometer	Eppendorf (Hamburg)
Mastercycler personal	Eppendorf (Hamburg)
Pulse Generator EPI 2500	Dr. L. Fischer (Heidelberg)
SONOPULS HD 2070	Bandelin GmbH & Co. KG (Berlin)
Thermomixer Comfort	Eppendorf (Hamburg)

## 5.1.12. Software

**Tabelle 17: Verwendete Software.**

Programm	Hersteller/Quelle
Adobe Illustrator®	Adobe Systems Inc. (San Jose, CA, USA)
Adobe Photoshop®	Adobe Systems Inc. (San Jose, CA, USA)
AxioVision 3.0	Carl Zeiss MicroImaging GmbH (Göttingen)
Cellquest®	Becton Dickinson (Heidelberg)
ExpASY Proteomics Server	<a href="http://www.expasy.org/">http://www.expasy.org/</a>
FCS Express 3	De Novo Software (Los Angeles, CA, USA)
MS Office 2007	Microsoft®
NCBI Blast	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
PANTHER Classification System	<a href="http://www.pantherdb.org/">http://www.pantherdb.org/</a>
Primer Express® 3.0	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
PubMed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
QuikChange Primer Design	<a href="http://www.stratagene.com/qcprimerdesign">http://www.stratagene.com/qcprimerdesign</a> , Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, CA, USA)
SPSS (Statistical Package for the Social Science)	SPSS, Inc. (Chicago, IL, USA)
The Gene Ontology	<a href="http://www.geneontology.org/">http://www.geneontology.org/</a>
Uniprot	<a href="http://www.uniprot.org/">http://www.uniprot.org/</a>

## 5.2. Methoden

### 5.2.1. Molekularbiologische Methoden

#### 5.2.1.1. Herstellung chemokompetenter Bakterienzellen

Die Herstellung transformationskompetenter *Escherichia coli* erfolgte für die Stämme DH5 $\alpha$ , BL21 und DB3.1 nach der Calciumchlorid Methode. Hierzu wurde eine 400 mL LB-Kultur angeimpft und bei 37 °C und 225 rpm geschüttelt. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5 wurde die Kultur für 10 min auf Eis gestellt, um das Bakterienwachstum zu stoppen. Die Suspension wurde zentrifugiert (4 °C, 15 min, 3500 rpm), das Zellpellet vorsichtig in 160 mL CaCl<sub>2</sub>-Puffer aufgenommen und 25 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die chemokompetenten Bakterien in 11 mL CaCl<sub>2</sub>-Puffer resuspendiert und mit 2 mL Glycerol versetzt. Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

#### 5.2.1.2. Transformation von kompetenten Bakterienzellen

50  $\mu$ L chemokompetenter *E. coli* wurden mit der Plasmid DNA 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (1 min, 42 °C) erfolgte die Zugabe von 500  $\mu$ L SOC-Medium. Die Bakteriensuspension wurde für 60 min bei 37 °C und 225 rpm geschüttelt, anschließend auf einer LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die Transformation der *E. coli* XL-10 Gold erfolgte nach Herstellerangaben.

#### 5.2.1.3. Plasmidpräparation aus Bakterienzellen

Die Isolierung von Plasmid DNA aus Bakterien erfolgte mit Hilfe des JET star 2.0 Plasmid Purification MAXI Kits (Genomed, Löhne) oder des Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research, Orange, CA, USA) gemäß Herstellerangaben. Die gewonnene DNA wurde im Anschluß verdaut und im Agarosegel aufgetrennt, um Verunreinigungen und Degradation auszuschließen und die aufgereinigten Plasmide zu charakterisieren.

#### 5.2.1.4. Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden die cDNAs von Frizzled 4, EGFP,  $\beta$ -Catenin und den verschiedenen Proteinen, die im *yeast two hybrid screen* als  $\beta$ -Catenin Interaktionspartner identifiziert worden sind, mit Linkern versehen bzw. ausschließlich

bestimmte Domänen von  $\beta$ -Catenin (Deletionsmutanten) für die Klonierung amplifiziert. Die Linker enthielten Schnittstellen für die entsprechenden Restriktionsenzyme, so dass im Anschluß an die PCR die Produkte verdaut und dann in den Zielvektor eingebracht werden konnten. Um die Fehlerrate bei der Amplifikation so gering wie möglich zu halten, wurde die Phusion DNA Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finnland) eingesetzt (Fehlerrate von  $4,4 \cdot 10^{-7}$ ). Alle Konstrukte wurden im Anschluß an die Klonierung sequenziert.

Folgende Standardbedingungen wurden für einen 20  $\mu$ L PCR Ansatz gewählt:

DNA Template	10 ng
5 $\times$ Phusion HF Puffer	4 $\mu$ L
10 mM dNTPs	0,4 $\mu$ L
fw-Primer, 10 $\mu$ M	1 $\mu$ L
rev-Primer, 10 $\mu$ M	1 $\mu$ L
Phusion Polymerase (2 U/ $\mu$ L)	0,2 $\mu$ L
Wasser	aufgefüllt auf 20 $\mu$ L

Die PCR wurde in einem *Mastercycler personal* (Eppendorf, Hamburg) nach dem in Tabelle 18 beschriebenen allgemeinen Programm durchgeführt.

**Tabelle 18: PCR Standardprogramm.**

Schritt	Temperatur/ $^{\circ}$ C	Dauer/min:s	Zyklen
Initiale Denaturierung	98	0:30	1
Denaturierung	98	0:10	
Primeranlagerung	58	0:10	30
Elongation	72	0:30/1 kb	
Finale Elongation	72	10:00	1
Lagerung	4	$\infty$	1

Die Primer wurden so gewählt, dass sie eine Anlagerungstemperatur von 58-60  $^{\circ}$ C aufwiesen. Die Berechnung der Temperatur erfolgte anhand folgender Näherungsformel für die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) doppelsträngiger DNA:  $T_m = 2^{\circ}\text{C} (A + T) + 4^{\circ}\text{C} (C + G)$ .

#### 5.2.1.5. Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen hydrolysieren sequenzspezifisch DNA Moleküle. Zur Charakterisierung von DNA Konstrukten wurde 1  $\mu$ L der Plasmidpräparation für 1 h bei 37  $^{\circ}$ C verdaut. Um DNA Fragmente für weitere Klonierungsschritte zu generieren, wurden 10 bis 20  $\mu$ g Plasmid DNA oder 20  $\mu$ L einer PCR Reaktion für mindestens 5 h bei 37  $^{\circ}$ C mit

entsprechenden Restriktionsenzymen inkubiert. Die Enzyme wurden von New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) und Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) bezogen.

### 5.2.1.6. *Ligation*

Die Ligation von zwei DNA Fragmenten wurde mit der T4 Ligase von New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C durchgeführt. Standardmäßig wurde 1 µL T4 Ligase mit 20 ng Plasmid DNA und einem dreifachen Überschuß an Insert DNA in einer 10 µL Reaktion gemischt. Die einzusetzende Menge an Insert ergibt sich dabei aus folgender Formel:

$$\frac{\text{Masse Vektor} \cdot \text{Größe Insert}}{\text{Größe Vektor}} \cdot 3 = \text{Masse Insert}$$

5-7 µL der Ligasereaktion wurden zur Transformation chemokompetenter DH5α Zellen eingesetzt.

### 5.2.1.7. *Zielgerichtete Mutagenese*

Die Stabilität, Funktion und Lokalisation von β-Catenin wird durch Phosphorylierung bestimmter Serin-, Threonin- und Tyrosinreste reguliert<sup>204, 241</sup>. Zielgerichtete Mutagenese von Threonin- und Serinresten zu Alanin verhindert eine mögliche Phosphorylierung, während der Austausch durch Glutamat die Phosphorylierung des Aminosäurerests imitiert.

Die Punktmutanten von β-Catenin wurden mit Hilfe des QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kits (Stratagene™ Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) hergestellt und die Mutageneseprimer unter Verwendung des QuikChange Primer Design Programms (<http://www.stratagene.com/qcprimerdesign>) ausgesucht. Das Plasmid pENTR1A-β-Catenin diente als Template in folgendem PCR Ansatz:

10 × Reaktionspuffer	2,5 µL
Template	~ 20 ng
sense-Primer (10 µM)	0,625 µL
antisense-Primer (10 µM)	0,625 µL
dNTP Mix	0,5 µL
QuikSolution	1,5 µL
Wasser	aufgefüllt auf 25 µL

Nach Zugabe von 0,5 µL Pfu Turbo Polymerase wurde das Template im *RoboCycler 96* (Stratagene™ Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) unter den vom Hersteller empfohlenen Standardbedingungen amplifiziert. Entsprechend der Größe des Templates

wurde eine Elongationsdauer von 5 min gewählt. Der Verdau des methylierten, nicht mutierten Ausgangsplasmids mit DpnI sowie die Transformation der im Kit enthaltenen *E. coli* XL-10 Gold ultrakompetenten Bakterien wurde strikt nach Herstellerangaben durchgeführt.

#### 5.2.1.8. DNA Sequenzierung

Die DNA Sequenzierung wurde von SeqLab Sequence Laboratories (Göttingen) als Extended HotShot Reaktion übernommen. Hierzu wurden ca. 600 ng Plasmid DNA und 20 pmol Sequenzierprimer in einem 7 µL Maßstab gemischt und eingesendet. Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte mit Hilfe der Software BioEdit Sequence Alignment Editor<sup>242</sup>.

#### 5.2.1.9. Gateway-Klonierung

Die Gateway® Technologie (Invitrogen GmbH, Darmstadt) basiert auf dem sequenzspezifischen DNA Rekombinationssystem des Bakteriophagen λ. Es ermöglicht die unidirektionale Klonierung eines DNA Fragments von einem sogenannten *Entry* Vektor (*Entry Clone*) in eine Vielzahl von *Destination* Vektoren ohne weitere Restriktions- und Ligationsschritte<sup>243-245</sup>. Da *Entry* und *Destination* Plasmide unterschiedliche Antibiotikaresistenzen vermitteln und Vektoren, die keine Rekombinasereaktion eingehen, das *ccdB* Gen tragen, welches das Wachstum von *E. coli* Zellen inhibiert<sup>246, 247</sup>, zeichnet sich dieses System zudem durch seine hohe Effizienz aus.

Der Ansatz für eine Rekombinasereaktion wurde wie folgt zusammengesetzt:

<i>Entry Clone</i>	300 ng
<i>Destination</i> Vektor	300 ng
5 × LR Clonase Reaktionspuffer	2 µL
Wasser	aufgefüllt auf 9 µL
LR Clonase® Enzym Mix	1 µL

Die Reaktion erfolgte bei Raumtemperatur für 1 h und 5 µL des Ansatzes wurden für die Transformation in *E. coli* DH5α eingesetzt.

#### 5.2.1.10. Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese wurden DNA Fragmente aus PCR Reaktionen oder Restriktionsverdauen charakterisiert und isoliert. Die Gele wurden mit 0,8-2 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer hergestellt und die Proben sowie der DNA Standard (GeneRuler™

1kb Ladder Plus, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) in einer horizontalen Elektrophoresekammer aufgetrennt. Die DNA wurde mit GelRed™ (Biotium, Inc., Hayward, CA, USA) oder Ethidiumbromid angefärbt und im UV-Licht analysiert.

#### *5.2.1.11. Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen*

DNA Fragmente, die für die Klonierung eingesetzt werden sollten, wurden per Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, ausgeschnitten und mit Hilfe des Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, Orange, CA, USA) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die DNA wurde in 10 µL Wasser von der Säule eluiert.

#### *5.2.1.12. RNA Isolierung*

Zur Isolierung der Gesamt-RNA von Suspensionszellen wurden  $1 \cdot 10^7$  Zellen pelletiert (5 min,  $400 \times g$ , Raumtemperatur), in 1 mL TRIzol® Reagenz (Invitrogen GmbH, Darmstadt) resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µL Chloroform wurden die Ansätze für ca. 15 s geschüttelt, erneut für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei  $12000 \times g$  und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  für 15 min zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde zusammen mit 500 µL Isopropanol gemischt und die RNA für 10 min bei Raumtemperatur gefällt. Durch Zentrifugation ( $12000 \times g$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , 10 min) wurde die RNA pelletiert, zweimal mit 75 % Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde in mind. 20 µL RNase freiem Wasser aufgenommen und für 10 min bei  $58 \text{ }^\circ\text{C}$  gelöst.

#### *5.2.1.13. DNase Behandlung und reverse Transkription*

Vor der reversen Transkription wurde die eingesetzte RNA einer DNase Behandlung unterworfen, um eventuelle DNA Kontamination auszuschließen. Dazu wurde 1 µg RNA mit 1 µL DNase I (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) entsprechend Herstellerangaben inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 1 µl 50 mM EDTA und Erhitzen gestoppt.

Der Reaktionsansatz wurde direkt zur reversen Transkription mit dem RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) eingesetzt. Die cDNA wurde nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll mit *random* Primern synthetisiert und die cDNA Lösung am Ende 1:5 mit DNase freiem Wasser verdünnt. Sie wurde direkt für die Real-Time PCR eingesetzt.

### 5.2.1.14. Real-Time PCR

Real-Time PCR ermöglicht die relative Quantifizierung von cDNA durch sequenzspezifische Primer und lässt somit direkt Rückschlüsse auf das Expressionslevel der anfänglich eingesetzten mRNA zu. Das Prinzip der Real-Time PCR basiert entweder auf der Einlagerung von Fluoreszenzfarbstoffen in den DNA Doppelstrang (SYBR Green Format) oder der Freisetzung fluoreszenzmarkierter Nukleotide während der Amplifikation (TaqMan Probe Format). Die Messung der Fluoreszenzsignale erfolgt simultan und wird als Amplifikationskurve an einem angeschlossenen Computer dargestellt.

Bei der Messung mit TaqMan Probe Format wird neben zwei Primern eine spezielle Sonde (Probe) eingesetzt, die zwischen den beiden Primern an die DNA Matrize bindet. Die Sonde trägt am 5'-Ende den fluoreszierenden Reporterfarbstoff 6-Carboxyfluorescein (FAM) und am 3'-Ende den Quencher-Farbstoff 6-Carboxytetramethyl-Rhodamin (TAMRA), der, solange er sich in räumlicher Nähe zum Reporterfarbstoff befindet, dessen Fluoreszenz absorbiert. In der Extensionsphase der PCR wird die Sonde von der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der DNA Polymerase abgebaut, wodurch Reporter- und Quencher-Farbstoff freigesetzt werden. Im Fall des SYBR Green Formats enthalten die Reaktionsansätze Fluoreszenzfarbstoffe wie SYBR Green I, die sich in die kleine Furche der DNA einlagern können, wodurch die von ihnen emittierte Fluoreszenz bei identischer Anregungsintensität vielfach verstärkt wird. In beiden Fällen, SYBR Green und TaqMan Probe Format, ist die Signalstärke somit direkt proportional zur Anzahl vorhandener Doppelstränge.

**Tabelle 19: Reaktionsansätze für die Real-Time PCR.**

	TaqMan Probe Format	SYBR Green Format
2 × MasterMix	6,25 µL	6,25 µL
fw-Primer, 10 µM	0,3 µL	0,3 µL
rev-Primer, 10 µM	0,3 µL	0,3 µL
Sonde, 5 µM	0,3 µL	-
Wasser	2,85 µL	3,15 µL

Zur relativen Quantifizierung verschiedener cDNAs wurden die in Tabelle 19 beschriebenen 10 µL Ansätze zusammengesetzt und in einer 96-Loch-Platte vorgelegt. Als MasterMix wurden Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) und Maxima™ Probe/ROX qPCR Master Mix (2X) (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) verwendet. Nach Zugabe von 2,5 µL cDNA Lösung wurden die Proben am ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) gegen eine Verdünnungsreihe gemessen und mit

Hilfe der zugehörigen Software (Sequence Detection System 2.3) ausgewertet. Als endogene Referenz wurde die Expression der Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) gemessen.

Das Standard Real-Time PCR Programm ist in Tabelle 20 dargestellt. Da die zu amplifizierende Sequenz nur wenige Nukleotide umfaßte, wurde bei der Erstellung des Programms auf einen zusätzlichen Extensionsschritt bei 72 °C verzichtet.

**Tabelle 20: Standardprogramm für die Real-Time PCR.**

Schritt	Temperatur/°C	Dauer/min:s	Zyklen
UDG Vorbehandlung	50	2:00	1
Initiale Denaturierung	95	10:00	1
Denaturierung	95	0:15	40
Primeranlagerung	60	1:00	

### 5.2.1.15. Luziferaseassay

Zellen wurden wie unter 5.2.2.10. beschrieben transfiziert und über Nacht inkubiert. Der Luziferaseassay wurde mit Hilfe des Dual-Luciferase® Reporter Assay Systems (Promega GmbH, Mannheim) nach Herstellerangaben am Luminometer TD-20/20 (Turner Designs, Inc., Sunnyvale, CA, USA) bei einer Sensitivität von 60 % durchgeführt. Nacheinander wurde die Expression der Luziferasegene *Firefly* aus *Photinus pyralis* (LARII) und *Renilla* aus *Renilla reniformis* (S&G) gemessen. *Renilla* wird promotorlos vom pRL-Null Plasmid exprimiert und dient als Kontrollreporter<sup>248, 249</sup>. Zur Untersuchung der  $\beta$ -Catenin vermittelten Aktivierung von TCF Transkriptionsfaktoren wurde ein Konstrukt verwendet, bei dem *Firefly* als Reportergen unter der Kontrolle des c-Myc Promotors mit zwei TCF bindenden Elementen (TBE) steht. Die Messergebnisse wurden abschließend durch Division der *Firefly*- durch die *Renilla*-Werte normalisiert.

## 5.2.2. Zellbiologische Methoden

Eukaryotische Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C in wasserdampf-gesättigter Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub>-Anteil kultiviert. Falls nicht anders angegeben wurden die Zellen für 5 min bei 400 × g und 4 °C bzw. Raumtemperatur zentrifugiert. Alle sterilen Arbeiten wurden an der Cleanbench Herasafe (Heraeus Sepatech, Osterode) durchgeführt.

### 5.2.2.1. Kultivierung von Suspensionszellen

Suspensionszellen wurden in RPMI 1640 mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS (20 % (v/v) FCS bei Kasumi-1 und KG-1), 0,1 mg/mL Penicillin/Streptomycin und 2 mM Glutamin kultiviert.

Das Medium der IL3 abhängig wachsenden Zelllinie 32D enthielt zusätzlich 10 % (v/v) WEHI Überstand. Die Zellen wurden in einer Dichte von 0,1-1·10<sup>6</sup>/mL kultiviert. Um den Einfluss von wildtypischen und mutierten Rezeptortyrosinkinasen auf die β-Catenin Stabilität zu untersuchen, wurden 32D Zellen dreimal mit PBS gewaschen, anschließend in einer Dichte von 0,5·10<sup>6</sup>/mL in WEHI freiem Medium ausgesät und über Nacht kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen erneut gezählt, als 0,5·10<sup>6</sup>/mL ausgesät und wie angegeben stimuliert.

### 5.2.2.2. Kultivierung von adhärennten Zellen

Adhärennte Zelllinien wurden in DMEM mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem FCS, 0,1 mg/mL Penicillin/Streptomycin und 2 mM Glutamin kultiviert. Um eine Kultur zu expandieren oder zu splitten, wurde das Medium abgenommen, die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und mit einer 1 × Trypsin/EDTA-Lösung bei 37 °C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden im fünffachen Volumen DMEM resuspendiert und ausgesät.

Plat-E Zellen wurden regelmäßig für sieben Tage mit 10 µg/mL Blasticidin und 1 µg/mL Puromycin selektioniert.

### 5.2.2.3. Gewinnung von WEHI Überstand (10 × WEHI)

WEHI-3B Zellen produzieren das Zytokin Interleukin 3 (IL3). Das konditionierte Medium kann 32D Zellen als IL3 Quelle dienen. Hierzu wurden WEHI-3B in IMDM (10 % (v/v) FCS, 0,1 mg/mL Penicillin/Streptomycin, 2,5 nM β-Mercaptoethanol) kultiviert. Der Überstand wurde jeden zweiten Tag entnommen. Nach Zentrifugation und Sterilisation konnte das 10 × WEHI bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

#### 5.2.2.4. Gewinnung von Kontroll konditioniertem und WNT3A konditioniertem Medium

Kontroll konditioniertes und WNT3A konditioniertes Medium wurde aus dem Überstand der murinen Fibroblastenzelllinie L Cell oder L WNT-3A gewonnen. Die Zellen wurden in DMEM mit 10 % (v/v) FCS, 4 mM Glutamin und 0,1 mg/mL Penicillin/Streptomycin bis zur Konfluenz kultiviert, dann 1:30 gesplittet und in 10 mL komplementiertem DMEM ausgesät. Nach vier Tagen wurde der erste Überstand genommen (Charge 1) und die Zellen für weitere drei Tage in 10 mL DMEM inkubiert. Das Medium wurde erneut abgenommen (Charge 2), die Chargen sterilfiltriert, im Verhältnis 1:2 gemischt und bei -20 °C gelagert. Das konditionierte Medium wurde 50 %ig in den Zellkulturmedien eingesetzt.

#### 5.2.2.5. Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen

Zur Cryokonservierung von Zelllinien wurden  $1-1,5 \cdot 10^7$  Zellen zentrifugiert, der Überstand vollständig verworfen und das Pellet in 1 mL Einfriermedium (90 % (v/v) hitzeinaktiviertes FCS, 10 % (v/v) DMSO) aufgenommen. Die Suspension wurde in ein Cryoröhrchen überführt und für mindestens 48 h in einem Cryoeinfriergerät bei -80 °C gelagert. Für die langfristige Lagerung der Zellen wurden die Cryoröhrchen anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

Gefrierkulturen von eukaryotischen Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in 10 mL des entsprechenden Zellkulturmediums aufgenommen, zentrifugiert und die Zellen in frischem Medium ausgesät.

#### 5.2.2.6. Calciumphosphat Transfektion

18 h vor der Transfektion wurden  $2,5-3 \cdot 10^6$  Plat-E Zellen auf einer 10 cm Petrischale ausgesät. Am Tag der Transfektion wurde das alte Medium abgenommen und 9 mL frisches DMEM (10 % (v/v) FCS) und 2,5 µL 0,1 M Chloroquin auf die Zellen gegeben. In einem sterilen Reaktionsgefäß wurden 5 µg Plasmid DNA in 438 µL Wasser und 62 µL 2 M CaCl<sub>2</sub> Lösung zusammengefügt. Unter kräftigem Mischen wurden tropfenweise 500 µL 2 × HBS dazugegeben. Die Bildung der Calciumphosphat/DNA Präzipitate erfolgte bei Raumtemperatur. Nach 10-15 min wurde 1 mL des Präzipitats auf die Zellen gegeben. Nach 6-8 h Inkubation wurde das Medium erneut gewechselt.

### 5.2.2.7. *Herstellung retroviraler Überstände*

Plat-E Zellen wurden entsprechend der Calciumphosphat Methode mit einem retroviralen Expressionsvektor transfiziert. 30 h nach der Transfektion wurde der Überstand verworfen und 7,5 mL DMEM (2 % (v/v) FCS) auf die Zellen gegeben. Nach 24 h wurde das Medium (erster retroviraler Überstand) abgenommen, sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert. Die Zellen wurden für weitere 24 h in frischem DMEM (2 % (v/v) FCS) kultiviert, bevor der zweite retrovirale Überstand genommen, sterilfiltriert und mit dem ersten retroviralen Überstand vereinigt wurde. Nach Zugabe von 5 µg/mL Polybrene konnten die vereinigten Überstände direkt für die Infektion muriner Zellen eingesetzt, für einige Tage bei 4 °C gelagert oder in Aliquots bei -80 °C für eine längere Lagerung eingefroren werden.

### 5.2.2.8. *Infektion muriner Zellen mit retroviralen Überständen*

32D Zellen wurden gezählt und  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen in 1,5 mL retroviralem Überstand aufgenommen. Jeweils 0,5 mL der Zellsuspension wurden in ein Loch einer Sechsfachkulturplatte gegeben und bei 32 °C und 2200 rpm für 45 min zentrifugiert. Nach 3 h Inkubation im Brutschrank wurden die Überstände abgenommen, zentrifugiert, die pelletierten Zellen erneut in 1,5 mL retroviralem Überstand resuspendiert und wie oben beschrieben in derselben Sechsfachkulturplatte zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen wieder für 3 h und nach Zugabe von 4,5 mL Medium mit WEHI in einer Endkonzentration von 10 % (v/v) weitere 48 h unter optimalen Bedingungen inkubiert. Die Infektionseffizienz wurde durchflußzytometrisch überprüft.

### 5.2.2.9. *Durchflußzytometrische Analysen (FACS Analyse)*

Die Durchflußzytometrie fand Anwendung, um einerseits die Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) oder von GFP gekoppelten Proteinen, zum Beispiel nach retroviraler Infektion, zu messen und um andererseits die Oberflächenexpression von FLT3, KIT, Frizzled 4 und *nerve growth factor receptor* (NGFR) auf stabil transfizierten bzw. infizierten 32D Zellen zu bestimmen. Die Messungen erfolgten entweder am FACScan oder FACS Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg). GFP exprimierende Zellen wurden aus der Kultur entnommen und direkt analysiert. Oberflächenmoleküle wurden zunächst mit den angegebenen Antikörpern gefärbt und dann gegen eine Isotypenkontrolle gemessen.

### 5.2.2.10. Elektroporation von 32D Zellen

Um stabil transfizierte Zellen zu erhalten, wurden  $1 \cdot 10^7$  32D Zellen mit 30  $\mu\text{g}$  pAL-KIT, pAL-KIT-ITD, pAL-FLT3 oder pAL-FLT3-ITD und 600 ng pMAM/BSD (Kaken Pharmaceutical Co., Ltd., New York City, NY, USA) als Selektionsmarker in 300  $\mu\text{L}$  RPMI in einer 4 mm Elektroporationsküvette auf Eis gemischt und bei 330 V und 960  $\mu\text{F}$  elektroporiert und sofort wieder auf Eis gestellt. Die Zellen wurden in 10 mL RPMI (10 % (v/v) FCS, 10 % (v/v) WEHI) aufgenommen und nach 24-36 h für sieben Tage mit 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Blasticidin selektioniert. Die Expression der Rezeptortyrosinkinasen wurde anschließend durchflußzytometrisch oder mittels SDS-PAGE (siehe 5.2.3.6) analysiert.

$1 \cdot 10^5$  stabil transfizierte 32D KIT-ITD Zellen wurden mit 10  $\mu\text{g}$  pcDNA3 oder pcDNA3-dnTCF4 in 300  $\mu\text{L}$  RPMI gemischt und wie oben beschrieben elektroporiert. Über Nacht wurden die Zellen in RPMI (10 % (v/v) FCS, 10 % (v/v) WEHI) kultiviert und am nächsten Tag für Kolonieassays eingesetzt.

Für Luziferaseassays wurden  $3 \cdot 10^6$  32D Zellen, die stabil KIT oder KIT-ITD exprimierten, in 400  $\mu\text{L}$  RPMI 1640 (10 % (v/v) FCS) aufgenommen und in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Zellsuspension wurde mit 10  $\mu\text{g}$  c-Myc Reporterplasmid, das entweder zwei TCF4 Bindungsstellen (c-myc del2) aufwies oder dem diese Bindungsstellen fehlten (c-myc del4), und 1  $\mu\text{g}$  *Renilla* Luziferase Vektor (pRL-Null) versetzt. Die Elektroporation erfolgte im Pulse Generator EPI 2500 (Dr. L. Fischer, Heidelberg) bei 330 V, 960  $\mu\text{F}$  und einer Impulsdauer von 6 ms. Die Ansätze wurden 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend in RPMI 1640 (10 % (v/v) FCS) aufgenommen und über Nacht ohne Zytokine, mit 10 ng/mL SCF oder mit 1 ng/mL IL3 im Brutschrank inkubiert.

### 5.2.2.11. Kolonieassay

32D KIT-ITD, die am Vortag mit pcDNA3 oder pcDNA3-dnTCF4 transfiziert worden waren (5.2.2.10.), wurden einmal in 5 mL IMDM gewaschen, in 2-3 mL IMDM aufgenommen und gezählt. Die Zellzahl wurde auf  $1 \cdot 10^4/\text{mL}$  eingestellt. Für einen dreifachen Ansatz wurden 2 mL Methylcellulose, 920  $\mu\text{L}$  FCS (1 % (v/v) Glutamin), 1,22 mL IMDM, 460  $\mu\text{L}$  Zellsuspension und 0,5 mg/mL G418 gemischt und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Jeweils 1 mL der Ansätze wurde auf einer 35 mm Petrischale verteilt. Nach 10 Tagen Inkubation im Brutschrank wurden die Kolonien (> 50 Zellen) gezählt.

### 5.2.2.12. Zytozentrifugation

Adhärente Zellen können auf Deckgläschen wachsen und so für verschiedene mikroskopische Analysen bereitgestellt werden. Im Fall von Suspensionszellen ist dies nicht möglich. Sie können jedoch durch Zytozentrifugation auf Objektträger aufgebracht werden, wobei man die Zellen als Einzelschicht erhält, während das Medium über ein Filterpapier abgesaugt wird.

Die zu untersuchenden Suspensionszellen wurden in Abhängigkeit von der Zellgröße in einer Dichte von  $0,5-1 \cdot 10^6/\text{mL}$  in RPMI 1640 mit 10 % (v/v) FCS aufgenommen. 100-200  $\mu\text{L}$  der Suspension wurden für die Zytozentrifugation in der Shandon Cytospin 2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) eingesetzt. Die Zellen wurden für 10 min bei 1000 rpm auf Objektträger zentrifugiert und anschließend für 5-10 min bei Raumtemperatur getrocknet.

### 5.2.2.13. Isolation von murinem Knochenmark

Oberschenkelknochen und Schienbein von C57BL6 Mäusen wurden frei von Gewebe präpariert und in kaltem PBS gelagert. Unter einer Sterilbank wurden Knochenkopf und unteres Ende entfernt und das Knochenmark mit Hilfe von einer Spritze (Kanüle 27G) und PBS (5 % (v/v) FCS) aus dem Knochen gespült. Die Zellen wurden vereinigt durch ein Zellsieb filtriert, um sie zu vereinzeln und anderes Gewebe abzutrennen, und dann einmal mit PBS (5 % (v/v) FCS) gewaschen (5 min, 1000 rpm, 4 °C). Erythrozyten wurden mittels AKC-Lyse entfernt. Dazu wurden die Knochenmarkszellen nach dem Waschen in 10 mL eiskaltem AKC-Lysispuffer resuspendiert, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann für 5 min und  $200 \times g$  bei Raumtemperatur pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, verworfen und die Zellen wurden erneut in PBS (5 % (v/v) FCS) gewaschen, bevor sie über Nacht in IMDM (30 % (v/v) FCS, 0,5 % (w/v) BSA, 100  $\mu\text{M}$   $\beta$ -Mercaptoethanol, 10 ng/mL IL3, 10 ng/mL IL6, 50 ng/mL SCF) kultiviert worden sind. Am nächsten Tag wurden die Knochenmarkszellen für die Herstellung von Proteinlysaten (5.2.3.3) eingesetzt.

## 5.2.3. Proteinbiochemische Methoden

### 5.2.3.1. Immunfluoreszenzfärbung

Für Immunfluoreszenzfärbungen von adhärenenten Zellen wurden  $0,5 \cdot 10^6$  NIH3T3 in einem Loch einer Sechsfachkulturplatte auf einem Deckgläschen ausgesät und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt und die Deckgläschen kurz bei Raumtemperatur getrocknet. Suspensionszellen wurden mittels Zytozentrifugation für die Färbung vorbereitet.

In beiden Fällen wurden die Zellen 30 min bei Raumtemperatur mit 4 % (w/v) Paraformaldehyd (in PBS) fixiert, kurz mit TBS gewaschen und dann für 45 min in IF-Blocking Puffer permeabilisiert und geblockt. Die Zellen wurden wieder kurz mit TBS gewaschen und anschließend mit dem ersten Antikörper in IF-AK Puffer über Nacht bei 4 °C gefärbt. Die Proben wurden 3 mal für 15 min mit TBS gewaschen, mit einem Alexa Fluor 488 (grün) oder Alexa Fluor 594 (rot) gekoppelten Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und erneut 3 mal mit TBS und einmal mit Wasser gewaschen. Mit Hilfe von Hoechst 33342 (0,1 mM in Wasser) wurde die DNA gefärbt und die Zellen mittels Mowiol 4-88 eingedeckt. Nach einer Trocknungszeit von mind. 12 h bei 4 °C wurden die Immunfluoreszenzfärbungen unter dem Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen) bei tausendfacher Vergrößerung betrachtet und fotografiert.

### 5.2.3.2. Herstellung von Proteinlysaten aus Zelllinien

Zur Herstellung von Proteinlysaten wurden die Zellen abzentrifugiert, das Pellet einmal mit PBS gewaschen und in 50-200  $\mu$ L *Radioimmunoprecipitation assay* (Ripa) Puffer resuspendiert. Der Puffer wurde zuvor mit Protease- und Phosphataseinhibitoren komplementiert: Complete, EDTA-free (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) nach Herstellerangaben, 1  $\mu$ M Pepstatin A und 1 mM Natriumorthovanadat. Die Proben wurden für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 20-30 min bei 4 °C und mind. 12000  $\times$  g zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde bei -80 °C eingefroren oder direkt für weitere Experimente verwendet.

Proteinlysate, die für Immunpräzipitationen (IP) und GST Pull-down eingesetzt werden sollten, wurden nach einem ähnlichen Protokoll, jedoch in anderen Puffern hergestellt. Für Immunpräzipitationen kam ein veränderter Ripa-Puffer (IP-Ripa) zum Einsatz, Lysate für GST Pull-down wurden in Binding Buffer<sup>194</sup> hergestellt. In beiden Fällen wurde die Lyse

dadurch unterstützt, dass die Zellen für 30 min bei 4 °C rotiert wurden. Die Lysate wurden nicht eingefroren, sondern direkt weiterverwendet.

### 5.2.3.3. *Herstellung von Proteinlysaten aus Mausgewebe*

Nach Entnahme von Leber, Lunge, Milz und Niere aus C57BL6 Mäusen wurden die Organe in flüssigem Stickstoff eingefroren und über Nacht bei -80 °C gelagert. Teile der tiefgefrorenen Organe und des Mausknorpelmarks wurden in 200 µL Gewebelysispuffer aufgenommen und bei Raumtemperatur am Sonopuls HD 2070 (Bandelin GmbH & Co. KG, Berlin) homogenisiert (20 %, 20 s, 5 Zyklen, 2 Wiederholungen). Die Lysate wurden für 3 min bei 95 °C erhitzt und anschließend bei 4 °C und 14000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde zur weiteren Verwendung in neue Reaktionsgefäße überführt.

### 5.2.3.4. *Bestimmung der Proteinkonzentration (BCA Test)*

Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe des Pierce BCA Protein Assays (Thermo Fisher Scientific, Inc., Rockford, IL, USA) gegen eine Rinderserumalbumin (BSA) Standardreihe gemessen. Die BCA Lösung wurde entsprechend Herstellerangaben präpariert, 500 µL der Lösung vorgelegt und zusammen mit 5 µL Proteinlysat bzw. BSA Standard für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 562 nm am BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) gemessen und die Konzentration berechnet.

### 5.2.3.5. *Immunopräzipitation*

Nach Herstellung von Lysaten und Bestimmung der Proteinkonzentration wurde 1 mg Protein mit IP-Ripa auf 1 mL verdünnt. Es wurden 2 µg anti-β-Catenin Antikörper bzw. 2 µg Isotypen-Antikörper und 40 µg Protein A/G PLUS-Agarose (Santa Cruz Biotechnology, Inc., St. Cruz, CA, USA) zugegeben und über Nacht bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Die Matrix wurde viermal mit 500 µL IP-Ripa gewaschen (1000 × g, 4 °C, 1 min), in 10 µL Ladepuffer aufgenommen und unter starkem Schütteln erhitzt. Nach Zentrifugation (5 min, 4 °C, 12000 × g) wurden die isolierten Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot analysiert.

### 5.2.3.6. *SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)*

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde unter Verwendung zweier unterschiedlicher kommerzieller Systeme nach Herstellerangaben durchgeführt: NuPAGE® Novex® Bis-Tris Gels (Invitrogen GmbH, Darmstadt) und Mini-PROTEAN II System (BioRad,

München). Als Größenstandard dienten der Prestained Protein Marker, broad range (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) und der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot).

Für die SDS-PAGE wurden identische Mengen Protein mit dem entsprechenden Lysispuffer auf ein einheitliches Volumen eingestellt, mit Ladepuffer versetzt und erhitzt. Die Proben wurden zusammen mit dem Größenstandard geladen, im Gel unter Anlegen einer konstanten Spannung aufgetrennt und anschließend durch Westernblotting oder Anfärben mit Coomassie Brilliant Blue (CBB) Lösung analysiert.

### 5.2.3.7. *Westernblotting*

Westernblotting ermöglicht die spezifische Detektion von Proteinen mit immunologischen Methoden nach Trennung durch SDS-PAGE und Transfer auf eine proteinbindende Membran. Hier fanden dieselben kommerziellen Systeme wie bei der SDS-PAGE Verwendung.

Nach dem Transfer der Proteine auf die zuvor mit Methanol aktivierte PVDF-Membran wurden zunächst freie Bindungsstellen mit einer Milchpulverlösung (5 % (w/v) in PBST) abgesättigt, die Membran kurz mit PBST gewaschen und dann bei 4 °C über Nacht mit dem ersten Antikörper inkubiert. Dabei wurden die Primärantikörper entweder nach Herstellerangaben oder in 1 % (w/v) BSA in PBST eingesetzt. Nach dreimaligem Waschen in PBST für 10 min wurden die Membranen für 1 h bei Raumtemperatur mit einer 1:10000 Verdünnung der Meerrettich Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Die Membran wurde erneut in PBST und abschließend in PBS gewaschen, mit ECL oder Luminol inkubiert und die markierten Proteinbanden mit Hilfe von Röntgenfilmen dokumentiert. Die densitometrische Analyse der Proteinbanden wurde in Adobe Photoshop® vorgenommen.

### 5.2.3.8. *Expression von GST-Fusionsproteinen*

Zur Herstellung von Glutathion-S-Transferase(GST)- $\beta$ -Catenin Fusionsproteinen wurden zunächst *E. coli* BL21(DE3) mit entsprechenden Konstrukten transformiert (siehe Tabelle 21). Mit den Bakterien wurde eine Starterkultur in 7 mL LB Medium angesetzt und über Nacht bei 37 °C und 225 rpm kultiviert. Die Starterkultur wurde zum Animpfen einer 250 mL Kultur eingesetzt, die für 2-3 h bei 37 °C geschüttelt wurde. Bei Erreichen einer optischen Dichte von OD<sub>600</sub> 0,4-0,7 wurde die Expression der Fusionsproteine durch Zugabe von 0,5 mM Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalacto-pyranosid (IPTG) induziert und die Bakterien für

weitere 5-6 h bei 37 °C inkubiert. Von hier an wurden alle Arbeiten auf Eis bzw. bei 4 °C ausgeführt.

**Tabelle 21: Übersicht der hergestellten GST-Fusionsproteine.**

Konstrukt	Protein	Masse
pDEST15-Leervektor	GST	26,2 kDa
pDEST15-β-Catenin	GST-β-Catenin wt	114 kDa
pDEST15-β-Catenin QC5	GST-β-Catenin S33/37/T41	114 kDa
pDEST15-β-Catenin QC6	GST-β-Catenin T41/S45	114 kDa
pDEST15-Del4	GST-β-Catenin Del4 (N-Terminus bis Armadillo <i>repeat</i> 6)	71,2 kDa
pDEST15-Del7	GST-β-Catenin Del7 (Armadillo Domäne)	85 kDa
pDEST15-Del9	GST-β-Catenin Del9 (Armadillo <i>repeat</i> 7 bis C-Terminus)	70,3 kDa

Die BL21 wurden abzentrifugiert ( $4000 \times g$ , 20 min), einmal mit kaltem PBS gewaschen und in 25 mL GST-Lysispuffer (#1) resuspendiert. Um das Aufbrechen der Zellmembranen zu unterstützen, wurden die Bakterien über Nacht bei -80 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Zellen am Sonopuls HD 2070 sonifiziert (5 min, 60 %, 5 s an, 5 s aus), mit 125 µL Triton X-100 versetzt und für 20 min lysiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer bei  $4500 \times g$  für 20 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1 mL zuvor in GST-Lysispuffer (#1) gewaschener Glutathion-Agarose für 1 h oder über Nacht rotiert. Die Agarose wurde bei  $500 \times g$  für 1 min sedimentiert und nacheinander mit 5 mL GST-Lysispuffer (#1), GST-Waschpuffer (#2), GST-Waschpuffer (#3) sowie GST-Waschpuffer (#4) gewaschen und in 1 mL GST-Waschpuffer (#4) aufgenommen. 5-10 µL der an die Agarose gebundenen GST-Fusionsproteine wurden gegen eine BSA Standardreihe mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend durch Coomassie Brilliant Blue (CBB) Färbung quantifiziert und auf mögliche Verunreinigungen untersucht. Die aufgereinigten, Agarose gekoppelten GST-Fusionsproteine wurden für den GST Pull-down, *in vitro* Kinaseassay oder zur Affinitätspräzipitation von *in vitro* transkribierten und translatierten Proteinen eingesetzt.

#### 5.2.3.9. CBB Färbung von Polyacrylamidgelen

Um GST-Fusionsproteine nach Auftrennung in einem Polyacrylamidgel quantifizieren und ihre Reinheit überprüfen zu können, wurden die Gele für 20-30 min bei Raumtemperatur in CBB Färbelösung inkubiert. Die Hintergrundfärbung wurde durch mehrmaliges Waschen bei Raumtemperatur in CBB Entfärber entfernt.

### 5.2.3.10. GST Pull-down

1 mg Gesamtprotein wurde mit 8 µg GST Fusionsprotein in einem Gesamtvolumen von 1 mL Binding Buffer für 1 h oder über Nacht bei 4 °C unter Rotieren inkubiert. Die Agarose wurde viermal mit 500 µL Binding Buffer gewaschen (max. 500 × g, 1 min, 4 °C), in 10 µL Ladepuffer aufgenommen, erhitzt und auf ein Polyacrylamidgel geladen. Die Interaktionspartner wurden mittels Westernblotting analysiert.

### 5.2.3.11. In vitro Transkription und Translation

*In vitro* Transkription und Translation (TNT) ermöglicht die *in vitro* Expression eines vom T7 Promotor kontrollierten Gens als [<sup>35</sup>S]-markiertes Protein. Dieses kann unter anderem zur Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen eingesetzt werden.

Hier wurde das TNT® Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega Co., Madison, WI, USA) benutzt, um β-Catenin Bindungspartner, die vormals in einem *yeast two hybrid* Experiment identifiziert worden waren, zu verifizieren. Dazu wurden zunächst die kodierenden Sequenzen (CDS) der potentiellen β-Catenin Interaktionspartner mit Ausnahme von Hämoglobin α2 aus dem *yeast two hybrid prey* Vektor pGADT7 in den Vektor pcDNA3 kloniert. Häufig enthielten die pGADT7 Vektoren nur unvollständige CDS der Gene. In Tabelle 22 sind die untersuchten Proteine, die Länge der klonierten CDS und die entsprechenden Proteinabschnitte mit ihrer errechneten Masse zusammengefaßt.

**Tabelle 22: Übersicht der untersuchten β-Catenin Bindungspartner.** (AS: Aminosäure)

Protein	Länge CDS	Korrespondierende AS Sequenz (Länge des vollständigen Proteins)	Masse
RNA Polymerase IIB	945 bp	780-1094 (1174 AS)	37,6 kDa
Rack1	858 bp	16-301 (317 AS)	32,2 kDa
Capping protein	801 bp	1-267 (286 AS)	31 kDa
Rho GDIβ	606 bp	Vollständig (201 AS)	23 kDa
Hämoglobin α2	429 bp	Vollständig (142 AS)	15,3 kDa

Ein 30 µL Standard TNT Ansatz wurde wie folgt auf Eis zusammengesetzt und dann für 60 min bei 30 °C im Wasserbad inkubiert:

TNT Mastermix	24 µL
[ <sup>35</sup> S]-Methionin (1000 Ci/mmol)	1,2 µL
T7 Promotor Konstrukt (0,2-2 µg DNA)	2,4 µL
Nuklease freies Wasser	2,4 µL

Jeweils 8  $\mu\text{L}$  des TNT Ansatzes wurden mit 2  $\mu\text{g}$  GST, GST- $\beta$ -Catenin oder GST- $\beta$ -Catenin Del7 in 200  $\mu\text{L}$  PBS (0,5 % (v/v) NP-40) für 60-90 min bei Raumtemperatur unter Rotieren inkubiert. Im Anschluß wurde die Agarose dreimal für 5 min mit 400  $\mu\text{L}$  PBS (0,5 % (v/v) NP-40) gewaschen (1 min,  $500 \times g$ ), mit 10  $\mu\text{L}$  Ladepuffer versetzt, 5 min bei 95 °C gekocht und zusammen mit dem Proteinstandard sowie 5  $\mu\text{L}$  des TNT Ansatzes per SDS-PAGE aufgetrennt. Das Polyacrylamidgel wurde unter Vakuum bei 80 °C für 3 h getrocknet. Zur Erstellung eines Autoradiogramms wurde ein Röntgenfilm für zwei bis drei Tage exponiert.

#### 5.2.3.12. Kinaseassay

Auf Eis wurden 1  $\mu\text{g}$  Histon H3, GST oder GST- $\beta$ -Catenin wt und 1  $\mu\text{g}$  Aurora Kinase B zusammengefügt und mit 1  $\times$  TADB-Puffer auf 5  $\mu\text{L}$  aufgefüllt. In einem zweiten Ansatz wurden 5  $\mu\text{L}$   $\text{Mg}^{2+}$ /ATP-Cocktail mit 0,1  $\mu\text{L}$  [ $^{32}\text{P}$ ]- $\gamma$ -ATP komplementiert. Beide Ansätze wurden vereint und für 10 min bzw. 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5  $\mu\text{L}$  5  $\times$  Ladepuffer und Aufkochen für 5 min bei 95 °C gestoppt. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und *in vitro* Phosphorylierung nach Trocknung des Gels (Vakuum, 3 h, 80 °C) durch Belichtung eines Röntgenfilms für 3-20 h sichtbar gemacht.



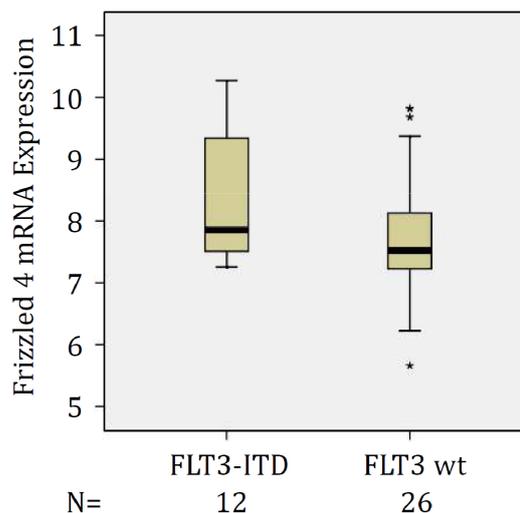
# 6. ERGEBNISSE

## 6.1. Aktivierung des WNT Signalwegs durch Induktion von Frizzled 4 in der AML

### 6.1.1. Blasten von AML Patienten exprimieren Frizzled 4 mRNA

In leukämischen Blasten liegt eine Vielzahl genetischer Aberrationen vor. Etwa ein Drittel aller AML Patienten mit normalem Karyotyp tragen eine interne Tandemduplikation der Rezeptortyrosinkinase FLT3<sup>46, 250, 251</sup>. Unsere Gruppe konnte in einem Zellkulturmodell zeigen, dass FLT3-ITD transformierte Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen mit wildtypischem FLT3 vermehrt den WNT Rezeptor Frizzled 4 exprimieren<sup>135, 173</sup>.

Um AML assoziierte genetische Veränderungen zu untersuchen, wurden in unserem Labor 77 Patientenproben unter Verwendung von *genome survey expression arrays* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) analysiert. Bei 67 der Proben handelte es sich um aufgereinigte AML Blasten von Patienten unterschiedlicher FAB Typen, zehn Proben waren für den Progenitorenmarker CD34 angereichert. Für die vorliegende Arbeit wurden die Daten der AML Proben mit bekanntem FLT3 Status auf FZD4 Expression in Abhängigkeit vom FLT3 Genotyp untersucht. Aus Abbildung 5 ist zu entnehmen, dass FZD4 mRNA in allen untersuchten AML Blasten gleichermaßen exprimiert wurde. Das Ergebnis weist darauf hin, dass die Expression von Frizzled 4 in leukämischen Blasten nicht allein durch die ITD Mutation von FLT3 gesteuert wird.

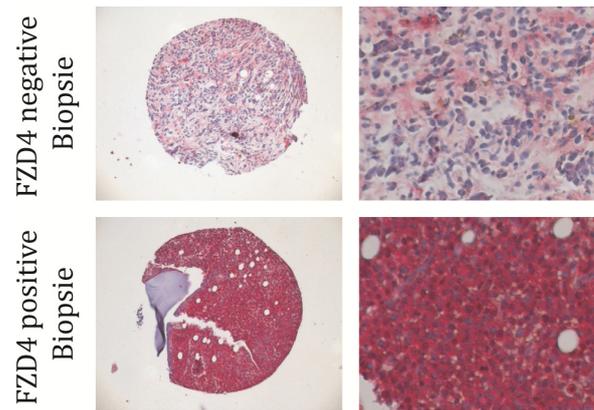


**Abbildung 5: Frizzled 4 mRNA Expression in primären AML Blasten.** RNA aus 38 AML Patientenproben wurde mit Hilfe der Microarrayanalyse untersucht. Die normalisierten Daten wurden bezüglich der Frizzled 4 Expression analysiert und hier als Boxplot dargestellt. Verglichen wurden AML Blasten von Patienten mit einer FLT3-ITD Mutation (N= 12) und mit wildtypischem FLT3 (N= 26). (Der Boxplot zeigt 5 %-, 25 %-Perzentile, Median, 75 %-, und 95 %-Perzentile, Ausreißer sind als Sternchen dargestellt)

### 6.1.2. Frizzled 4 Färbung von Gewebearrays

In Blasten von AML Patienten ist die Frizzled 4 mRNA Expression induziert. Um dieses Ergebnis auch auf Proteinebene bestätigen zu können, wurden Gewebearrays mit einem Antikörper gegen Frizzled 4 immunhistochemisch untersucht. Die Arrays enthielten Knochenmarksbiopsien von 143 AML Patienten und von 30 Patienten mit normalem Knochenmark sowie zehn CD34 angereicherte Proben und verschiedene hämatopoetische und nicht-hämatopoetische Zelllinien. Die Gewebearrays wurden von Prof. Dr. med. Horst Bürger vom Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie in Münster wie zuvor beschrieben<sup>252</sup> hergestellt, gefärbt und unter seiner Anleitung ausgewertet.

Abbildung 6 zeigt typische Beispiele für eine Frizzled 4 negative und eine Frizzled 4 positive Biopsie. Diesen Gewebestanden wurden die Wertungen 0 (negativ) und 2 (stark positiv) zugeordnet und die Frizzled 4 Expression aller weiteren Proben im Vergleich dazu bemessen. Je Biopsie und Zelllinie wurden zwei Stenzen bewertet und der Mittelwert berechnet.



**Abbildung 6: Nachweis der Frizzled 4 Expression in Knochenmarksbiopsien.** Die Gewebearrays wurden mit einem Antikörper gegen Frizzled 4 inkubiert und die Färbung mit der Alkalische Phosphatase anti-Alkalische Phosphatase (APAAP) Methode detektiert. Die abgebildeten Knochenmarker sind Beispiele für eine FZD4 negative (Wertung 0) bzw. FZD4 positive Biopsie (Wertung 2).

### 6.1.3. FZD4 wird in verschiedenen Zelllinien exprimiert

Verschiedene hämatopoetische und nicht-hämatopoetische Zelllinien wurden auf die Proteinexpression von Frizzled 4 im Gewebearray untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle 23 und Tabelle 24 zusammengefasst. Der WNT Rezeptor FZD4 wurde in einer Vielzahl von leukämischen, aber auch anderen Zelllinien exprimiert. MV4-11 Zellen, die als einzige endogen die FLT3-ITD Mutation tragen, besaßen hier im Vergleich zu Zelllinien mit wildtypischem FLT3 eine höhere FZD4 Expression.

**Tabelle 23: Frizzled 4 Expression in verschiedenen hämatopoetischen Zelllinien.**

hämatopoetisch	
Zelllinie	FZD4 Expression
FLT3-ITD positiv	
MV4-11	2
FLT3 wt positiv	
OCI-AML5	1
32D FLT3 wt	1
NB4	1
FLT3 negativ	
K562	2
32D Klon 3	1
Jurkat	2
U937	2

**Tabelle 24: Frizzled 4 Expression in verschiedenen nicht-hämatopoetischen Zelllinien.**

nicht-hämatopoetisch	
Zelllinie	FZD4 Expression
U-87 MG	1
T-47D	2
HCT-116	2
HeLa	2
HEK-293	2
NIH3T3	2
ML1	1,5

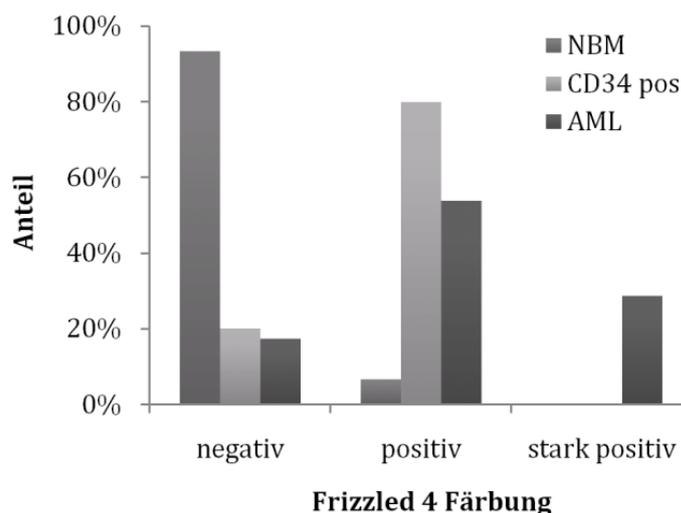
### 6.1.4. In AML Blasten wird Frizzled 4 Protein hoch exprimiert

Neben den Zelllinien wurden Knochenmarksbiopsien von 143 AML Patienten (AML), 30 Patienten mit normalem Knochenmark (NBM) und zehn CD34 angereicherte Proben (CD34 pos) immunhistochemisch auf Frizzled 4 Proteinexpression im Gewebearray untersucht (Tabelle 25 und Abbildung 7).

CD34 ist ein Transmembranprotein, das zur Familie der Sialomucine gehört und auf unreifen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert wird<sup>253-256</sup>. Auch in undifferenzierten akuten myeloischen Leukämien kann die Expression von CD34 nachgewiesen werden<sup>255, 257</sup>. Im Gewebearray wurde in acht von zehn CD34<sup>+</sup> Proben Frizzled 4 detektiert. Im Gegensatz hierzu zeigten nur zwei der 30 gesunden Knochenmärker, die einen geringen Anteil an Stamm- und Vorläuferzellen besitzen, eine FZD4 Expression. Dies spricht für eine Rolle von Frizzled 4 im Stammzellkompartiment.

**Tabelle 25: Auswertung des Gewebearrays aus Patientenmaterial.**

Frizzled 4 Färbung (Wertung)	Normale Knochenmärker (N= 30)		CD34 <sup>+</sup> Zellen (N= 10)		Knochenmärker von AML Patienten (N= 143)	
	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
Negativ (< 0,5)	28	93,3%	2	20,0%	25	17,5%
Positiv (0,5-1)	2	6,7%	8	80,0%	77	53,8%
Stark positiv (> 1)	0	0,0%	0	0,0%	41	28,7%



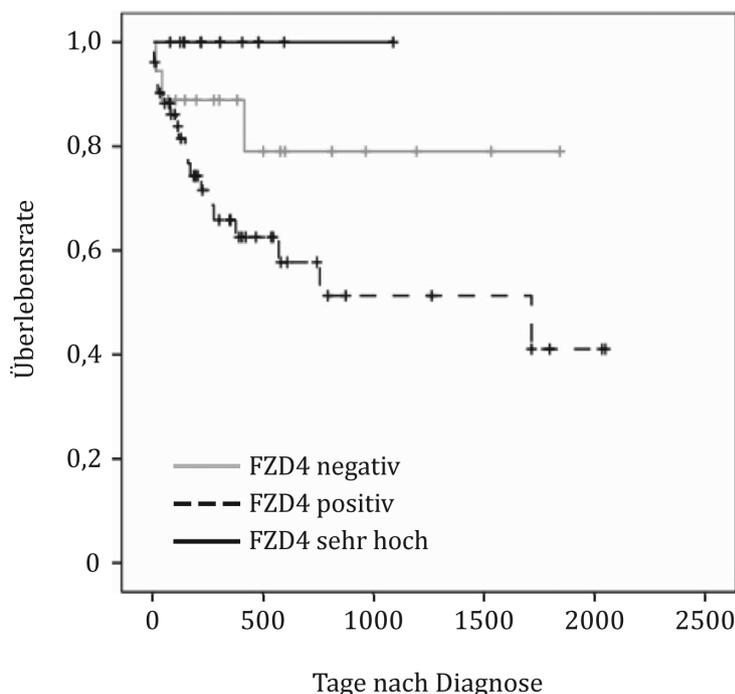
**Abbildung 7: Frizzled 4 Expression in Patientenknochenmärkern.** Gewebearray mit Knochenmarksbiopsien von AML Patienten (AML, N= 143), Patienten mit normalem Knochenmark (NBM, N= 30) und CD34<sup>+</sup> Proben (CD34 pos, N= 10) wurden immunhistochemisch gegen Frizzled 4 gefärbt. Dargestellt ist der Prozentsatz negativ (< 0,5), positiv (0,5-1) und stark positiv (> 1) gefärbter Samples der einzelnen Gruppen.

Über 80 % der analysierten AML Knochenmäcker waren positiv für Frizzled 4, wobei in 41 der 143 untersuchten Biopsien, was etwa 30 % entspricht, sogar eine sehr starke Expression detektiert werden konnte. Da weder in gesunden Knochenmarkszellen noch in CD34<sup>+</sup> Zellen solch hohe Proteinlevel gemessen wurden, bestätigt dieses Resultat die Annahme, dass der Expression des WNT Rezeptor Frizzled 4 eine Funktion in der Pathogenese der AML zukommt.

### **6.1.5. Eine mittlere FZD4 Expression korreliert mit einem schlechteren Gesamtüberleben**

In Blasten von AML Patienten konnte auf mRNA- und Proteinlevel die Induktion der Frizzled 4 Expression nachgewiesen werden. Zur Ermittlung der prognostischen Relevanz von FZD4 standen die klinisch-pathologischen Parameter von 79 der 143 im Gewebearray untersuchten AML Patientenproben zur Verfügung. Diese wurden bezüglich der Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom Frizzled 4 Expressionslevel untersucht.

In Abbildung 8 ist die zugehörige Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Der Beobachtungszeitraum begann mit dem Diagnosedatum und endete entweder mit der letzten erfassten Kontrolle (zensiert) oder mit dem AML assoziierten Tod des Patienten. Es wurden drei verschiedene Kollektive miteinander verglichen: keine/sehr niedrige (< 1), mittlere (1-1,5) und sehr hohe (2) Frizzled 4 Expression. Die Analyse ergab, dass Patienten mit sehr hoher FZD4 Expression (N= 12) die höchste Überlebenswahrscheinlichkeit hatten und Patienten ohne FZD4 (N= 16) einen Beobachtungszeitraum von etwa 5 Jahren mit einer Wahrscheinlichkeit von ca. 80 % überlebten. AML Patienten, deren Biopsien ein mittleres FZD4 Expressionslevel (N= 51) im Gewebearray zeigten, wiesen ein schlechteres Gesamtüberleben als die beiden anderen Kollektive auf.



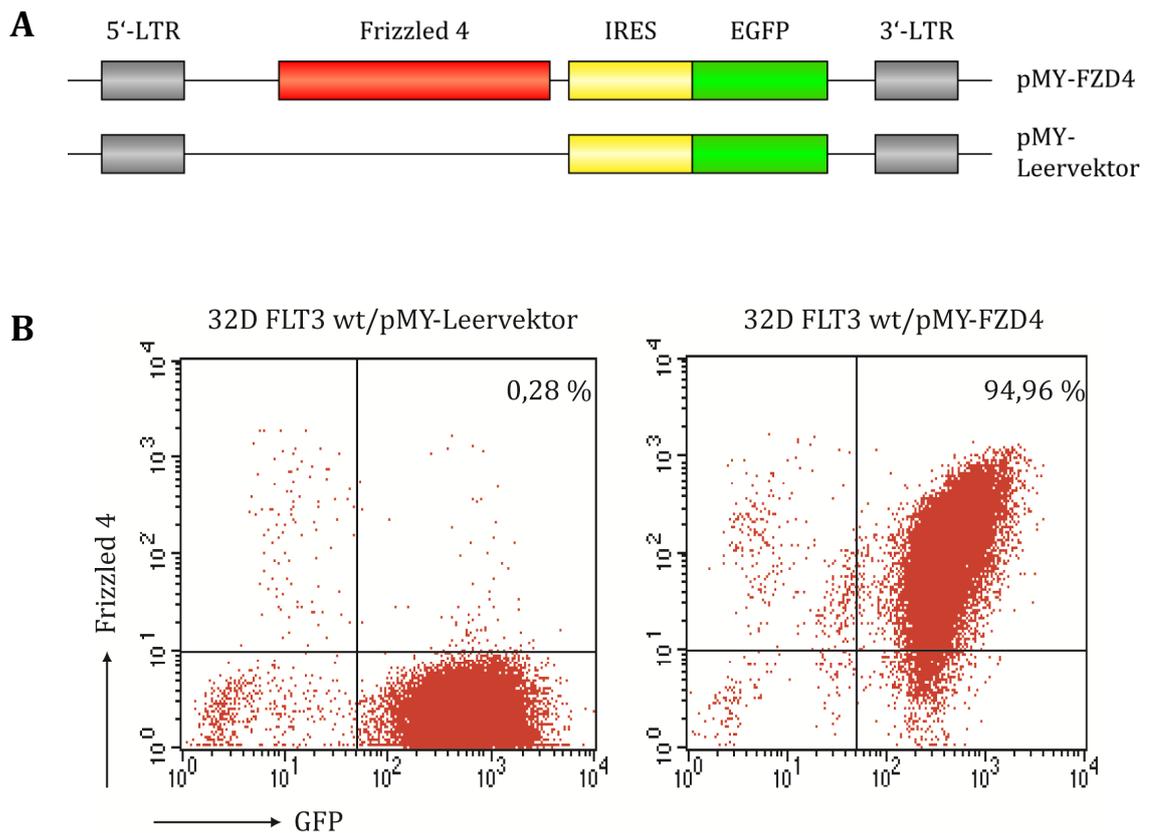
**Abbildung 8: Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens von AML Patienten in Abhängigkeit von der Frizzled 4 Proteinexpression.** Daten von 79 AML Patienten wurden hinsichtlich des Überlebens in Abhängigkeit vom Frizzled 4 Expressionslevel untersucht. Verglichen wurden Patienten ohne/mit sehr geringer (0-0,5), mit mittlerer (1-1,5) und mit sehr hoher (2) Frizzled 4 Expression. ( $p = 0,07$ , berechnet mit Log-Rank-Test (Mantel-Cox))

### 6.1.6. Stabile Expression von Frizzled 4 in 32D Zellen

Das Frizzled 4 Protein wird in Blasten von AML Patienten stärker als in gesundem Knochenmark exprimiert. Daher sollten die *downstream* Effekte der Frizzled 4 Expression analysiert werden. Zu diesem Zweck wurde die murine myeloische Progenitorzelllinie 32D herangezogen, die ein geeignetes Modell für *in vitro* Studien verschiedener Aspekte der Hämatopoese darstellt<sup>221</sup>.

Um stabil Frizzled 4 exprimierende 32D Zellen zu generieren, wurde zunächst murine *FZD4* cDNA in den Vektor pMY-IG kloniert. Die Genexpression unterliegt in diesem Plasmid der Kontrolle eines Hybrid *long terminal repeat* (LTR) aus *Moloney murine leukemia virus* (MMLV) und zweier MMLV Varianten, *myeloproliferative sarcoma virus* (MPSV) und *PCC4-cell-passaged myeloproliferative sarcoma virus* (PCMV), und trägt *enhanced* grün fluoreszierendes Protein (EGFP) als Reportergen<sup>217, 218</sup> (Abbildung 9 A).

Parentale 32D Zellen wachsen konstitutiv IL3 abhängig<sup>221</sup>. Die Transfektion der Zelllinie mit wildtypischem FLT3 erlaubt jedoch Proliferation auch nach alleiniger Gabe des



**Abbildung 9: Herstellung Frizzled 4 exprimierender 32D Zellen.** (A) Schematische Darstellung der verwendeten retroviralen Vektoren pMY-Frizzled 4 und pMY-Leervektor (IRES: *internal ribosome entry site*). (B) 32D FLT3 wt Zellen wurden mit pMY-Leervektor (links) oder pMY-Frizzled 4 (rechts) infiziert und die Oberflächenexpression des WNT Rezeptors mittels FACS Analyse bestimmt.

FLT3 Liganden (FL)<sup>34, 258</sup>. Da IL3 erfahrungsgemäß viele Signalwege, darunter auch den kanonischen WNT Signalweg, beeinflusst (vgl. Abbildung 13), kann durch Substitution von IL3 mit FL diese unerwünschte Aktivierung unterbunden werden. Aus diesem Grund wurden für die Untersuchung der FZD4 nachgelagerten Signalkaskade 32D Zellen, die zuvor stabil mit wildtypischem FLT3 transfiziert worden waren (32D FLT3 wt), mit retroviralen, ekotrophen Überständen von pMY-Leervektor oder pMY-FZD4 infiziert.

Nach der Infektion wurden die Zellen anhand der GFP Expression im FACS sortiert. Zur abschließenden Kontrolle der isolierten Zellen wurden diese mit einem biotinylierten Antikörper gegen Frizzled 4 und anschließend mit PE-Streptavidin gefärbt und die Oberflächenexpression des WNT Rezeptors mittels Durchflußzytometrie gegen GFP gemessen. 95 % der Rezeptor transfizierten 32D Zellen exprimierten Frizzled 4 auf der Zelloberfläche, während in Leervektor transfizierten Zellen zwar GFP, jedoch keine FZD4 Expression nachgewiesen werden konnte (Abbildung 9 B).

### 6.1.7. WNT3A abhängige Aktivierung des kanonischen WNT Signalwegs durch FZD4

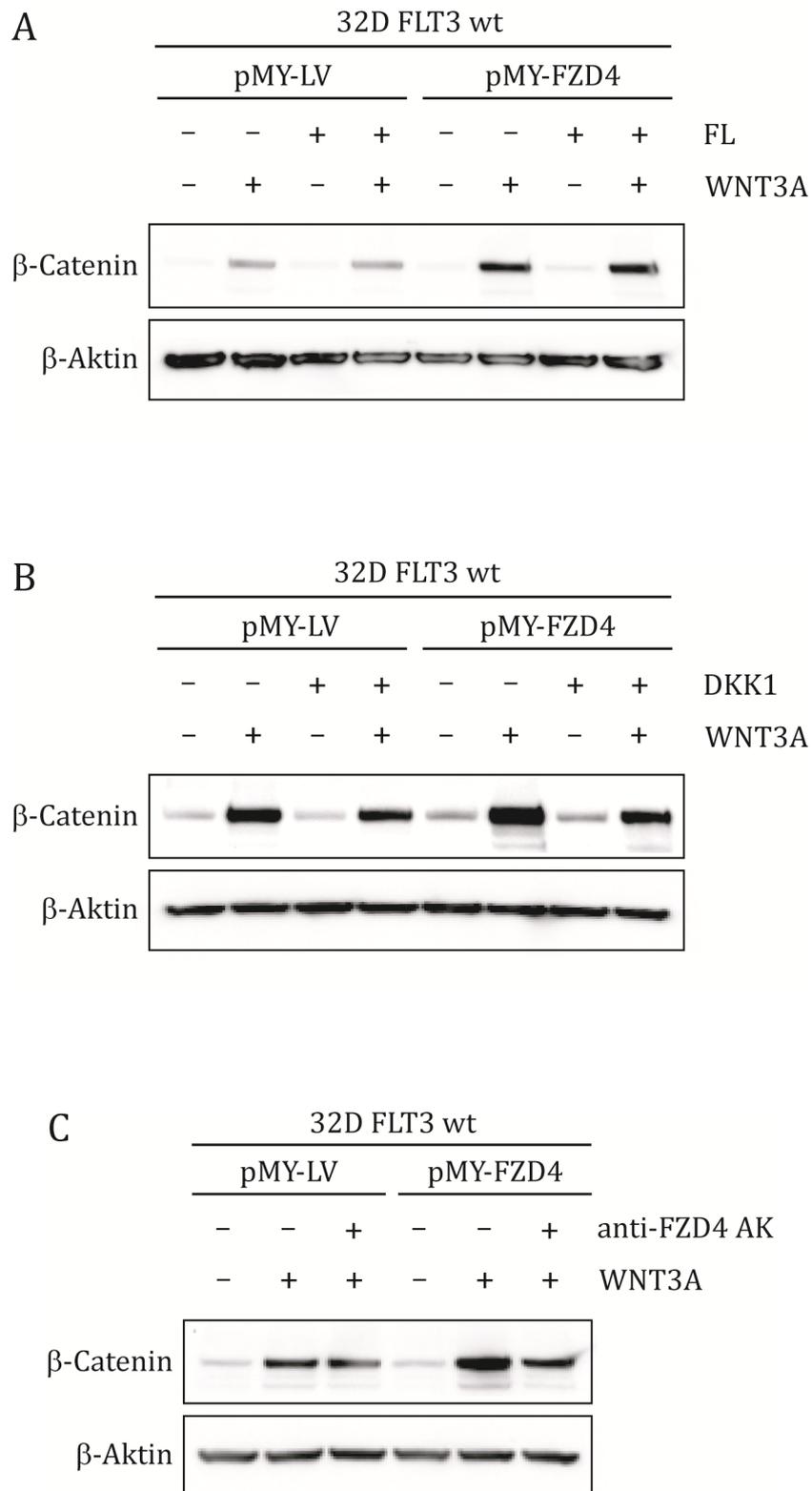
Frizzled Proteine sind in der Lage, WNT Liganden zu binden<sup>153, 154</sup>, jedoch aktivieren sie zum Teil spezifisch, zum Teil kontextabhängig unterschiedliche WNT Signalwege<sup>160, 161</sup>. Für Frizzled 4 wurde im Zusammenhang mit dem Norrie Syndrom gezeigt, dass der Rezeptor nach Bindung des nicht-WNT Liganden Norrin klassische WNT Signaltransduktion induziert, die zur Akkumulation von  $\beta$ -Catenin führt<sup>156</sup>.

Hier sollte untersucht werden, ob Frizzled 4 auch im hämatopoetischen System in der Lage ist, den kanonischen WNT Signalweg zu aktivieren. Dazu wurden stabil transfizierte 32D FLT3 wt/pMY-Leervektor und 32D FLT3 wt/pMY-Frizzled 4 Zellen unter verschiedenen Bedingungen auf die Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin im Westernblot untersucht.

32D FLT3 wt/pMY-Leervektor und 32D FLT3 wt/pMY-FZD4 transfizierte Zellen wurden gewaschen und über Nacht von IL3 gehungert. Am nächsten Tag wurden die Zellen in einer Dichte von  $0,5 \cdot 10^6$ /mL in RPMI Medium mit Kontroll konditioniertem oder WNT3A konditioniertem Medium aufgenommen und mit bzw. ohne FL (40 ng/mL) für 6 h inkubiert. WNT3A gilt als typischer Vertreter der „WNT1-Klasse“ WNT Liganden, die üblicherweise den kanonischen WNT Signalweg und somit die zytosolische Anreicherung von  $\beta$ -Catenin induzieren<sup>66-68</sup>. Als Maß dieser Aktivierung wurde die  $\beta$ -Catenin Expression im Westernblot bestimmt (Abbildung 10 A).

In beiden Zelllinien konnte man einen WNT3A abhängigen Anstieg des  $\beta$ -Catenin Proteinlevels beobachten, der allerdings in den FZD4 exprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen wesentlich stärker ausfiel. Die Induktion der FLT3 Signaltransduktion durch FL zeigte hingegen keinen Einfluss auf  $\beta$ -Catenin. Hier wie auch in Abbildung 10 B und C wurde  $\beta$ -Aktin detektiert, um eine gleichmäßige Beladung des Westernblots zu zeigen.

Um die Induktion von  $\beta$ -Catenin infolge unspezifischer Aktivierung des klassischen WNT Signalwegs ausschließen zu können, wurden die beiden Zelllinien wie oben beschrieben über Nacht ohne IL3 kultiviert und dann in konditioniertem Medium aufgenommen. Die Bildung eines WNT/FZD/LRP Komplexes wurde durch Zugabe des spezifischen WNT Antagonisten Dickkopf 1, der direkt an LRP5/6 bindet, verhindert<sup>259, 260</sup> (Abbildung 10 B). Wie zuvor konnte man in beiden Zelllinien eine Erhöhung des  $\beta$ -Catenin Levels nach Inkubation in WNT3A konditioniertem Medium erkennen, wobei in den FZD4 exprimierenden Zellen die Akkumulation ausgeprägter war. Der Inhibitor DKK1 war in der Lage, die Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin nach WNT3A Gabe zu reprimieren, ohne das Proteinlevel in nicht Liganden stimulierten Zellen zu verändern.



**Abbildung 10:  $\beta$ -Catenin Westernblotting von FZD4 überexprimierenden 32D Zellen nach WNT3A Behandlung.** Leervektor (LV) oder Frizzled 4 infizierte 32D FLT3 wt Zellen wurden für 6 h in WNT3A konditioniertem oder Kontroll konditioniertem Medium in Gegenwart von FL (A), DKK1 (B) oder eines neutralisierenden anti-Frizzled 4 Antikörpers (anti-FZD4 AK) (C) inkubiert. Anschließend wurde die  $\beta$ -Catenin Akkumulation mittels Westernblot Analyse nachgewiesen.  $\beta$ -Aktin wurde als Ladekontrolle detektiert.

Eine weitere Möglichkeit, spezifische Liganden/Rezeptor Interaktionen nachzuweisen, ist der Einsatz von neutralisierenden Antikörpern. Der hier verwendete Antikörper erkennt die extrazelluläre cysteinreiche Domäne von FZD4, die für die Frizzled/WNT Interaktion verantwortlich ist<sup>153, 261</sup>, und konkurriert so mit WNT3A um die Bindung an den Rezeptor.

Nach 12 h IL3 Entzug wurden 32D FLT3 wt/pMY-Leervektor und -Frizzled 4 Zellen in RPMI mit 25 % Kontroll konditioniertem oder WNT3A konditioniertem Medium aufgenommen und für 6 h mit dem neutralisierenden anti-Frizzled 4 Antikörper oder ohne Antikörper inkubiert. Der Effekt auf die  $\beta$ -Catenin Stabilität in diesem kompetitiven Experiment wurde mittels Westernblotting untersucht (Abbildung 10 C). Wie zuvor induzierte die Anwesenheit von WNT3A die Anreicherung von  $\beta$ -Catenin in beiden Zelllinien, aber nur in Gegenwart des FZD4 Rezeptors wurde bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit WNT3A und dem neutralisierenden Antikörper die Stabilisierung reprimiert.

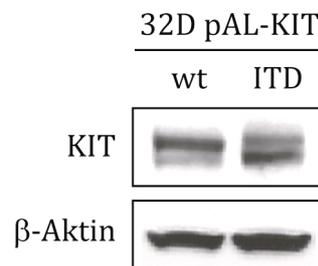
Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Westernblot Analysen, dass Frizzled 4 im hämatopoetischen System WNT3A abhängig den klassischen WNT Signalweg, der die Anreicherung von  $\beta$ -Catenin induziert, aktivieren kann. Außerdem konnte durch Verwendung des WNT Antagonisten DKK1 und eines neutralisierenden Antikörpers die spezifische Interaktion von WNT3A und Frizzled 4 nachgewiesen werden.

## 6.2. Die onkogene Rezeptortyrosinkinase KIT-ITD aktiviert den klassischen WNT Signalweg

### 6.2.1. Stabile Expression von KIT wt und KIT-ITD in 32D Zellen

Die onkogene RTK FLT3-ITD induziert die Aktivierung des klassischen WNT Signalwegs<sup>135</sup>. Aufgrund der strukturellen und funktionellen Verwandtschaft von FLT3 und KIT sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von KIT-ITD auf die kanonische WNT Signaltransduktion im hämatopoetischen System untersucht werden.

Dazu wurde die IL3 abhängig wachsende, murine, myeloische Progenitorzelllinie 32D herangezogen. Diese wurde mit pAL-KIT wt und pMAM/BSD bzw. pAL-KIT-ITD und pMAM/BSD mittels Elektroporation cotransfiziert. pAL diente als Expressionsvektor für die RTKs KIT wt und KIT-ITD, während die gleichzeitige Transfektion mit pMAM/BSD eine Blasticidin (BSD) Resistenz vermittelte. Die stabile Expression der Rezeptoren wurde nach siebentägiger BSD Selektion per Westernblot Analyse nachgewiesen (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Westernblot Analyse der KIT Expression stabil transfizierter 32D Zellen.** 32D Zellen wurden mit pAL-KIT wt/pMAM/BSD oder pAL-KIT-ITD/pMAM/BSD transfiziert und mit Blasticidin selektioniert. Nach sieben Tagen wurde die stabile Expression von KIT wt und KIT-ITD im Westernblot mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen. β-Aktin wurde als Ladekontrolle detektiert.

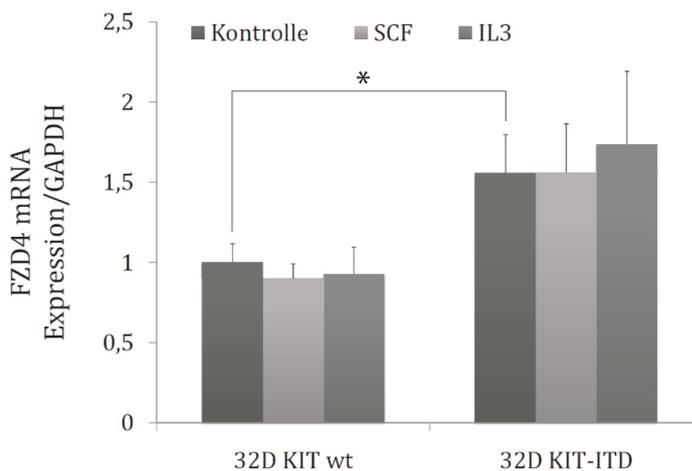
In beiden Zelllinien konnte die ektopische Expression der Rezeptoren KIT wt bzw. KIT-ITD gezeigt werden. Typischerweise wurde eine Doppelbande detektiert, wobei die kleinere, 140 kDa Bande dem intrazellulären, unreifen Protein und die 160 kDa Bande dem komplex glykosylierten Oberflächenrezeptor entspricht<sup>22</sup>. Wie im Fall von FLT3 wt bzw. FLT-ITD<sup>34</sup> (vgl. auch Abbildung 18 A) überwiegte bei KIT wt die reife Form, während KIT-ITD vorwiegend als unreif N-glykosylierter, intrazellulärer Rezeptor vorlag.

## 6.2.2. KIT-ITD induziert die Expression von Frizzled 4

Die ITD Mutation von FLT3 induziert die Expression von Frizzled 4<sup>135</sup>. Deshalb sollte überprüft werden, ob dies auch für KIT-ITD zutrifft. Dazu wurden stabil transfizierte 32D KIT wt und KIT-ITD Zellen über Nacht von IL3 gehungert und dann für 6 h in Medium ohne Zusätze, mit 10 ng/mL SCF oder mit 1 ng/mL IL3 inkubiert. Nach Isolation der Gesamt-RNA wurde diese in cDNA umgeschrieben. Per Real-Time PCR wurde die Expression von Frizzled 4 und Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) bestimmt. Zur Normalisierung und Auswertung der Daten wurden die mRNA Expressionswerte von Frizzled 4 durch die entsprechenden Werte von GAPDH geteilt und der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten gebildet (Tabelle 26).

**Tabelle 26: Real-Time PCR von Frizzled 4 mRNA in 32D KIT wt und 32D KIT-ITD Zellen.** (K: Kontrolle; StAbw: Standardabweichung)

Ansatz		1. Messung		2. Messung		3. Messung		Frizzled 4/GAPDH mRNA	
		GAPDH	Frizzled 4	GAPDH	Frizzled 4	GAPDH	Frizzled 4	Mittelwert	StAbw
32D KIT wt	K	122,75	71,82	138,52	102,43	83,34	54,94	0,661	0,077
	SCF	102,26	54,08	109,98	66,44	86,18	56,04	0,594	0,061
	IL3	89,19	43,27	82,20	55,30	82,88	56,49	0,613	0,111
32D KIT-ITD	K	190,37	176,02	209,59	200,66	155,15	188,07	1,031	0,157
	SCF	188,86	153,86	190,53	204,94	165,03	199,34	1,033	0,200
	IL3	146,12	146,64	168,42	159,75	119,79	179,00	1,149	0,300



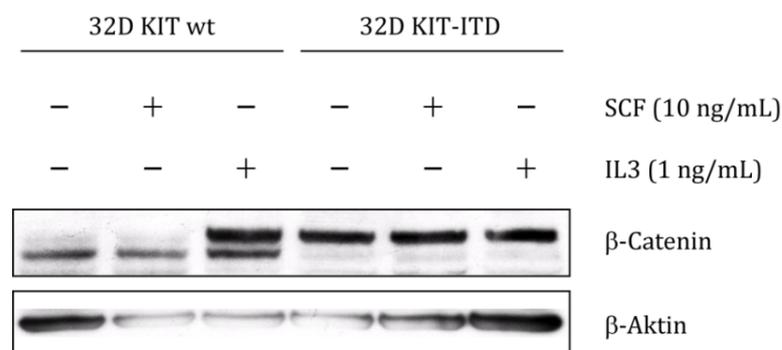
**Abbildung 12: Frizzled 4 mRNA Expression in KIT und KIT-ITD transfizierten Zellen.** 32D Zellen transfiziert mit KIT wt und KIT-ITD wurden nach IL3 Entzug mit SCF oder IL3 induziert und die Frizzled 4 Expression mittels Real-Time PCR gegen unbehandelte Zellen bestimmt. Zur Normalisierung der Daten wurde die Expression des Haushaltgenes GAPDH bestimmt. ( $p = 0,04$ , berechnet mit Students t-Test)

Der onkogene Rezeptor KIT-ITD induziert die Expression der Frizzled 4 mRNA (Abbildung 12). Diese war in 32D KIT-ITD Zellen im Vergleich zu KIT wt Zellen signifikant um den Faktor 1,5 erhöht. In beiden Zelllinien konnte kein Einfluss von Zytokinen auf das Expressionslevel von FZD4 festgestellt werden. Daraus lässt sich schließen, dass die Aktivierung der Frizzled 4 mRNA Expression unabhängig von Zytokinsignalen ist und allein durch die Anwesenheit von KIT-ITD induziert wird.

### 6.2.3. KIT-ITD erhöht die Stabilität des $\beta$ -Catenin Proteins

In Zellen wird die zytosolische Anreicherung von  $\beta$ -Catenin durch die Aktivierung des klassischen WNT Signalwegs bedingt<sup>262</sup>. Wir konnten zuvor zeigen, dass FLT3-ITD transformierte 32D Zellen zytokin- und WNT3A unabhängig bereits ein hohes  $\beta$ -Catenin Proteinlevel aufweisen<sup>135</sup>. Daher sollte der Einfluss von KIT-ITD auf die  $\beta$ -Catenin Stabilität in 32D Zellen untersucht werden.

32D KIT wt und KIT-ITD Zellen wurden wie oben beschrieben (6.2.1) mit SCF bzw. IL3 stimuliert und anschließend die Proteinexpression von  $\beta$ -Catenin im Westernblot überprüft (Abbildung 13). In 32D KIT-ITD Zellen konnte eine Zytokin unabhängige, gleichmäßig starke  $\beta$ -Catenin Akkumulation im Vergleich zu unstimulierten und SCF behandelten 32D KIT wt Zellen nachgewiesen werden. Hier waren im Westernblot vor allem Degradationsprodukte von  $\beta$ -Catenin zu erkennen. Interessanterweise zeigten IL3 stimulierte 32D KIT wt Zellen eine ebenso starke  $\beta$ -Catenin Anreicherung wie KIT-ITD transfizierte Zellen. Dieses Ergebnis zeigt, dass KIT-ITD im Vergleich zu KIT wt die Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin induziert.



**Abbildung 13:  $\beta$ -Catenin Proteinexpression in 32D KIT wt und 32D KIT-ITD Zellen.** Stabil transfizierte 32D KIT wt und 32D KIT-ITD Zellen wurden nach 16 h IL3 Entzug mit SCF oder IL3 induziert. Im Westernblot wurde der Einfluss der Transgene und der Zytokine auf  $\beta$ -Catenin untersucht.  $\beta$ -Aktin wurde als Ladekontrolle detektiert.

### 6.2.4. TCF4 abhängige Aktivierung des c-Myc Promotors durch ITD

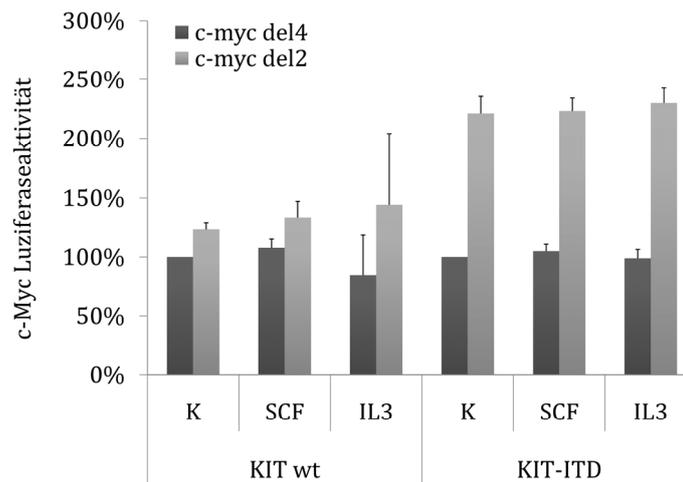
Die interne Tandemduplikation induziert die Anreicherung von  $\beta$ -Catenin. Im klassischen WNT Signalweg wandert  $\beta$ -Catenin nach Akkumulation in den Zellkern, wo es an TCF/LEF Transkriptionsfaktoren bindet und die Transkription von WNT Zielgenen aktiviert<sup>73, 113, 263</sup>. Eines dieser Zielgene ist das Onkogen c-Myc, welches zwei TCF bindende Elemente (TBEs) in seinem Promotor trägt<sup>123</sup>.

Um zu untersuchen, ob die KIT-ITD vermittelte Erhöhung des  $\beta$ -Catenin Proteinlevels Auswirkungen auf die Transkription von WNT Zielgenen hat, wurde die Aktivierung des c-Myc Promotors im Luziferaseassay untersucht. Hierzu wurden zwei Konstrukte verwendet, in denen sich das Luziferasegen *Firefly* entweder unter der Kontrolle der zwei beschriebenen TBEs des c-Myc Promotors befindet (c-myc del2) oder unter der Kontrolle eines mutierten Promotors, dem die beiden TBEs fehlen (c-myc del4). Dieses System ermöglicht die zuverlässige Detektion der TCF abhängigen Aktivierung des c-Myc Promotors durch  $\beta$ -Catenin<sup>123</sup>.

Stabil transfizierte 32D KIT wt und 32D KIT-ITD Zellen wurden mit c-myc del2 oder c-myc del4 und dem Kontrollreporter *Renilla* elektroporiert und wie beschrieben (6.2.1) ohne Zytokine, mit SCF oder IL3 für 16 h stimuliert. Anschließend wurden nacheinander die Expression der *Firefly* Luziferase (LARI) unter der Kontrolle des c-Myc Promotors und *Renilla* (S&G) gemessen. Die Ergebnisse des Luziferaseassays dreier unabhängiger Versuche sind in Tabelle 27 zusammengefasst.

**Tabelle 27: Luziferaseassay von c-Myc Reporterkonstrukten in 32D KIT wt und -ITD Zellen.**

Ansatz			1.Messung		2. Messung		3. Messung		LARI/S&G	
			LARI	S&G	LARI	S&G	LARI	S&G	Mittelwert	StAbw
c-myc del2	32D KIT wt	K	13,5	41,02	1,684	8,282	11,23	17,78	1,230	0,056
		SCF	16,71	45,02	2,551	10,9	13,25	21,81	1,329	0,142
		IL3	51,27	111,8	34,58	112,8	37,34	96,19	1,442	0,599
	32D KIT-ITD	K	39,24	209,8	17,11	89,84	41,77	160,4	2,212	0,144
		SCF	45,33	224,1	18,42	95,64	45,1	184,2	2,232	0,111
		IL3	48,74	242,1	20,61	102,9	51,26	197,9	2,301	0,126
c-myc del4	32D KIT wt	K	9,913	38,86	1,48	8,587	8,33	16,11	1	0
		SCF	12,16	44,4	1,807	9,098	9,552	18,43	1,076	0,075
		IL3	25,24	93,58	18,37	103,9	24,69	104	0,847	0,337
	32D KIT-ITD	K	18,89	207	7,255	88,5	19,94	173,4	1	0
		SCF	21,9	244,9	8,206	92,78	23,49	188,1	1,048	0,059
		IL3	22,62	274,4	9,055	108,1	23,6	197,2	0,989	0,074



**Abbildung 14: Aktivierung des c-Myc Promotors durch KIT-ITD im Luziferaseassay.** 32D KIT wt und 32D KIT-ITD wurden mit c-Myc Promotorkonstrukten elektroporiert, von denen c-myc del2 zwei und c-myc del4 keine TCF Bindungsstellen trug. Nach IL3 Entzug wurden unstimulierte, SCF oder IL3 stimulierte Zellen im Luziferaseassay untersucht.

In unbehandelten und SCF induzierten 32D Zellen mit wildtypischem KIT konnte nur eine schwache Aktivierung des c-Myc Promotors beobachtet werden. Die Stimulation dieser Zellen mit IL3 führte zu einer leichten Aktivitätssteigerung, die der beobachteten Stabilisierung des  $\beta$ -Catenin Proteins im Westernblot entspricht (Abbildung 13). Im Gegensatz dazu zeigten 32D KIT-ITD Zellen eine stimulationsunabhängige und konsistente Aktivierung des c-Myc Promotors um den Faktor zwei (Abbildung 14).

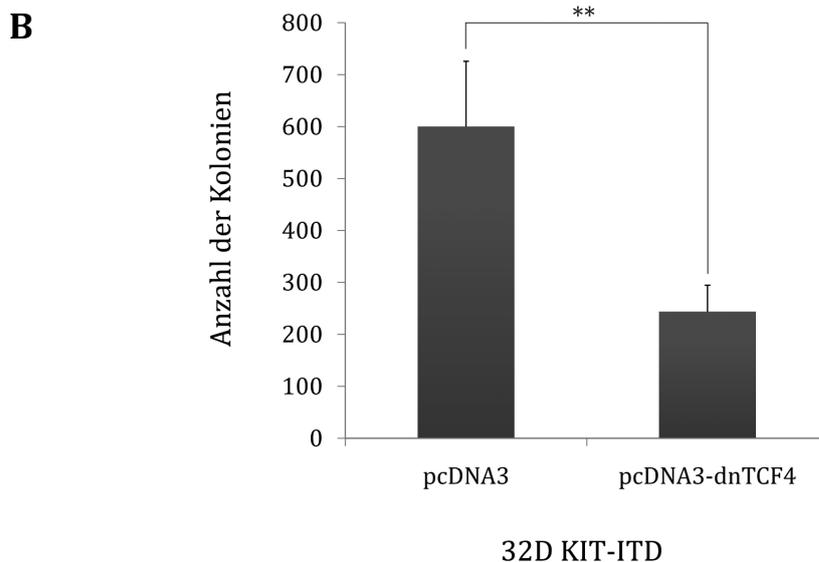
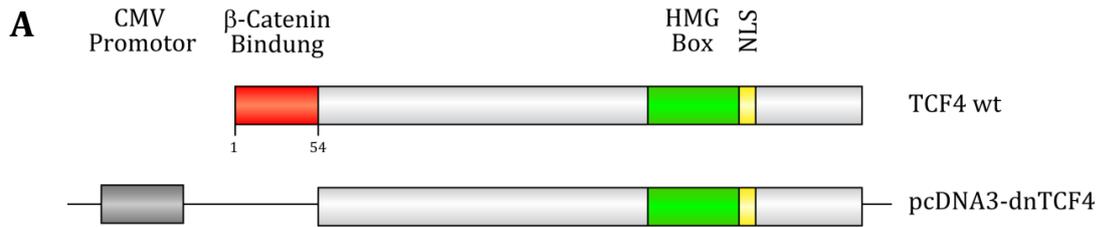
Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den vorherigen Resultaten: Die ITD vermittelte Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin korreliert mit der konstitutiven, TCF abhängigen Promotoraktivierung des WNT Zielgens c-Myc. KIT-ITD ist also in der Lage, auch nachgelagerte Teile des kanonischen WNT Signalwegs zu aktivieren.

### 6.2.5. Dominant negatives TCF4 inhibiert klonales Wachstum ITD transformierter Zellen

KIT-ITD induziert die TCF abhängige Transkription von WNT Zielgenen. Daher sollte untersucht werden, ob diese Aktivierung Einfluss auf das Zellwachstum ITD transformierter Zellen besitzt. Zu diesem Zweck wurde das *colony forming* Potential von 32D KIT-ITD Zellen mittels Kolonieassay analysiert. Im Kolonieassay wird adhärenzlose Proliferation in einem semi-soliden Medium nachgewiesen, das die Zellen räumlich fixiert und somit die Quantifizierung klonaler Kolonien ermöglicht. Große Kolonienzahlen deuten dabei auf ein erhöhtes Transformationspotential der Zellen unter den jeweiligen Bedingungen hin.

**Tabelle 28: Kolonieassays von Leervektor oder dnTCF4 transfizierten 32D KIT-ITD Zellen.**

	pcDNA3			pcDNA3-dnTCF4		
Anzahl der Kolonien, Messung 1	460	448	728	282	252	248
Anzahl der Kolonien, Messung 2	655	729	580	238	149	293
Mittelwert	600			243,7		
StAbw	125,8			50,96		



**Abbildung 15: Effekt von dominant negativem TCF4 auf das Transformationspotential von KIT-ITD. (A)** Domänenstruktur von TCF4 wt und schematische Darstellung des verwendeten Vektors pcDNA3-dnTCF4 (CMV: Cytomegalie Virus; HMG: *high mobility group*; NLS: *nuclear localisation signal*). **(B)** 32D KIT-ITD Zellen wurden mit pcDNA3-dnTCF4 oder dem entsprechenden Leervektor transfiziert und in Gegenwart von G418 als Triplikate in Methylcellulose ausgesät. Nach zehn Tagen wurde das Kolonienwachstum ermittelt. ( $p < 0,01$ , berechnet mit Students t-Test)

Um die Bedeutung klassischer WNT Signaltransduktion für die ITD vermittelte Transformation zu bestimmen, wurden 32D KIT-ITD für diesen Assay transient mit dominant negativem TCF4 (dnTCF4) oder dem entsprechenden Leervektor transfiziert. Im dnTCF4 sind die ersten 54 Aminosäuren, die die Bindung von TCF4 an β-Catenin vermitteln, deletiert (Abbildung 15 A), wodurch die Aktivierung der TCF4 abhängigen Transkription durch β-Catenin unterbunden wird<sup>73, 264, 265</sup>. Die Kolonieassays wurden in Triplikaten mit

jeweils  $1 \cdot 10^3$  Zellen in Gegenwart von G418 angesetzt und nach zehn Tagen ausgezählt. Da der Vektor pcDNA3 eine Neomycin Selektionskassette trägt, konnte durch Gabe von G418 das Wachstum nicht transfizierter Zellen unterdrückt werden. Die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten sind in Tabelle 28 und Abbildung 15 B zusammengefasst.

32D KIT-ITD Zellen, die mit der Leervektorkontrolle transfiziert worden waren, zeigten unter diesen Bedingungen, also in Abwesenheit von IL3, ein starkes klonales Wachstum. Dies steht in Übereinstimmung mit vorangegangenen Untersuchungen, die die faktor-unabhängige Proliferation KIT-ITD transformierter 32D Zellen nachgewiesen konnten<sup>63</sup>. Durch Inhibition der TCF4 Aktivierung durch  $\beta$ -Catenin wurde die Kolonienzahl signifikant um etwa 60 % reduziert.

Das Ergebnis zeigt, dass die Proliferation KIT-ITD exprimierender Zellen stark von der TCF4 Aktivität abhängt und die ITD vermittelte Induktion der TCF4 abhängigen Transkription sogar eine Voraussetzung für die Transformation von 32D Zellen durch diese Art der RTK Mutation darstellt.

### 6.2.6. ITD reprimiert die Expression von $\beta$ -Catenin mRNA

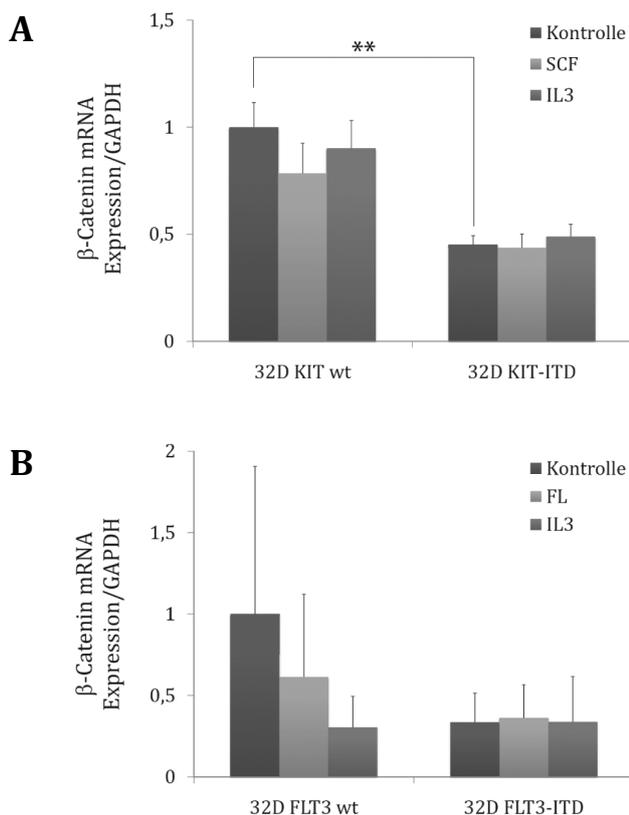
In FLT3-ITD und KIT-ITD transfizierten 32D Zellen akkumuliert  $\beta$ -Catenin im Zytosol<sup>135</sup> (vgl. Abbildung 13). Um zu untersuchen, ob die erhöhte  $\beta$ -Catenin Proteinexpression auf eine transkriptionelle Induktion zurückzuführen ist, wurden 32D KIT wt bzw. 32D KIT-ITD und 32D FLT3 wt bzw. 32D FLT3-ITD Zellen über Nacht von IL3 gehungert. Im Anschluß wurden die Zellen für 6 h mit 1 ng/mL IL3 oder dem entsprechenden RTK Liganden (10 ng/mL SCF oder 40 ng/mL FL) induziert. Die Gesamt-RNA wurde isoliert, cDNA präpariert und die mRNA Expression von  $\beta$ -Catenin und GAPDH per Real-Time PCR gemessen. In Tabelle 29 und Tabelle 30 sind die Ergebnisse mehrerer unabhängiger Experimente zusammengefasst. Die Daten wurden durch Division der  $\beta$ -Catenin mRNA Expressionswerte durch die entsprechenden Werte von GAPDH normalisiert und der Mittelwert sowie die Standardabweichung der verschiedenen Messungen bestimmt. Die Analyse zeigt, dass die Expression der  $\beta$ -Catenin mRNA in ITD transfizierten 32D Zellen nicht induziert ist. In 32D KIT-ITD ist die Expression sogar signifikant reprimiert (Abbildung 16 A und B). Die Akkumulation von  $\beta$ -Catenin Protein ist also auf eine posttranskriptionelle Stabilisierung zurückzuführen.

**Tabelle 29: Real-Time PCR von  $\beta$ -Catenin mRNA aus 32D KIT wt und KIT-ITD Zellen.**

Ansatz		1.Messung		2. Messung		3. Messung		$\beta$ -Catenin/GAPDH mRNA	
		GAPDH	$\beta$ -Catenin	GAPDH	$\beta$ -Catenin	GAPDH	$\beta$ -Catenin	Mittelwert	StAbw
32D KIT wt	K	122,75	212,32	138,52	192,19	83,34	123,49	1,533	0,177
	SCF	102,26	115,57	109,98	113,41	86,18	124,58	1,202	0,216
	IL3	89,19	125,28	82,20	96,25	82,88	130,02	1,381	0,200
32D KIT-ITD	K	190,37	134,33	209,59	131,03	155,15	116,22	0,693	0,063
	SCF	188,86	104,76	190,53	138,47	165,03	119,91	0,669	0,099
	IL3	146,12	108,45	168,42	111,45	119,79	100,74	0,748	0,090

**Tabelle 30: Real-Time PCR von  $\beta$ -Catenin mRNA aus 32D FLT3 wt und FLT3-ITD Zellen.**

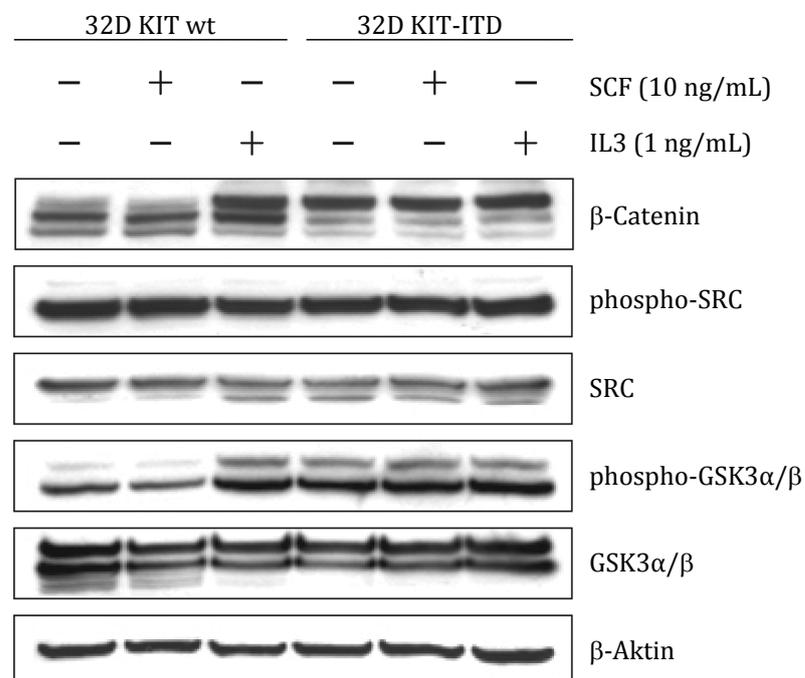
Ansatz		1.Messung		2. Messung		$\beta$ -Catenin/GAPDH mRNA	
		GAPDH	$\beta$ -Catenin	GAPDH	$\beta$ -Catenin	Mittelwert	StAbw
32D FLT3 wt	K	72,3	132,1	153,7	61,4	1,113	1,009
	FL	124,6	135	238,3	67,6	0,684	0,566
	IL3	294,3	143,8	394,5	74,2	0,338	0,213
32D FLT3-ITD	K	584,3	300,9	444,3	104,7	0,375	0,198
	FL	582,1	328,9	264,5	64,2	0,404	0,228
	IL3	619	368,6	297,8	47,1	0,377	0,309



**Abbildung 16:  $\beta$ -Catenin mRNA Expression in ITD transformierten Zellen.** 32D Zellen transfiziert mit KIT wt und KIT-ITD (A) oder FLT3 wt und FLT3-ITD (B) wurden für 6 h mit SCF bzw. FL oder IL3 stimuliert. Mittels Real-Time PCR wurde anschließend die  $\beta$ -Catenin mRNA Expression gegen unbehandelte Zellen bestimmt. Zur Normalisierung der Daten wurde die Expression des Haushaltsgens GAPDH bestimmt. ( $p < 0,01$ , berechnet mit Students t-Test)

### 6.2.7. Stabilisierung von $\beta$ -Catenin durch ITD abhängige GSK3 Inhibition

Die ITD Mutation der Rezeptortyrosinkinasen FLT3 und KIT induziert die Akkumulation zytosolischen  $\beta$ -Catenins, ohne die Expression der  $\beta$ -Catenin mRNA zu erhöhen. Sowohl Stabilität als auch Lokalisation von  $\beta$ -Catenin werden durch Tyrosin- und Serin/Threoninphosphorylierung reguliert. Zwei Kinasen, die maßgeblich an dieser Regulation beteiligt sind, sind GSK3 und SRC: Die Serin/Threoninphosphorylierung durch GSK3 bewirkt  $\beta$ -Catenin Degradation, während die SRC vermittelte Tyrosinphosphorylierung  $\beta$ -Catenin stabilisiert und dessen nukleäre Translokation herbeiführt<sup>266-269</sup>. Die Regulation beider Kinasen erfolgt ebenfalls durch Phosphorylierung. Die konstitutiv aktive Glykogen Synthase Kinase 3 kann durch Phosphorylierung von S21 in GSK3 $\alpha$  bzw. S9 in GSK3 $\beta$  inhibiert werden<sup>270, 271</sup>. Im Gegensatz dazu ist SRC erst nach Phosphorylierung des Tyrosinrests 416 aktiv<sup>272</sup>. Um herauszufinden, ob die ITD Mutation die Aktivität von SRC oder GSK3 beeinflusst und auf diese Weise die erhöhte Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin hervorruft, wurden 32D KIT wt und 32D KIT-ITD Zellen wie zuvor beschrieben (6.2.1) behandelt und der Phosphorylierungsstatus von GSK3 und SRC im Westernblot analysiert



**Abbildung 17: Proteinexpression von  $\beta$ -Catenin und Analyse der SRC- und GSK3-Phosphorylierung in 32D KIT wt und 32D KIT-ITD Zellen.** Stabil transfizierte 32D KIT wt und KIT-ITD Zellen wurden 6 h mit SCF und IL3 stimuliert. Anschließend wurde die Expression von  $\beta$ -Catenin sowie die Phosphorylierung von GSK3 und SRC in behandelten und unbehandelten Zellen durch Westernblot Analyse bestimmt.  $\beta$ -Aktin wurde als Ladekontrolle nachgewiesen.

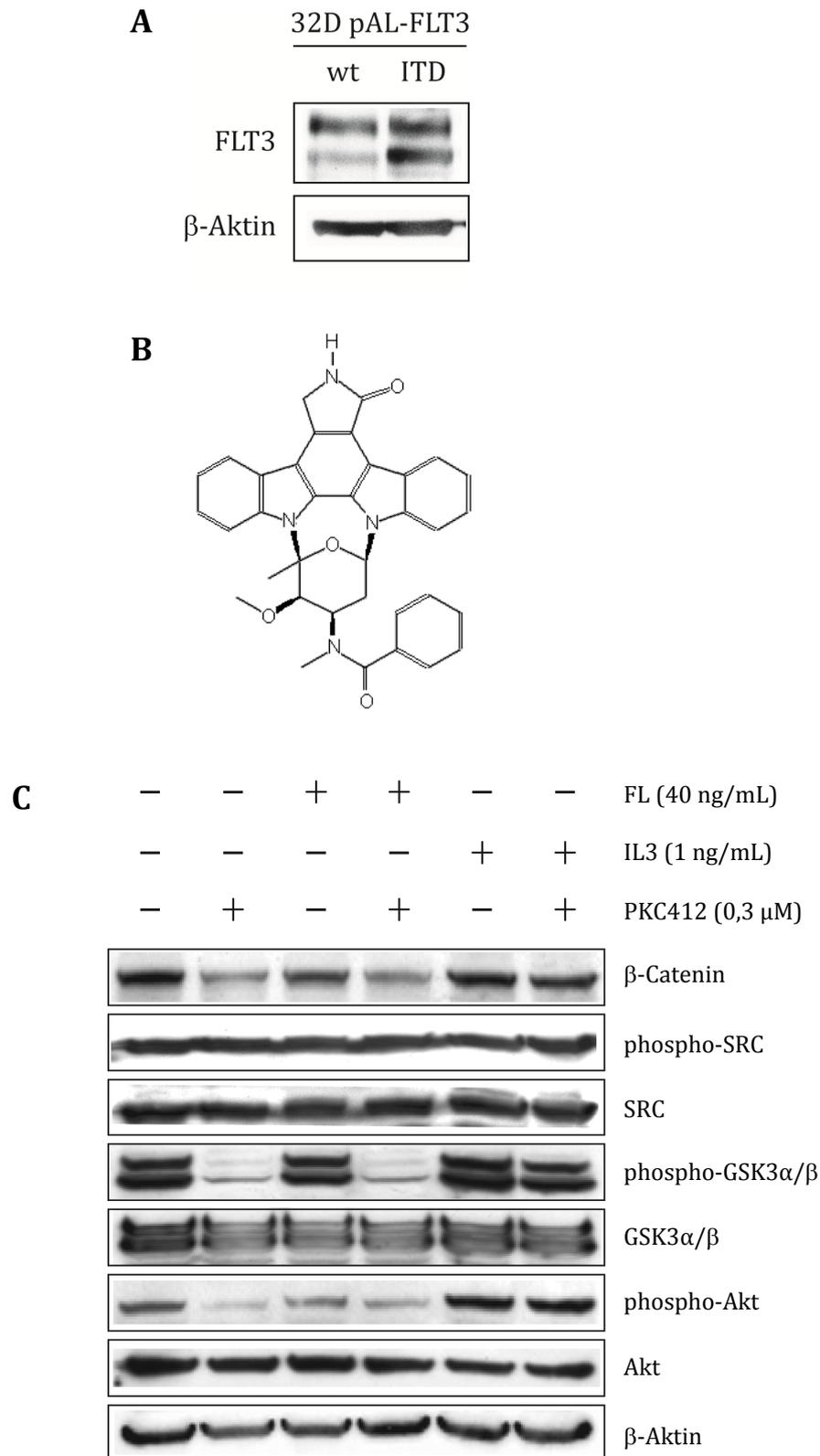
(Abbildung 17). Die Detektion von phospho-SRC (pY416) ergab, dass die Kinase in beiden Zelllinien gleichermaßen phosphoryliert und somit aktiv war. Bei der Analyse von phospho-GSK3 $\alpha/\beta$  (pS9/pS21) zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede: In unstimulierten und SCF behandelten 32D KIT wt Zellen waren beide Isoformen der Kinase nur geringfügig phosphoryliert. KIT-ITD sowie IL3 stimulierte KIT wt Zellen wiesen hingegen eine starke GSK3 Phosphorylierung auf, die im Fall von GSK3 $\beta$  (46 kDa) noch deutlicher als für GSK3 $\alpha$  (51 kDa) ausfiel. In der Westernblot Analyse korrelierte eine stärkere GSK3 Phosphorylierung/Inhibition mit einem höheren  $\beta$ -Catenin Proteinlevel.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die  $\beta$ -Catenin regulierende Kinase GSK3 *downstream* von ITD, jedoch nicht von SCF behandeltem KIT wt an inhibitorischen Serinresten phosphoryliert wird. Die interne Tandemduplikation induziert also im Vergleich zum aktiven, wildtypischen Rezeptor eine stimulationsunabhängige Veränderung der Signalqualität. Die resultierende Inhibition von phospho-GSK3 $\alpha/\beta$  führt folgerichtig zur Stabilisierung und Anreicherung von  $\beta$ -Catenin in ITD transformierten Zellen.

### **6.2.8. Inhibition onkogener RTK Aktivität beeinträchtigt die $\beta$ -Catenin Stabilität und erniedrigt die GSK3 Phosphorylierung**

In KIT-ITD transfizierten Zellen wird die  $\beta$ -Catenin Kinase GSK3 durch Phosphorylierung inhibiert, gleichzeitig kann die Anreicherung von  $\beta$ -Catenin beobachtet werden. Daher sollte untersucht werden, ob (i) GSK3 Inhibition einen generellen Mechanismus in der ITD vermittelten Aktivierung des WNT Signalwegs darstellt und ob (ii) der Einsatz des *small molecule* Tyrosinkinaseinhibitors PKC412 (Midostaurin) Auswirkungen auf die Inhibition von GSK3 und die Stabilität von  $\beta$ -Catenin hat. PKC412 gilt als potenter Inhibitor der Rezeptortyrosinkinase FLT3<sup>273</sup>.

Zu diesem Zweck wurden zunächst 32D FLT3-ITD Zellen im Westernblot hinsichtlich der FLT3-ITD Expression im Vergleich zu 32D FLT3 wt untersucht (Abbildung 18 A). Beide stabil transfizierten Zelllinien waren im Labor vorhanden. Die Analyse zeigte die typische Doppelbande, die mit der unreifen (140 kDa) und der reifen, oberflächenexprimierten Form (160 kDa) des Rezeptors korreliert<sup>21</sup>.  $\beta$ -Aktin wurde als Ladekontrolle nachgewiesen.



**Abbildung 18: Einfluss von PKC412 auf die Phosphorylierung von Proteinen und Regulatoren des WNT Signalwegs.** (A) Westernblot Analyse der ektopischen FLT3 Expression in 32D FLT3 wt und 32D FLT3-ITD Zellen. (B) Strukturformel von PKC412. (C) 32D FLT3-ITD Zellen wurden mit PKC412 oder DMSO in Gegenwart von IL3 und FL behandelt. Die Expression von  $\beta$ -Catenin sowie die Phosphorylierung von SRC, GSK3 und Akt wurden im Anschluß per Westernblot Analyse untersucht.  $\beta$ -Aktin wurde als Ladekontrolle detektiert.

Um die Wirkung der FLT3 Inhibition auf Komponenten des klassischen WNT Signalwegs zu untersuchen, wurden 32D FLT3-ITD Zellen 16 h von IL3 gehungert, in komplementiertem RPMI Medium ohne weitere Zusätze, mit 40 ng/mL FL oder 1 ng/mL IL3 aufgenommen und inkubiert. Nach 6 h wurden die Zellen für weitere 8 h entweder mit PKC412 (300 nM) (Abbildung 18 B) oder DMSO behandelt und anschließend lysiert. Die Proteinexpression wurde mittels Westernblotting analysiert (Abbildung 18 C).

Die Inhibition von FLT3-ITD durch PKC412 induzierte eine Abnahme des  $\beta$ -Catenin Proteinlevels in Kontrollzellen und in Zellen, die mit dem FLT3 Liganden FL behandelt worden waren (*lane 2 und 4*). Lediglich die gleichzeitige Inkubation mit IL3 konnte der  $\beta$ -Catenin Reduktion durch den Tyrosinkinaseinhibitor entgegenwirken, was bestätigt, dass das Interleukin über einen alternativen, FLT3 unabhängigen Signalweg die  $\beta$ -Catenin Akkumulation beeinflusst. In Übereinstimmung mit der verminderten  $\beta$ -Catenin Expression nach PKC412 Behandlung konnte auch der Rückgang der inhibitorischen GSK3 Phosphorylierung detektiert werden. Im Gegensatz dazu hatte PKC412 keinerlei Auswirkungen auf den Status der SRC Phosphorylierung.

Da die Serinreste 9 und 21 in GSK3 $\alpha$  bzw. GSK3 $\beta$  Targets der Proteinkinase B/Akt sind, die selbst *downstream* von FLT3 und KIT aktiviert wird<sup>31, 34, 270</sup>, wurde in diesem Zusammenhang auch die Aktivierung von Akt durch Phosphorylierung an S473 untersucht<sup>274</sup>. Aktiviertes Akt konnte in Zellen nachgewiesen werden, die mit der DMSO Kontrolle behandelt oder mit IL3 inkubiert worden waren. PKC412 hingegen inhibierte die Akt Phosphorylierung.

Hier konnte gezeigt werden, dass die interne Tandemduplikation hämatopoetischer Rezeptortyrosinkinasen die Phosphorylierung inhibitorischer Reste der Glycogen Synthase Kinase 3 induziert. Diese Inhibition korrelierte mit der Aktivierung der GSK3 vorge-schalteten Kinase Akt und einem erhöhten  $\beta$ -Catenin Proteinlevel. Im Gegensatz dazu hemmt die Behandlung mit dem Rezeptortyrosinkinaseinhibitor PKC412 die Aktivierung von Akt ebenso wie die inhibitorische Phosphorylierung von GSK3 und führt zu einem verminderten  $\beta$ -Catenin Proteinlevel. Zusammengenommen zeigen die Daten, dass die strukturell und funktionell verwandten, onkogenen RTKs FLT3-ITD und KIT-ITD über einen gemeinsamen, posttranskriptionellen Mechanismus, der die Inhibition von GSK3 involviert, die Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin induzieren. Die interne Tandemduplikation bewirkt eine aberrante Verknüpfung von RTK Signaltransduktion und der klassischen WNT Signalkaskade, die auch nachgelagerte Teile des WNT Signalwegs aktiviert und zumindest teilweise zur ITD vermittelten Transformation myeloischer Zellen beiträgt.

### 6.2.9. In 32D KIT-ITD ist $\beta$ -Catenin an aminoterminalen, regulatorischen Resten phosphoryliert

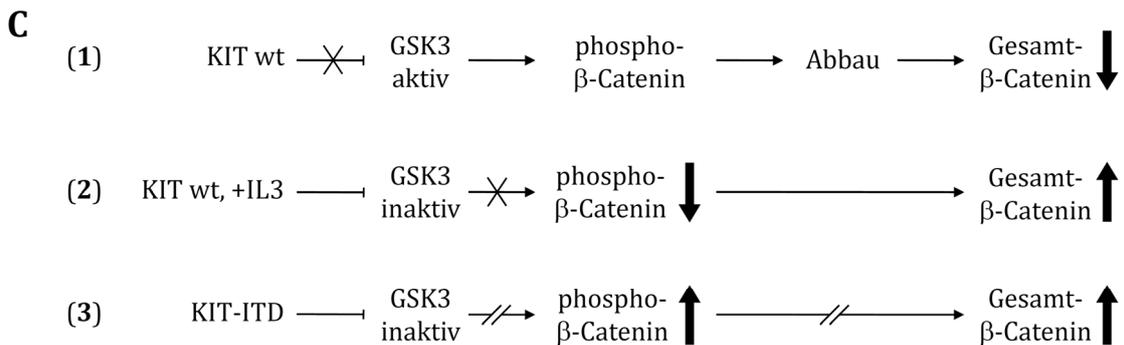
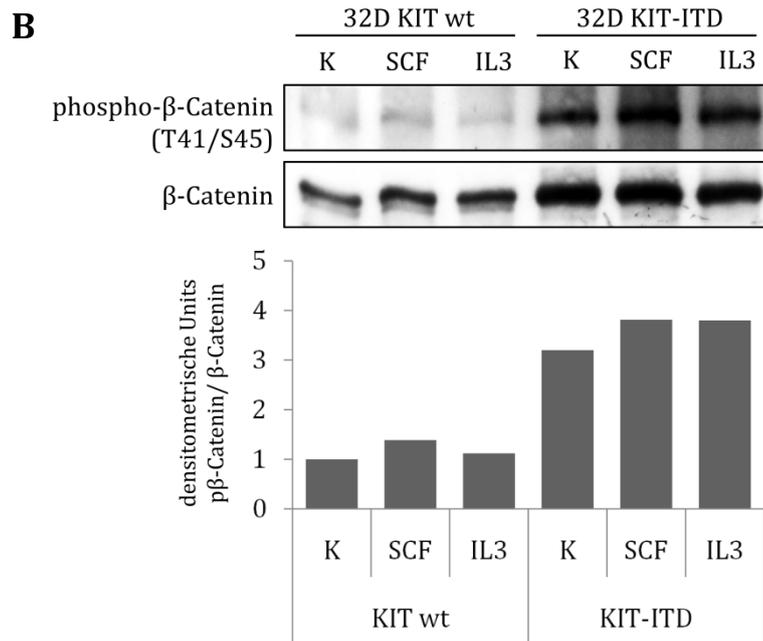
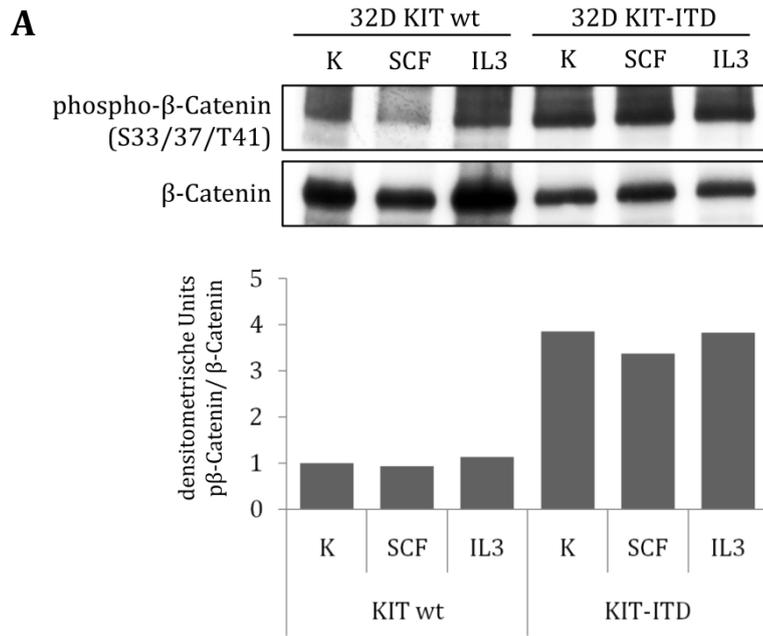
Aktive Glycogen Synthase Kinase 3 ist für die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin an regulatorischen Resten in der N-terminalen Domäne (T41/S37/S33) verantwortlich, die das Protein für die sofortige Polyubiquitinylierung und den Abbau im Proteasom markiert<sup>78, 82</sup>. In 32D KIT-ITD und in IL3 behandelten 32D KIT wt Zellen konnte eine entsprechende Korrelation von GSK3 Hemmung und  $\beta$ -Catenin Akkumulation nachgewiesen werden.

Um zu untersuchen, ob die Inhibition von GSK3 und die Anreicherung von  $\beta$ -Catenin mit einer reduzierten  $\beta$ -Catenin Serin/Threoninphosphorylierung einhergehen, wurden stabil transfizierte 32D KIT wt und KIT-ITD Zellen wie unter 6.2.1. beschrieben mit IL3 oder SCF stimuliert. Nach 6 h wurden die Zellen lysiert und die Proteinlysate zur Immunpräzipitation von  $\beta$ -Catenin eingesetzt. Der Phosphorylierungsstatus von  $\beta$ -Catenin wurde mit Hilfe zweier Antikörper im Westernblot analysiert: der erste Antikörper detektiert  $\beta$ -Catenin, das an S33/37/T41 phosphoryliert ist (Abbildung 19 A), der zweite bindet an phospho- $\beta$ -Catenin (T41/S45) (Abbildung 19 B). Das Verhältnis von phospho- $\beta$ -Catenin zu präzipitiertem Gesamt- $\beta$ -Catenin wurde densitometrisch ausgewertet.

In Übereinstimmung mit den bisherigen Ergebnissen und der Literatur konnte in KIT wt Zellen nur wenig phospho- $\beta$ -Catenin nachgewiesen werden. Hier war zuvor in Kontrollzellen und Zellen, die mit SCF behandelt worden waren, kein Einfluss der Rezeptortyrosinkinase KIT auf die konstitutiv aktive Kinase GSK3 gemessen worden (vgl. Abbildung 17, *lane* 1 und 2). GSK3 konnte daher die umgehende Degradation von  $\beta$ -Catenin einleiten und somit ein niedriges phospho- und Gesamt- $\beta$ -Catenin Level bedingen (Abbildung 19 C (1)).

In IL3 stimulierten KIT wt Zellen konnte bereits die Zytokin induzierte Inhibition von GSK3 und die daraus resultierende Akkumulation von zytosolischem  $\beta$ -Catenin nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 17, *lane* 3). Entsprechend wurde hier nur eine geringe Phosphorylierung des präzipitierten  $\beta$ -Catenins detektiert (Abbildung 19 C (2)).

Interessanterweise zeigten KIT-ITD exprimierenden Zellen, in denen zuvor die inhibitorische Phosphorylierung von GSK3 und die Stabilisierung von Gesamt- $\beta$ -Catenin nachgewiesen worden war (vgl. Abbildung 17, *lane* 4 bis 6), eine konsistente, drei- bis vierfach höhere  $\beta$ -Catenin Phosphorylierung als 32D Zellen mit wildtypischem Rezeptor. Dies galt für beide untersuchten Phosphorylierungsmuster und war unabhängig von extrazellulären Stimuli. Dieser Zusammenhang ist schematisch in Abbildung 19 C (3) dargestellt.



**Abbildung 19:  $\beta$ -Catenin Serin/Threoninphosphorylierung in 32D KIT wt und KIT-ITD Zellen.** 32D KIT wt und KIT-ITD Zellen wurden für 6 h mit SCF oder IL3 stimuliert und danach zusammen mit unbehandelten Zellen lysiert. Die Lysate wurden zur Immunpräzipitation von  $\beta$ -Catenin eingesetzt. Die  $\beta$ -Catenin Phosphorylierung wurde im Westernblot mit Antikörpern gegen  $\beta$ -Catenin pS33/37/T41 (**A**) bzw. pT41/S45 (**B**) untersucht und die Bandenintensität densitometrisch relativ zum präzipitierten Gesamt- $\beta$ -Catenin ausgewertet. (**C**) Schematische Darstellung der kausalen Verbindungen zwischen GSK3 Aktivität, phospho- $\beta$ -Catenin und Gesamt- $\beta$ -Catenin Expression. Die unterbrochenen Pfeile kennzeichnen Zusammenhänge, die im Widerspruch zur klassischen Regulation der  $\beta$ -Catenin Stabilität durch GSK3 stehen.

---

Dieses Ergebnis zeigt zum einen, dass die KIT-ITD Mutation zur Stabilisierung von phosphoryliertem  $\beta$ -Catenin führt, und zum anderen, dass eine andere Serin/Threoninkinase als GSK3  $\beta$ -Catenin in KIT-ITD exprimierenden Zellen an regulatorischen Resten in der N-terminalen Domäne phosphoryliert.

## 6.3. $\beta$ -Catenin ist ein neues Substrat von Aurora Kinase B

### 6.3.1. Phospho- $\beta$ -Catenin bindet an mitotische Strukturen

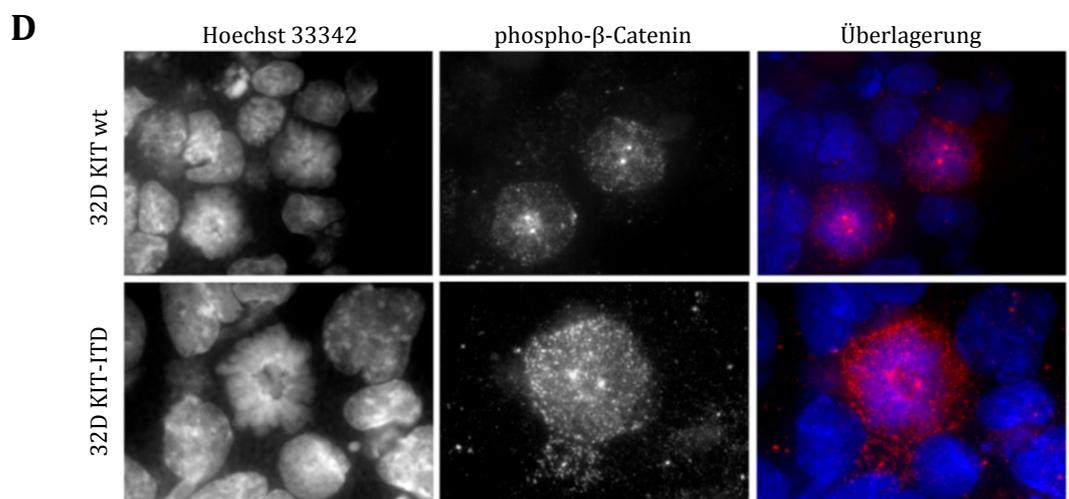
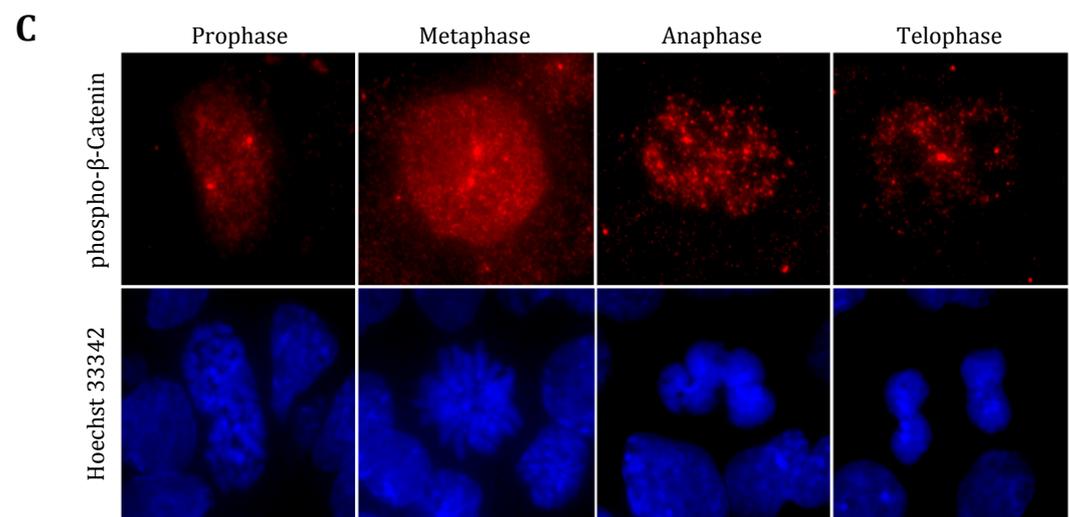
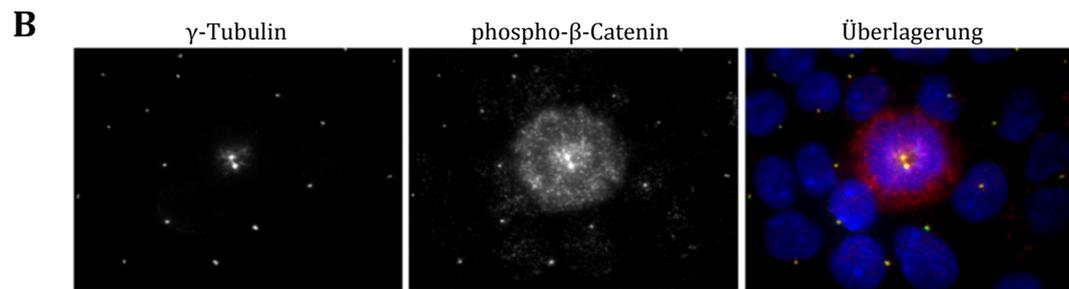
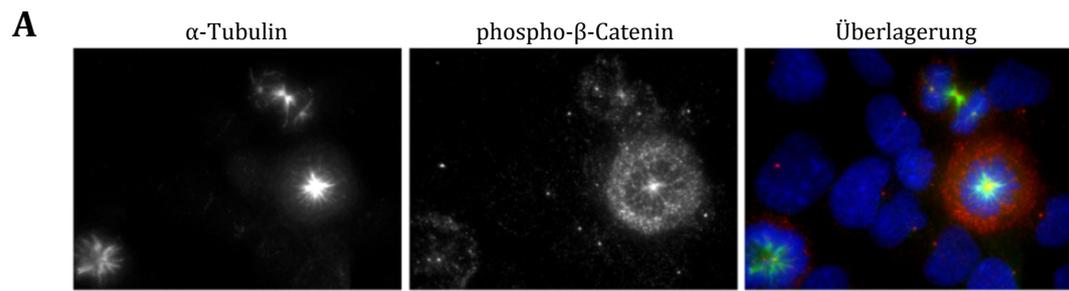
In KIT-ITD transformierten 32D Zellen konnte die Anreicherung von aminoterminal phosphoryliertem  $\beta$ -Catenin beobachtet werden. Um zu überprüfen, welche Rolle phospho- $\beta$ -Catenin in hämatopoetischen Zellen spielt, wurde die subzelluläre Verteilung des Proteins mittels Immunfluoreszenzfärbung mit phosphospezifischen Antikörpern untersucht. Dazu wurden 32D Zellen durch Zytozentrifugation auf Objektträger aufgebracht und mit Antikörpern gegen phospho- $\beta$ -Catenin (S33/37/T41) oder phospho- $\beta$ -Catenin (T41/S45) gefärbt.

#### 6.3.1.1. *Phospho- $\beta$ -Catenin (S33/37/T41) ist an den Zentrosomen lokalisiert*

Die Immunfluoreszenzanalyse von phospho- $\beta$ -Catenin (S33/37/T41) zeigte, dass das Protein in Interphase- und mitotischen Zellen an den Zentrosomen lokalisiert ist. Dies konnte durch Cofärbung mit dem Zentrosomenmarker  $\gamma$ -Tubulin<sup>275-277</sup> bestätigt werden (Abbildung 20 A und B). In der Mitose konnte darüber hinaus ein drastischer Anstieg von zytosolischem phospho- $\beta$ -Catenin beobachtet werden. Die höchste Konzentration wurde in der Metaphase detektiert, verringerte sich im weiteren Verlauf der Mitose und war in der Zytokinese und Interphase kaum mehr nachweisbar (Abbildung 20 C). Beim Eintritt in die Zytokinese konnte phospho- $\beta$ -Catenin zudem in Assoziation mit den Midbodies sich teilender Zellen detektiert werden (Abbildung 20 A und C). Allerdings zeigten sich insgesamt keine qualitativen Unterschiede zwischen KIT wt und KIT-ITD exprimierenden Zellen (Abbildung 20 D), ebenso wenig konnte ein Einfluss der Zytokine SCF und IL3 auf die Lokalisation festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

---

**Abbildung 20: Lokalisation von phospho- $\beta$ -Catenin (S33/37/T41) in 32D KIT wt und KIT-ITD Zellen.** Stabil transfizierte 32D Zellen wurden mit den angegebenen Antikörpern für die Immunfluoreszenzanalyse gefärbt. DNA wurde mit Hoechst 33342 gefärbt (blau). Die Zellen wurden bei 1000facher Vergrößerung untersucht. **(A)**  $\alpha$ -Tubulin (Mikrotubuli) (grün)/phospho- $\beta$ -Catenin (rot) und **(B)**  $\gamma$ -Tubulin (Zentrosomen) (grün)/phospho- $\beta$ -Catenin (rot) Cofärbung von 32D KIT Zellen. **(C)** Lokalisation von phospho- $\beta$ -Catenin in den verschiedenen Phasen der Mitose. **(D)** Phospho- $\beta$ -Catenin Färbung von 32D KIT wt oder 32D KIT-ITD Zellen in der Meta- und Interphase.



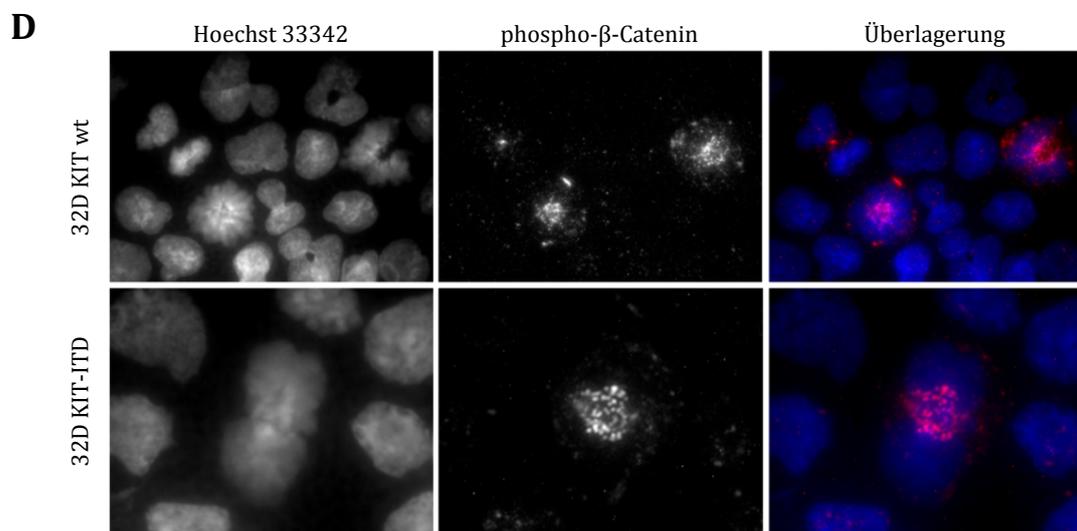
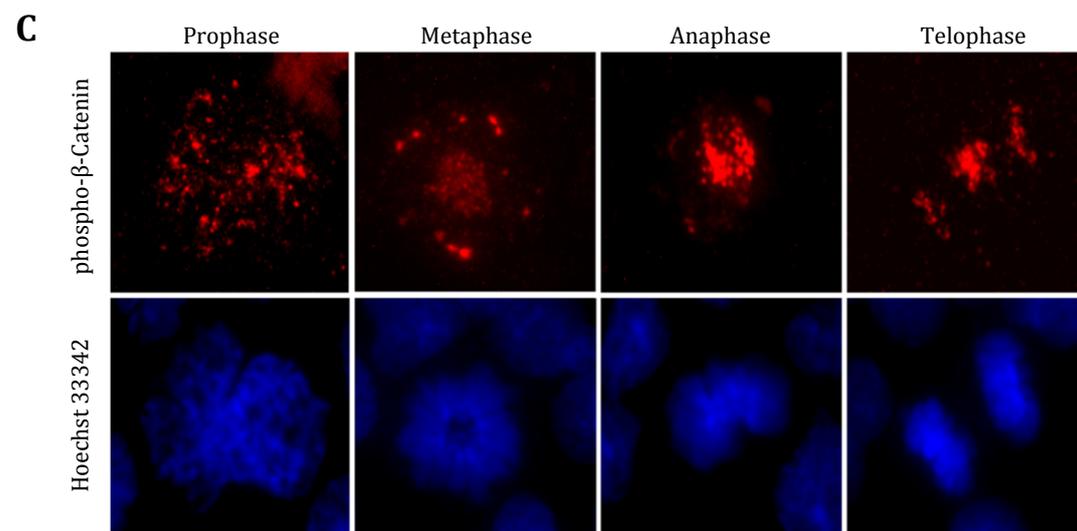
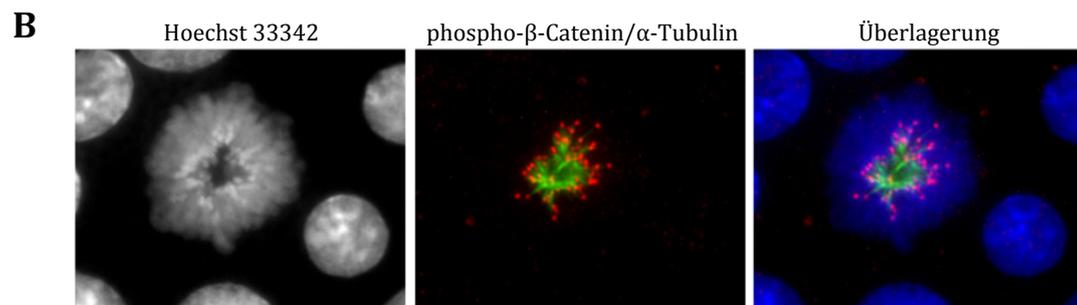
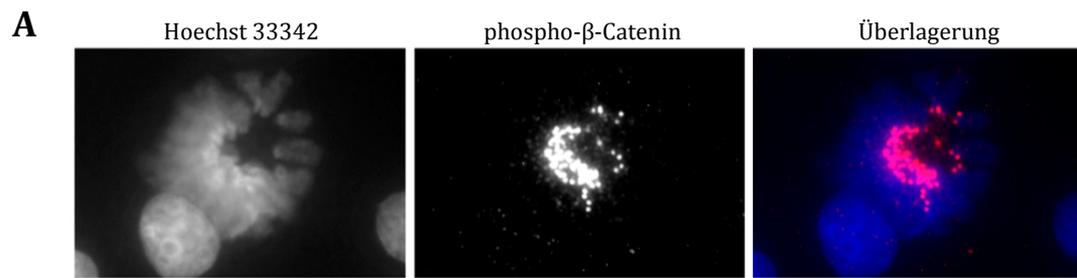
### 6.3.1.2. *Phospho- $\beta$ -Catenin (T41/S45) bindet an Kinetochore*

In der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung von phospho- $\beta$ -Catenin (T41/S45) konnte das Protein ausschließlich in mitotischen Zellen nachgewiesen werden, wo es mit den Kinetochoren der kondensierten Chromosomen assoziiert war (Abbildung 21 A und B). Phospho- $\beta$ -Catenin wurde zuerst in der Prophase sichtbar. In der Metaphase konnte es vor allem an Kinetochoren, in einigen Zellen aber auch an großen zytosolischen Strukturen nachgewiesen werden. Mit Einsetzen der Anaphase und Trennung der Chromatiden konnte eine Verlagerung in die Zentralspindel und später in den Midbody beobachtet werden (Abbildung 21 C).

Wie bei dem zuvor untersuchten Phosphorylierungsmuster (S33/37/T41) waren auch in diesem Fall keine qualitativen Unterschiede zwischen KIT wt und KIT-ITD exprimierenden Zellen auszumachen (Abbildung 21 D). Es konnte kein Einfluss von Zytokinen (SCF, IL3) auf die subzelluläre Lokalisation von phospho- $\beta$ -Catenin (T41/S45) gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

---

**Abbildung 21: Immunfluoreszenzfärbungen von phospho- $\beta$ -Catenin (T41/S45) in 32D KIT wt bzw. KIT-ITD Zellen.** Stabil transfizierte 32D KIT wt und 32D KIT-ITD wurden mit den angegebenen Antikörpern bzw. mit Hoechst 33342 (DNA) gefärbt (blau) und mittels Immunfluoreszenzmikroskopie bei 1000facher Vergrößerung untersucht und fotografiert. **(A)** Phospho- $\beta$ -Catenin Färbung einer Zeller in der Metaphase. **(B)**  $\alpha$ -Tubulin (Mikrotubuli) (grün)/phospho- $\beta$ -Catenin (rot) Cofärbung von 32D KIT. **(C)** Lokalisation von phospho- $\beta$ -Catenin in den verschiedenen Phasen der Mitose. **(D)** Färbung von mitotischen und Interphase 32D KIT wt und 32D KIT-ITD.

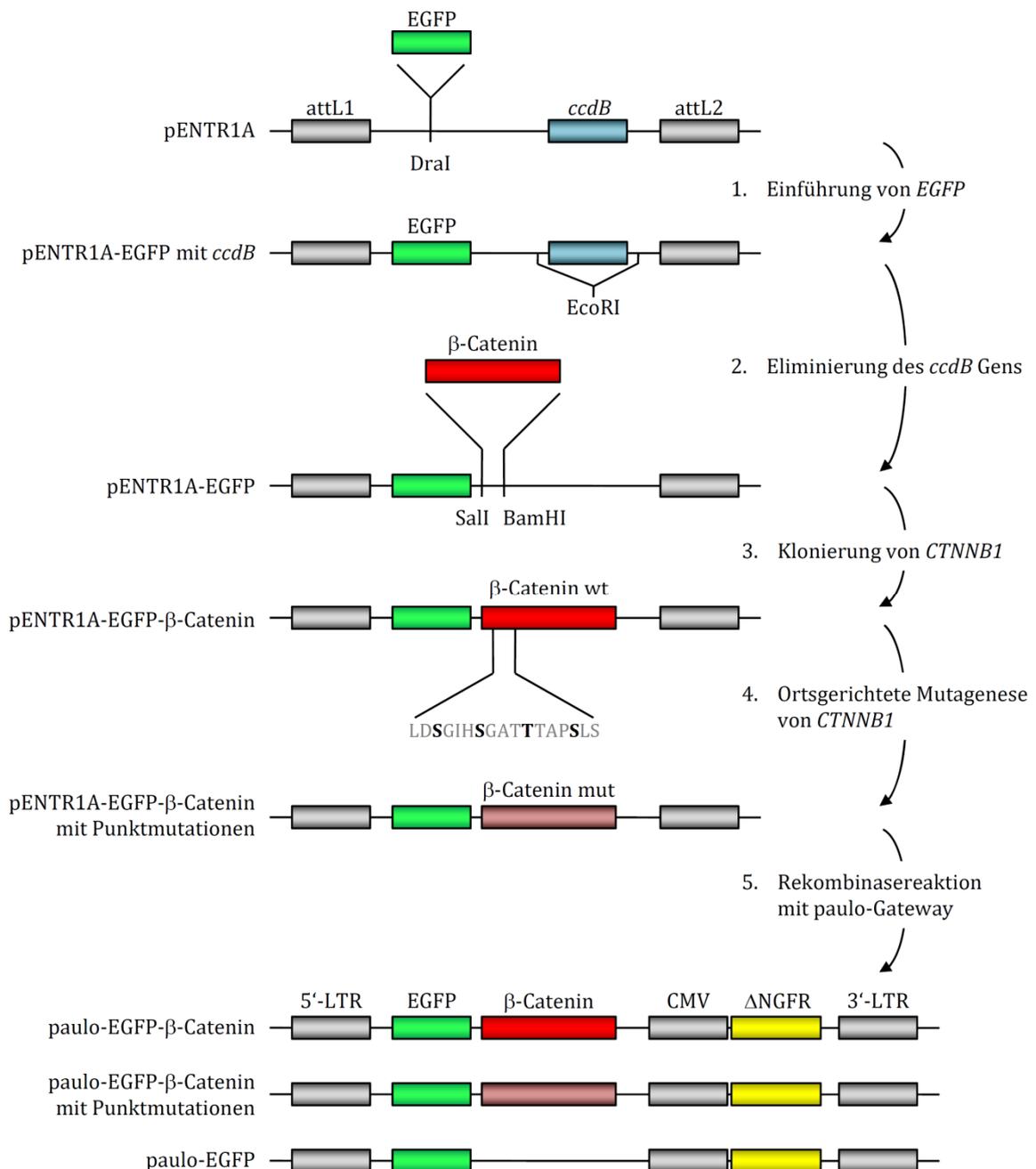


Zusammengenommen zeigen die Daten, dass unterschiedliche Phosphorylierungsmuster von  $\beta$ -Catenin mit unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen des Proteins in mitotischen 32D Zellen verbunden sind.

### 6.3.2. Klonierung und Mutagenese von EGFP- $\beta$ -Catenin für die Infektion myeloischer Vorläuferzellen

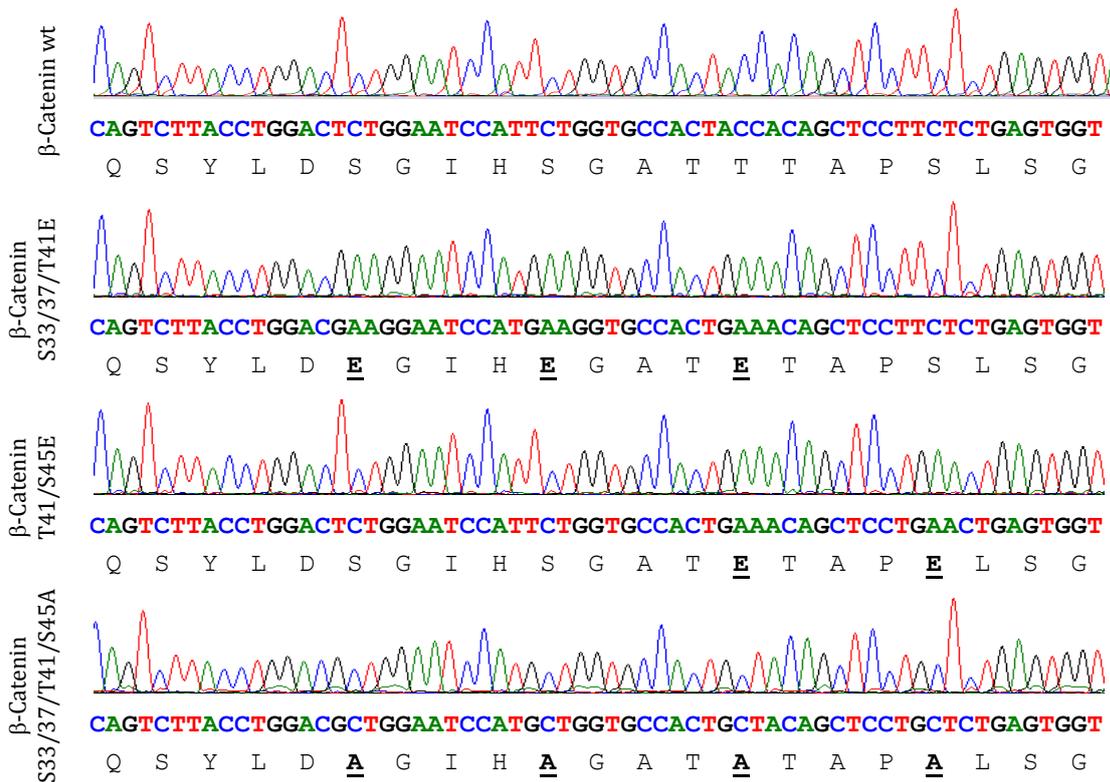
Zur Analyse der subzellulären Lokalisation von phospho- $\beta$ -Catenin wurde ein Modell etabliert, bei dem EGFP gekoppeltes  $\beta$ -Catenin wt und EGFP gekoppelte  $\beta$ -Catenin Punktmutanten in 32D Zellen exprimiert wurden. Die hierfür benötigten Konstrukte wurden nach der in Abbildung 22 dargestellten Klonierungsstrategie mit Hilfe des Gateway® Klonierungssystem generiert.

Zunächst wurde *EGFP* cDNA mittels PCR aus pcDNA3-EGFP amplifiziert und als *blunt-end* Fragment in die *DraI* Restriktionsschnittstelle des *Entry* Vektors pENTR1A eingefügt. Das resultierende Plasmid wurde mit *EcoRI* verdaut und religiert, um das *ccdB* Gen zu eliminieren (pENTR1A-EGFP).  $\beta$ -Catenin cDNA (*CTNNB1*) wurde aus pcDNA3- $\beta$ -Catenin amplifiziert, wobei das 5'-Ende mit einer *Sall* und das 3'-Ende mit einer *BamHI* Restriktionsschnittstelle versehen wurde. Nach dem *Sall/BamHI* Verdau wurde das *CTNNB1* Fragment in pENTR1A-EGFP kloniert (pENTR1A-EGFP- $\beta$ -Catenin). Dieser *Entry* Klon diente als Template für die ortsgerichtete Mutagenese aminoterminaler Serin- und Threoninreste von  $\beta$ -Catenin. Nach der Sequenzierung der Konstrukte wurden pENTR1A-EGFP, pENTR1A-EGFP- $\beta$ -Catenin sowie pENTR1A-EGFP- $\beta$ -Catenin mit verschiedenen Punktmutationen (pENTR1A-EGFP- $\beta$ -Catenin mut) für die Rekombinasereaktion mit dem retroviralen *Destination* Vektor paulo-Gateway eingesetzt. Das Plasmid trägt eine verkürzte, inaktive Form des humanen *nerve growth factor receptor* ( $\Delta$ NGFR) unter der Kontrolle des CMV Promotors als Reportergen.



**Abbildung 22: Klonierungsstrategie für die Herstellung von paulo-EGFP-β-Catenin wt und mut.** EGFP wurde amplifiziert und in die DraI Restriktionsschnittstelle von pENTR1A eingeführt (1.). Nach der Eliminierung von ccdB (2.) wurde CTNNB1 *in frame* mit EGFP in die Sall/BamHI Schnittstelle kloniert (3.) und der ortsgerichteten Mutagenese N-terminaler Serin- und Threoninreste unterworfen (4.). Der Kontrollvektor pENTR1A-EGFP sowie pENTR1A-EGFP-β-Catenin wt/mut wurden zur Rekombinasereaktion mit dem Destination Plasmid paulo-Gateway eingesetzt (5.). Die resultierenden Vektoren ermöglichten die Expression von EGFP gekoppeltem β-Catenin unter der Kontrolle der MMLV-LTRs. Eine trunktierte Form des NGFR diente als Reporter gen.

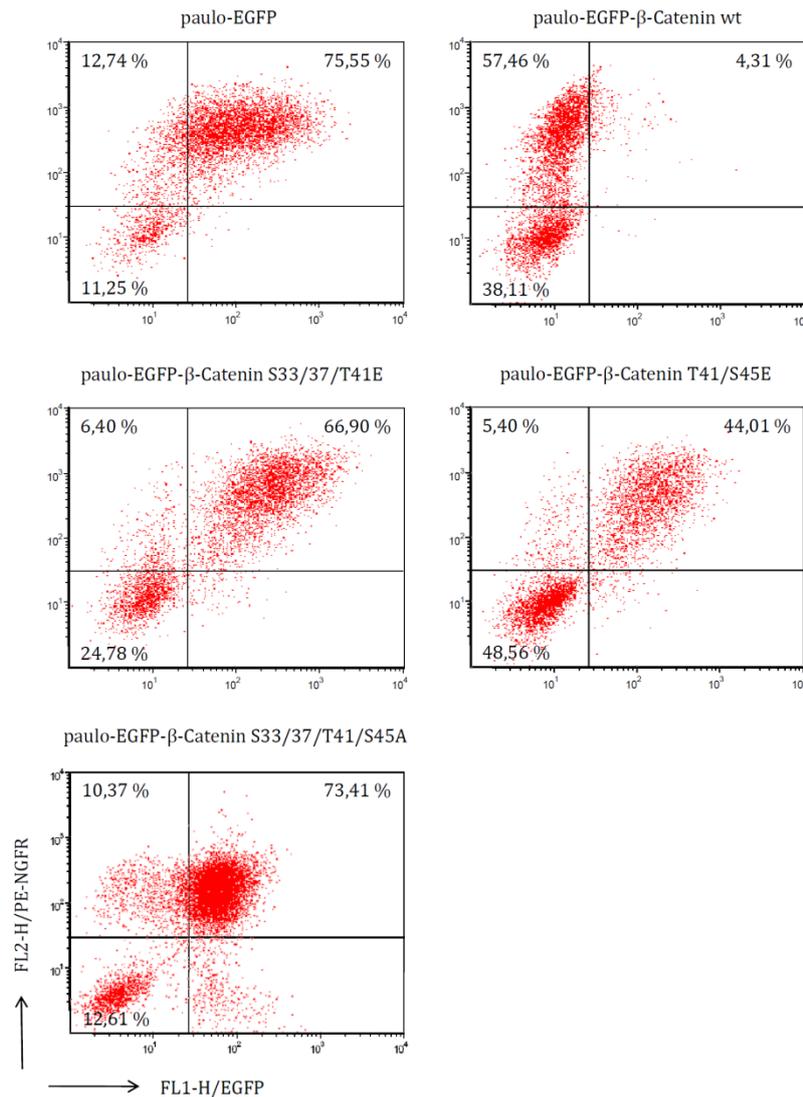
Mittels ortsgerichteter Mutagenese wurden die regulatorischen Reste S33, S37, T41 und/oder S45 in der aminoterminalen Domäne von  $\beta$ -Catenin durch Glutaminsäure (E) oder Alanin (A) ersetzt. Die Mutation zu Alanin verhindert die Phosphorylierung, während die Substitution durch Glutamat eine weitverbreitete Methode zur Imitation einer Phosphorylierung darstellt<sup>278-280</sup>. Es wurden drei  $\beta$ -Catenin Punktmutanten generiert:  $\beta$ -Catenin S33/37/T41E,  $\beta$ -Catenin T41/S45E sowie  $\beta$ -Catenin S33/37/T41/S45A. Nach erfolgter Mutagenese wurden die Konstrukte per Sequenzierung überprüft (Abbildung 23).



**Abbildung 23: Sequenzanalyse der hergestellten  $\beta$ -Catenin Punktmutanten.** Mit Hilfe ortsgerichteter Mutagenese wurden verschiedene Punktmutationen von pENTR1A-EGFP- $\beta$ -Catenin hergestellt und zur Analyse sequenziert. Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte unter Verwendung der Software BioEdit Sequence Alignment Editor.

### 6.3.3. Expression von EGFP- $\beta$ -Catenin wt und Mutanten in 32D Zellen

Zur Untersuchung der Funktion phosphorylierter  $\beta$ -Catenin Serin- und Threoninreste in der Mitose wurden 32D Zellen mit ekotrophen, retroviralen Überständen von paulo-EGFP, paulo-EGFP- $\beta$ -Catenin wt, paulo-EGFP- $\beta$ -Catenin S33/37/T41E, paulo-EGFP-



**Abbildung 24: Herstellung EGFP-β-Catenin exprimierender 32D Zellen.** 32D Zellen wurden mit retroviralen Überständen von paulo-EGFP, paulo-EGFP-β-Catenin wt, paulo-EGFP-β-Catenin S33/37/T41E, paulo-EGFP-β-Catenin T41/S45E und paulo-EGFP-β-Catenin S33/37/T41/S45A infiziert. Zur Bestimmung der Infektionseffizienz wurde die Oberflächenexpression von ΔNGFR gegen EGFP gemessen.

β-Catenin T41/S45E und paulo-EGFP-β-Catenin S33/37/T41/S45A infiziert. 48 h nach der Infektion wurden die Zellen mit einem PE-gekoppelten Antikörper gegen NGFR gefärbt und die Transfektionseffizienz durchflußzytometrisch gegen GFP gemessen (Abbildung 24).

Für jedes der Konstrukte wurde eine Infektionseffizienz von mindestens 50 % anhand der Expression des Reportergens NGFR nachgewiesen. Leervektor sowie β-Catenin mut infizierte Zellen exprimierten zudem auch EGFP bzw. die EGFP Fusionsproteine. In den β-Catenin wt exprimierenden Zellen konnte hingegen kaum EGFP-β-Catenin detektiert werden, was mit der Theorie, dass β-Catenin in Abwesenheit eines WNT Signals phosphoryliert und abgebaut wird, übereinstimmt. Folgerichtig zeigten 32D EGFP-β-Catenin

S33/37/T41/S45A Zellen, bei denen die Serin/Threoninsubstitution durch Alanin die aminoterminal Phosphorylierung und Degradation von  $\beta$ -Catenin verhindert, eine sehr starke Expression des Transgens. Auch die phospho-imitierenden Mutanten von  $\beta$ -Catenin, EGFP- $\beta$ -Catenin S33/37/T41E und EGFP- $\beta$ -Catenin T41/S45E, konnten mit Hilfe der durchflußzytometrischen Analyse detektiert werden. Die negative Ladung des Glutamats allein schien nicht ausreichend zu sein, um den Abbau von  $\beta$ -Catenin zu induzieren. Dieser Sachverhalt wurde bereits von Aberle et al. beschrieben<sup>281</sup>.

#### 6.3.4. $\beta$ -Catenin Assoziation mit subzellulären Strukturen geht der N-terminalen Phosphorylierung voraus

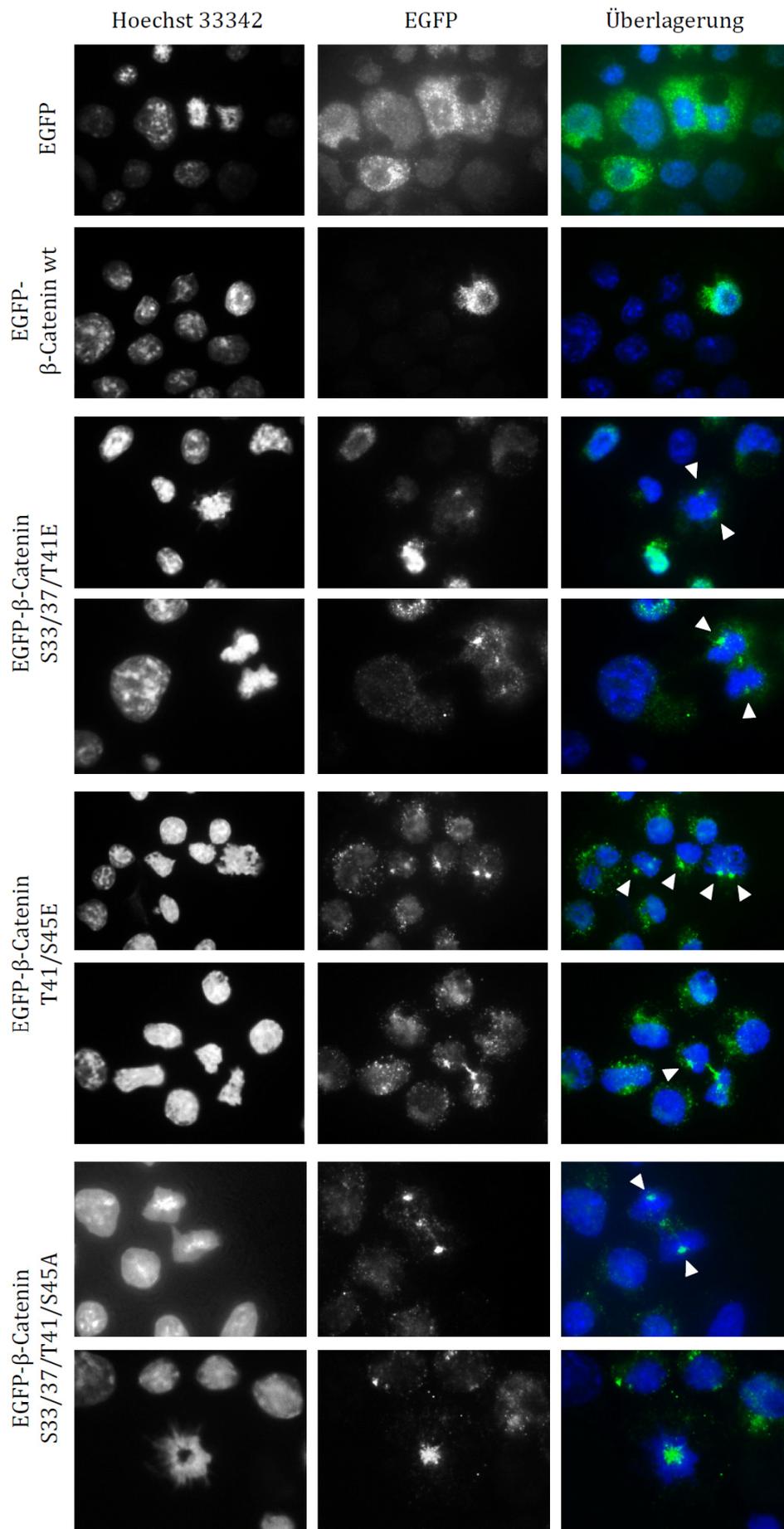
In mitotischen Zellen weisen phospho- $\beta$ -Catenin (S33/37/T41) und phospho- $\beta$ -Catenin (T41/S45) verschiedene Lokalisationsmuster auf. Um zu untersuchen, ob die Phosphorylierung eine Voraussetzung für die unterschiedliche subzelluläre Verteilung darstellt, wurden 32D Zellen, die mit EGFP, EGFP- $\beta$ -Catenin wt oder einer von drei EGFP gekoppelten  $\beta$ -Catenin Mutanten infiziert worden waren (Abbildung 24), mit einem Antikörper gegen EGFP gefärbt und immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dieser zusätzliche Schritt war notwendig, da die Eigenfluoreszenz von EGFP kaum detektiert werden konnte.

In Kontrollzellen war EGFP gleichmäßig im Zytosol verteilt. Entsprechendes galt für  $\beta$ -Catenin wt. Da das EGFP gekoppelte wildtypische  $\beta$ -Catenin in den Zellen nur wenig exprimiert wurde (vgl. Abbildung 24), konnten keine mitotischen Zellen mit positiver EGFP Färbung untersucht werden.

In Übereinstimmung mit den immunfluoreszenzmikroskopischen Analysen von endogenem phospho- $\beta$ -Catenin (S33/37/T41) konnte EGFP- $\beta$ -Catenin S33/37/T41E in Assoziation mit Zentrosomen (Pfeilspitzen) und Midbody nachgewiesen werden (Abbildung 25). Gleiches galt jedoch auch für die anderen betrachteten  $\beta$ -Catenin Varianten. In diesen Fällen konnte ebenfalls die Bindung an Zentrosomen und Midbody detektiert werden. Hingegen konnte für keines der ektopisch exprimierten Proteine die Lokalisation an Kinetochoren nachgewiesen werden.

---

**Abbildung 25: Lokalisationsstudien von  $\beta$ -Catenin wt und Mutanten.** 32D Zellen, die zuvor mit EGFP, EGFP- $\beta$ -Catenin wt, EGFP- $\beta$ -Catenin S33/37/T41E, EGFP- $\beta$ -Catenin T41/S45E oder EGFP- $\beta$ -Catenin S33/37/T41/S45A infiziert worden waren, wurden mit einem Antikörper gegen EGFP und Hoechst 33342 gefärbt und immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die weißen Pfeilspitzen deuten auf Zentrosomen.



Die Mutation konservierter Aminosäuren in der N-terminalen Domäne hat keine Auswirkungen auf die subzelluläre Verteilung von  $\beta$ -Catenin. Somit ist die Phosphorylierung dieser Reste keine Voraussetzung für eine Assoziation mit mitotischen Strukturen, sondern wird vielmehr durch die veränderte Lokalisation von  $\beta$ -Catenin bedingt.

### 6.3.5. In der Mitose colokalisiert phospho- $\beta$ -Catenin mit Aurora Kinase B

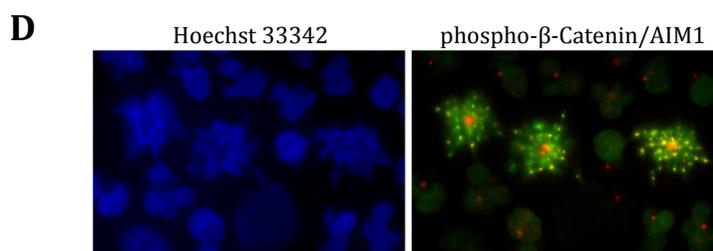
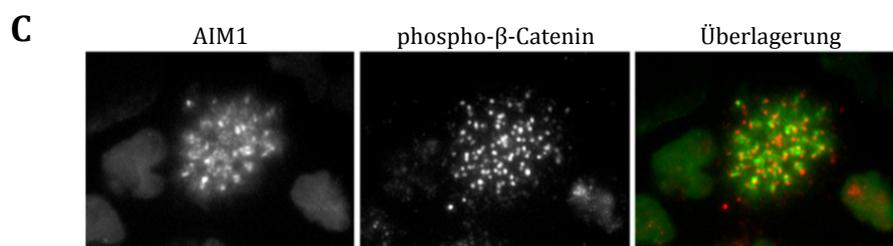
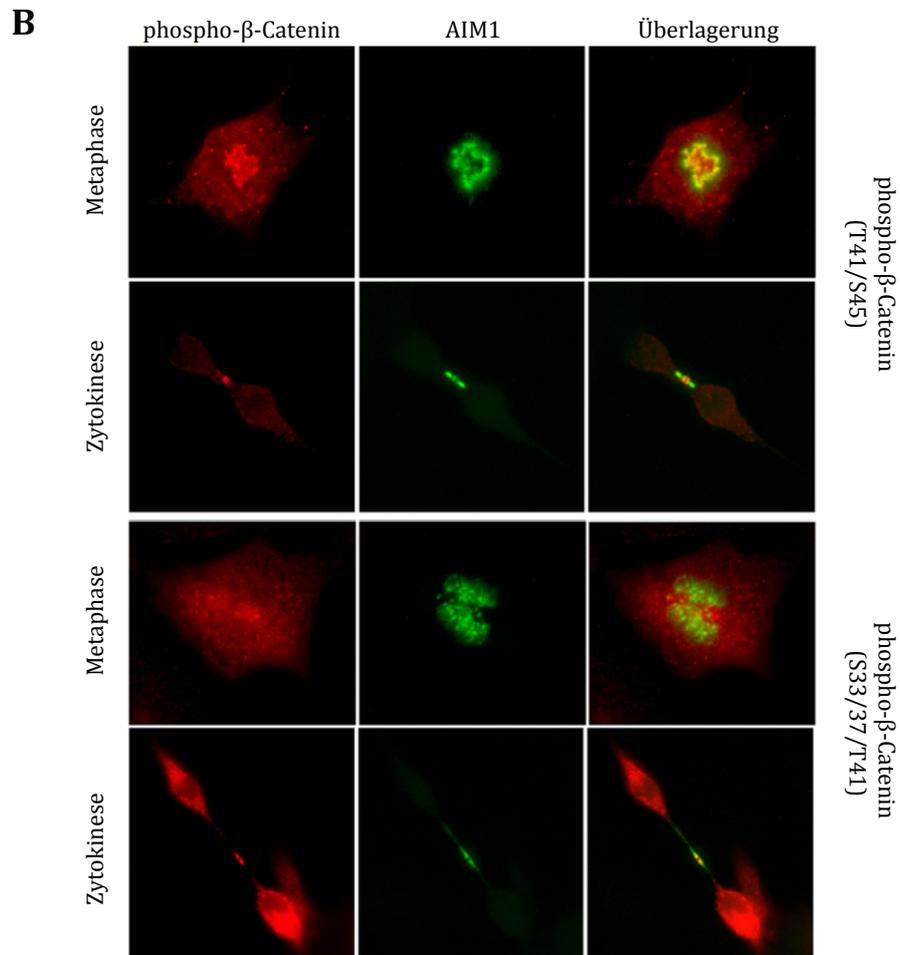
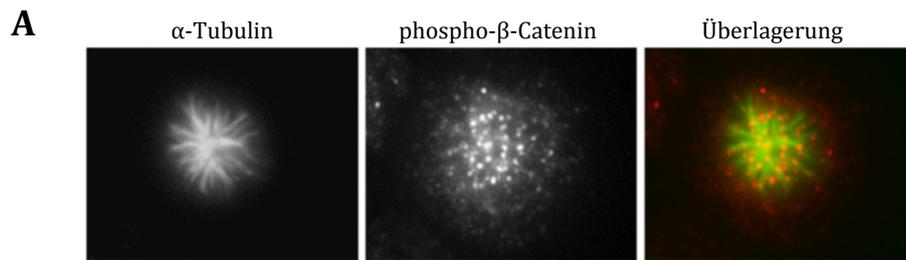
Die Phosphorylierung regulatorischer Serin- und Threoninreste in der aminoterminalen Domäne von  $\beta$ -Catenin wird erst durch Bindung des Proteins an mitotische Strukturen induziert. Daher sollten Serin/Threoninkinasen identifiziert werden, die an der Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin in der Mitose beteiligt sein könnten. Da die Funktion von  $\beta$ -Catenin für die Separation der Zentrosomen kürzlich detailliert beschrieben worden ist<sup>212-214, 282</sup>, wurde im Weiteren die Assoziation von  $\beta$ -Catenin mit den Kinetochoren untersucht.

Unter Verwendung von PANTHER und Gene Ontology™ wurden in einer *in silico* Analyse etwa 130 Serin/Threoninkinasen identifiziert, die in der Mitose eine Rolle spielen. Nur zwei dieser Kinasen werden jedoch ausschließlich in der M-Phase exprimiert, binden an Zentromere/Kinetochore und besitzen darüber hinaus eine Verbindung zur akuten myeloischen Leukämie. Diese Kinasen sind Aurora Kinase B (AIM1) und *Polo-like kinase 1* (PLK1)<sup>283-288</sup>.

PLK1 phosphoryliert  $\beta$ -Catenin an S718 und weiteren unbekanntesten Resten<sup>215</sup>. Um zu überprüfen, ob *Polo-like kinase 1*  $\beta$ -Catenin in hämatopoetischen Zellen an N-terminalen Resten phosphorylieren kann, wurden primäre AML Blasten mittels Immunfluoreszenzanalyse untersucht. Die Spender waren als Teilnehmer einer klinischen Studie mit einem PLK1 Inhibitor behandelt worden. Der Wirkstoff induzierte einen Zellzyklusarrest proliferierender, leukämischer Zellen in der Metaphase.

---

**Abbildung 26: Colokalisation von phospho- $\beta$ -Catenin und Aurora Kinase B in der Mitose.** Für die Immunfluoreszenzanalyse wurden primäre humane Zellen und murine Fibroblastenzellen mit den angegebenen Antikörpern und Hoechst 33342 (DNA) gefärbt. **(A)**  $\alpha$ -Tubulin (grün) und phospho- $\beta$ -Catenin (T41/S45) (rot) Färbung primärer AML Blasten von PLK1 Inhibitor behandelten Patienten. **(B)** NIH3T3 Zellen wurden mit phosphospezifischen Antikörpern gegen  $\beta$ -Catenin (rot) und einem Antikörper gegen AIM1 (grün) gefärbt. **(C)** und **(D)** AML Blasten von PLK1 Inhibitor behandelten Patienten wurden gegen AIM1 (grün) und phospho- $\beta$ -Catenin (T41/S45) (rot) **(C)** bzw. phospho- $\beta$ -Catenin (S33/37/T41) (rot) **(D)** gefärbt.



Wie aus Abbildung 26 A, C und D zu entnehmen ist, konnte in den PLK1 Inhibitor behandelten Blasten die Phosphorylierung aller vier regulatorischen  $\beta$ -Catenin Reste nachgewiesen werden. Allerdings zeigte S33/37/T41 phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin hier ebenfalls eine Assoziation mit den Kinetochoren. PLK1 ist somit nicht an der Phosphorylierung aminoterminaler  $\beta$ -Catenin Reste beteiligt.

Für AIM1 wurde eine subzelluläre Verteilung beschrieben, die der von phospho- $\beta$ -Catenin (T41/S45) entspricht (Abbildung 21 D)<sup>289, 290</sup>. Daher sollte überprüft werden, ob Aurora Kinase B mit phospho- $\beta$ -Catenin colokalisiert. Zum Nachweis der Colokalisation wurden NIH3T3 Zellen auf Deckgläschen ausgesät und am nächsten Tag mit entsprechenden Antikörpern für die Immunfluoreszenzanalyse gefärbt. Phospho- $\beta$ -Catenin (S33/37/T41) und AIM1 zeigten nur in der Zytokinese eine übereinstimmende Lokalisation im Midbody, wohingegen S33/37/T41 phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin in der Metaphase neben der Bindung an den Zentrosomen eine diffuse Verteilung aufwies. Im Gegensatz dazu konnte phospho- $\beta$ -Catenin (T41/S45) zusammen mit AIM1 an den Kinetochoren und in der Zytokinese im Midbody nachgewiesen werden (Abbildung 26 B).

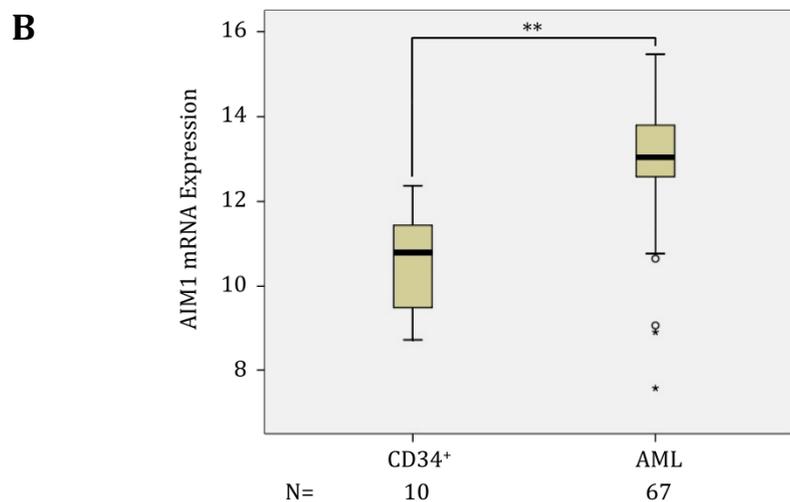
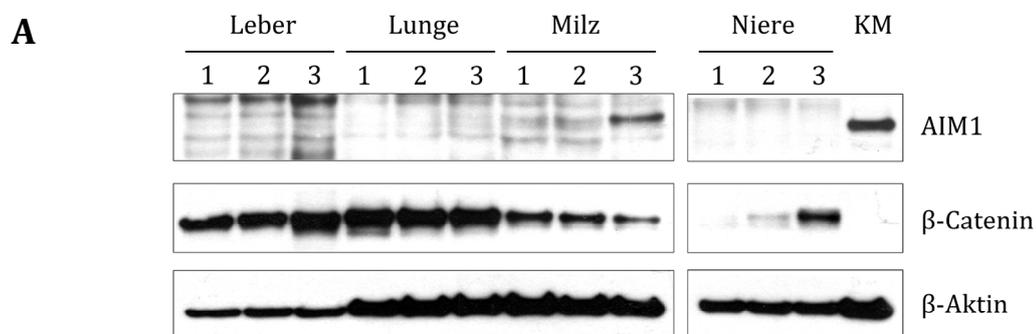
Die Colokalisation von phospho- $\beta$ -Catenin Aurora B konnten auch in primären AML Blasten mittels Immunfluoreszenz detektiert werden. Hier jedoch wurden beide untersuchten phospho- $\beta$ -Catenin Varianten in Assoziation mit dem Kinetochorkomplex gefunden. Phospho- $\beta$ -Catenin (S33/37/T41) colokalisierte in den leukämischen Zellen exakt mit AIM1 (Abbildung 26 D) am inneren Kinetochor, phospho- $\beta$ -Catenin (T41/S45) konnte an den äußeren Kinetochoren in zwei deutlich voneinander getrennten Strukturen nachgewiesen werden (Abbildung 26 C).

Phospho- $\beta$ -Catenin konnte sowohl in murinen Fibroblastenzellen als auch in primären AML Patientenblasten mit Aurora Kinase B colokalisiert werden. Beide Proteine können mit Einsetzen der Mitose Kinetochor assoziiert nachgewiesen werden und binden in der Zytokinese an den Midbody.

### 6.3.6. AIM1 Expression im hämatopoetischen System

Während der Mitose weisen Aurora Kinase B und  $\beta$ -Catenin dieselbe subzelluläre Verteilung auf. Da bereits gezeigt werden konnte, dass Degradationsmechanismen und Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin in transformierten, hämatopoetischen Zellen dereguliert sind (Abbildung 13 und Abbildung 19), sollte als nächstes die Bedeutung und Regulation von AIM1 im normalen und erkrankten hämatopoetischen System untersucht werden.

Zunächst wurde die Proteinexpression von Aurora Kinase B im Knochenmark und in anderen Geweben verglichen. Dazu wurden Lysate verschiedener Mausorgane von drei gesunden Spendertieren hergestellt und AIM1,  $\beta$ -Catenin und  $\beta$ -Aktin im Westernblot nachgewiesen (Abbildung 27 A).



**Abbildung 27: Analyse der AIM1 Expression im hämatopoetischen System.** (A) Zellen verschiedener Organe und Knochenmäcker (KM) dreier C57BL6 Mäuse wurden lysiert und im Westernblot die Expression von AIM1 und  $\beta$ -Catenin überprüft.  $\beta$ -Aktin wurde als Ladekontrolle nachgewiesen. (B) mRNA aus AML Patientenproben (N= 67) und CD34 angereicherten Proben (N= 10) wurde mit Hilfe von Microarrays untersucht und die normalisierten Daten hinsichtlich der AIM1 Expression analysiert. Die Ergebnisse sind hier als Boxplot dargestellt. Der Boxplot zeigt 5 %-, 25 %-Perzentile, Median, 75 %-, und 95 %-Perzentile, Ausreißer sind als Sternchen dargestellt. (p= 0,01, berechnet mit Mann-Whitney-U-Test)

Aurora Kinase B konnte leicht in aufgereinigten Knochenmarkszellen detektiert werden, hingegen wiesen Leber, Lunge, Milz und Niere nur eine sehr geringe AIM1 Expression auf. Im Gegensatz dazu wurde  $\beta$ -Catenin in den Organen mit fester Gewebestruktur sehr hoch exprimiert und konnte in hämatopoetischen Zellen nicht detektiert werden.

Um die Rolle von Aurora Kinase B in der akuten myeloischen Leukämie zu untersuchen, wurden die Daten der *genome survey expression arrays* (siehe 6.1.1) hier hinsichtlich der AIM1 mRNA Expression in Blasten von AML Patienten und CD34 aufgereinigten Zellen von gesunden Spendern analysiert (Abbildung 27 B). In leukämischen Zellen konnte eine leichte, jedoch signifikante Erhöhung der Aurora B Expression im Vergleich zu Kontrollzellen nachgewiesen werden.

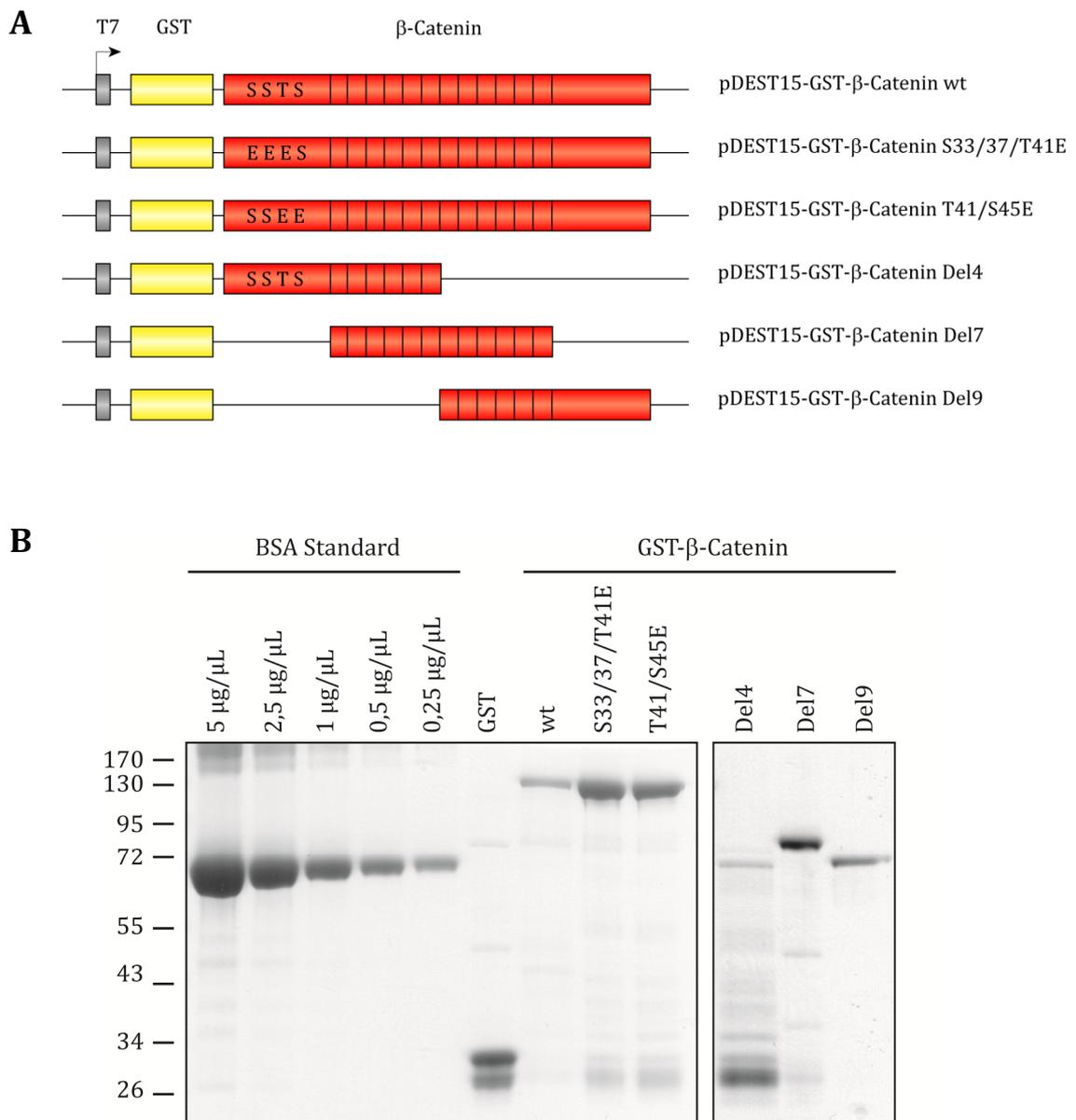
Knochenmark ist ein stark proliferierendes Gewebe, was durch die hohe Aurora Kinase B Expression widerspiegelt wird. In leukämischen Blasten konnte darüber hinaus eine signifikante Überexpression von AIM1 gegenüber normalen Kontrollvorläuferzellen identifiziert werden. Daraus können sich zwei Dinge ableiten lassen: (i) Entweder ist die Überexpression von Aurora B nur das Kennzeichen einer weiteren Verstärkung der Proliferation leukämischer Zellen oder (ii) die Induktion von Aurora B ist ursächlich an der Pathogenese der AML beteiligt.

### 6.3.7. Aurora Kinase B interagiert mit $\beta$ -Catenin

Aurora Kinase B und phospho- $\beta$ -Catenin colokalisieren in der Mitose. Um zu untersuchen, ob beide Proteine miteinander interagieren, wurden Pull-down Experimente mit GST-gekoppeltem  $\beta$ -Catenin durchgeführt.

Für die *in vitro* Interaktionsstudien wurden zunächst rekombinante GST-Fusionsproteine von  $\beta$ -Catenin wt und verschiedenen Punkt- und Deletionsmutanten von  $\beta$ -Catenin in BL21(DE3) Zellen hergestellt. Die Punktmutanten S33/37/T41E und T41/S45E, die die Phosphorylierung regulatorischer Reste imitieren, wurden aufgereinigt, um den Einfluss der  $\beta$ -Catenin Phosphorylierung auf eine Interaktion untersuchen zu können. Mit Hilfe der Deletionsmutanten sollte die  $\beta$ -Catenin Domäne identifiziert werden, die an der Vermittlung einer Interaktion beteiligt ist.

Zur Überprüfung von Reinheit und Konzentration wurden die isolierten Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit CBB gegen eine BSA Standardreihe gefärbt (Abbildung 28 A und B).



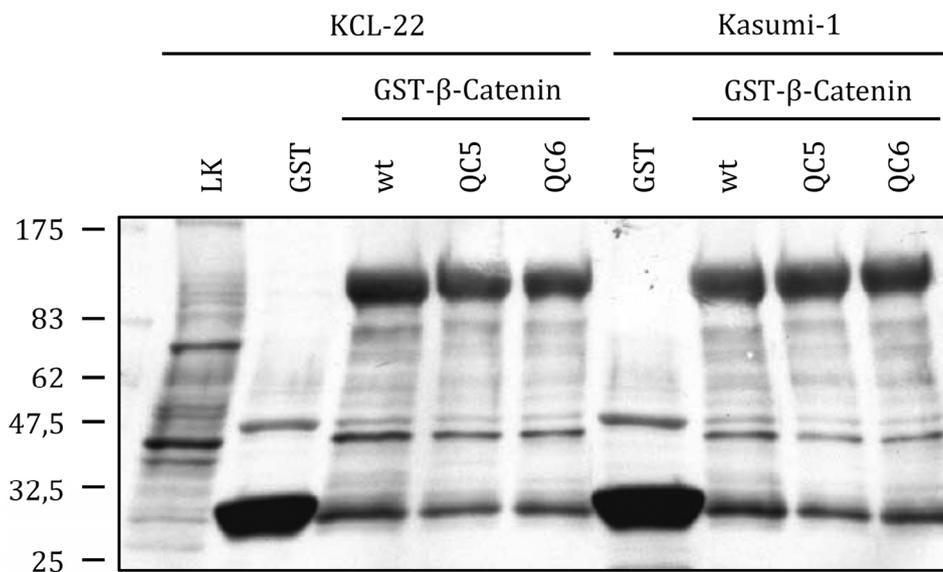
**Abbildung 28: Herstellung rekombinanter GST- $\beta$ -Catenin Fusionsproteine für *in vitro* Interaktionsstudien mit Aurora Kinase B. (A)** Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte. **(B)** GST Fusionsproteine von  $\beta$ -Catenin wt und verschiedenen  $\beta$ -Catenin Mutanten wurden aus Bakterienlysaten aufgereinigt, mittels SDS-PAGE getrennt und durch CBB Färbung sichtbar gemacht. Die Konzentration der rekombinanten Proteine wurde im Vergleich zu einer BSA Standardreihe abgeschätzt.

Die GST- $\beta$ -Catenin Fusionsproteine konnten mit hoher Reinheit gewonnen werden. Lediglich GST-Del4, das die N-terminale Hälfte von  $\beta$ -Catenin repräsentiert, wurde nur mit geringer Konzentration und Reinheit isoliert.

### 6.3.7.1. Aurora Kinase B interagiert mit $\beta$ -Catenin unabhängig vom Phosphorylierungsstatus der aminoterminalen Domäne

Zunächst sollte untersucht werden, ob Aurora Kinase B ein Bindungspartner von  $\beta$ -Catenin ist und ob die Bindung abhängig von der Phosphorylierung der regulatorischen Reste in der aminoterminalen Domäne von  $\beta$ -Catenin ist.

Für den Pull-down Assay wurden die hämatopoetischen, humanen Zelllinien KCL-22 und Kasumi-1, die typischerweise ein hohes endogenes  $\beta$ -Catenin Proteinlevel aufweisen, lysiert und die Lysate mit GST gekoppeltem  $\beta$ -Catenin wt, GST- $\beta$ -Catenin S33/37/T41E oder GST- $\beta$ -Catenin T41/S45E inkubiert. Die Präzipitate wurden gewaschen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Interaktion von AIM1 mit  $\beta$ -Catenin im Westernblot mit einem AIM1 spezifischen Antikörper analysiert. Hier konnte gezeigt werden, dass Aurora Kinase B mit  $\beta$ -Catenin unabhängig von dessen Phosphorylierungsstatus interagiert (Abbildung 29).



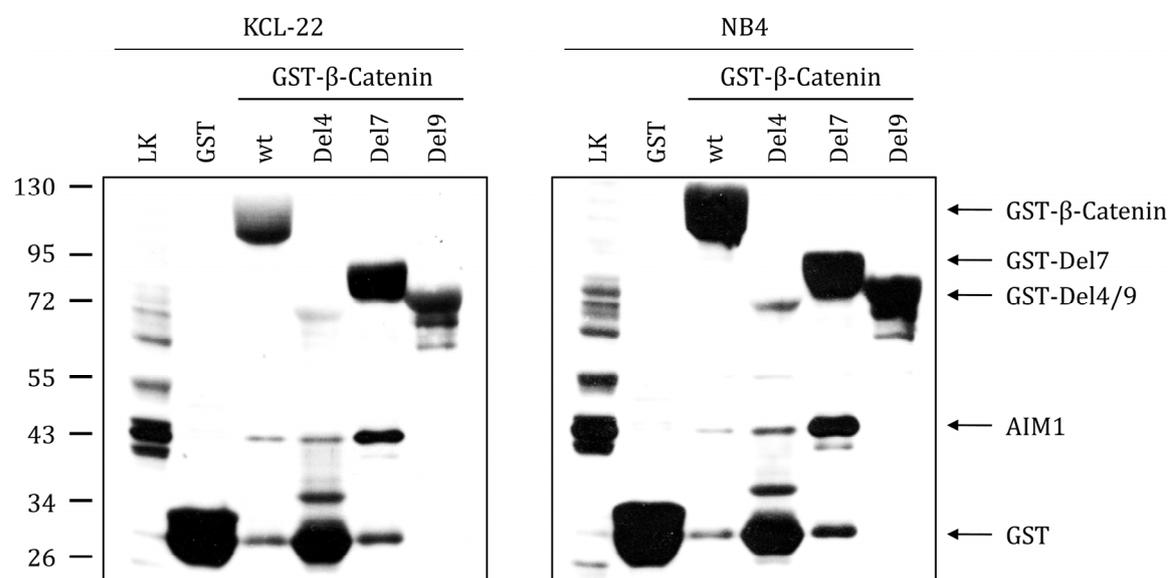
**Abbildung 29: AIM1 bindet an  $\beta$ -Catenin.** KCL-22 und Kasumi-1 Zellen wurden lysiert und die Lysate über Nacht mit GST- $\beta$ -Catenin Fusionsproteinen inkubiert. Die Präzipitate wurden gewaschen und die Interaktion von Aurora Kinase B und  $\beta$ -Catenin im Westernblot mit einem AIM1 spezifischen Antikörper untersucht. (LK: Ladekontrolle; PD: Pull-down; QC5: GST- $\beta$ -Catenin S33/37/T41E; QC6: GST- $\beta$ -Catenin T41/S45E)

### 6.3.7.2. AIM1 bindet an die aminoterminalen Hälfte von $\beta$ -Catenin

$\beta$ -Catenin setzt sich aus drei Domänen zusammen: zwei flexiblen Domänen ohne bekannte Tertiärstruktur am Amino- bzw. Carboxyterminus und einer zentralen, hochstrukturierten Armadillo Region<sup>174</sup>. Um zu untersuchen, welche Domäne an der Bindung von AIM1 beteiligt ist, wurden verschiedene Deletionsmutanten von  $\beta$ -Catenin

(Abbildung 28) zur Affinitätspräzipitation von Aurora B aus Lysaten von KCL-22 und NB4, einer weiteren humanen, hämatopoetischen Zelllinie, eingesetzt. Die Interaktion zwischen der Kinase und den untersuchten  $\beta$ -Catenin Fragmenten wurde im Westernblot mit einem anti-AIM1 Antikörper analysiert (Abbildung 30).

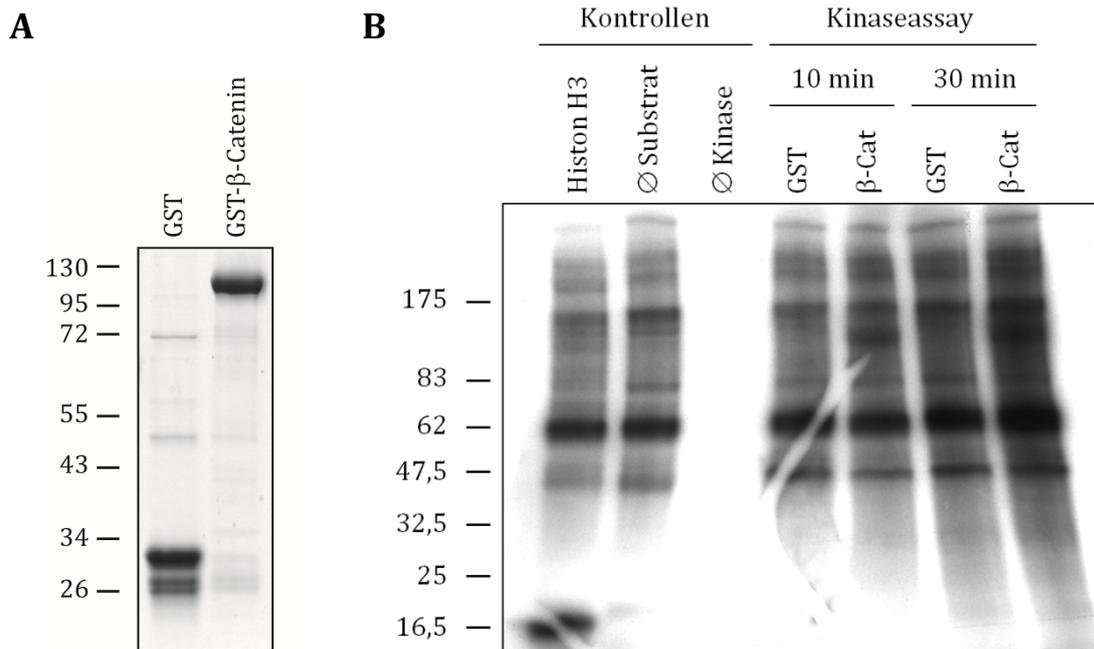
Die stärkste Bindung von Aurora B zeigte sich für die Armadillo Domäne. Auch mit dem aminoterminalen Teil (Del4) konnte hier eine Interaktion detektiert werden, wohingegen die Kinase keinerlei Affinität zur C-terminalen Hälfte von  $\beta$ -Catenin aufwies. Zusammengefasst zeigen die Interaktionsstudien, dass Aurora Kinase B an  $\beta$ -Catenin bindet und dass diese Bindung durch den aminoterminalen Teil der Armadillo Domäne von  $\beta$ -Catenin vermittelt wird.



**Abbildung 30: Aurora Kinase B interagiert mit der aminoterminalen Hälfte von  $\beta$ -Catenin.** Lysate von KCL-22 und NB4 Zellen wurden mit GST-Fusionsproteinen von  $\beta$ -Catenin wt, Del4 (N-terminale Hälfte), Del7 (Armadillo *repeats*) und Del9 (C-terminale Hälfte) inkubiert. Nach dem Waschen wurde die Interaktion von Aurora B mit den verschiedenen  $\beta$ -Catenin Abschnitten im Westernblot untersucht.

### 6.3.8. Aurora Kinase B phosphoryliert $\beta$ -Catenin

In Pull-down Experimenten konnte die Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit Aurora B nachgewiesen werden. In der Mitose phosphoryliert die Kinase eine Vielzahl von Proteinen. Eines der bestbeschriebenen Substrate ist Histon H3, das von AIM1 an Serin 10 modifiziert wird<sup>291-294</sup>. Um zu untersuchen, ob  $\beta$ -Catenin auch ein Substrat von Aurora B ist, wurde ein *in vitro* Kinaseassay durchgeführt.



**Abbildung 31: β-Catenin wird von Aurora Kinase B im *in vitro* Kinaseassay phosphoryliert.** (A) GST und GST-β-Catenin wurden rekombinant in *E. coli* BL21(DE3) hergestellt und zur Kontrolle der Aufreinigung und Konzentration per SDS-PAGE und CBB Färbung analysiert. (B) Autoradiogramm des *in vitro* Kinaseassays. Jeweils 1 µg Histon H3, GST und GST-β-Catenin wurden mit Aurora Kinase B in Anwesenheit von [<sup>32</sup>P]-γ-ATP inkubiert. Die Proteine wurden via SDS Gelelektrophorese aufgetrennt und die *in vitro* Phosphorylierung durch Belichtung eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

Dazu wurden GST und GST-β-Catenin wie beschrieben aus BL21(DE3) aufgereinigt (Abbildung 31 A). Die Agarose gekoppelten Proteine wurden für 10 min sowie 30 min mit rekombinanter Aurora Kinase B in Anwesenheit von radioaktiv markiertem ATP ([<sup>32</sup>P]-γ-ATP) inkubiert. Als Positivkontrolle wurde Histon H3 eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt, das Gel im Vakuum getrocknet und Phosphorylierung durch Belichten eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

Das Autoradiogramm (Abbildung 31 B) zeigt, dass AIM1 unter den gewählten Bedingungen Histon H3 (15,4 kDa) phosphorylieren konnte (*lane* 1) und dass ein Eintrag von [<sup>32</sup>P]-Phosphat nur in Anwesenheit der Kinase erfolgte (*lane* 2 und 3). Die Untersuchung der β-Catenin Phosphorylierung bewies, dass GST-β-Catenin, nicht jedoch GST allein, durch Aurora B modifiziert werden konnte. Die Phosphorylierung erfolgte bereits innerhalb von 10 min und konnte durch längere Inkubation verstärkt werden (*lane* 4 bis 7). Somit konnte β-Catenin als ein neues Substrat von Aurora Kinase B identifiziert werden und gezeigt werden, dass die Interaktion beider Proteine eine funktionelle Bedeutung hat.

## 6.4. $\beta$ -Catenin interagiert mit dem WD40 Protein Rack1

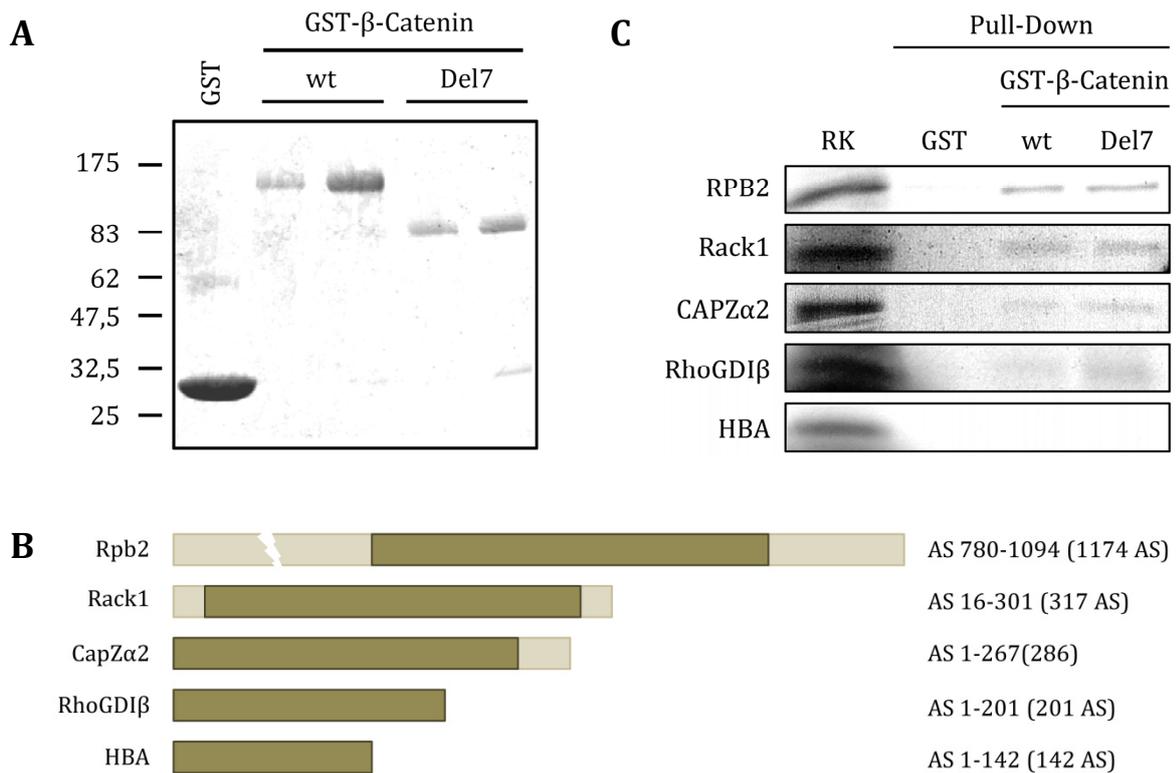
### 6.4.1. *In vitro* transkribierte und translatierte Proteine binden $\beta$ -Catenin

AML assoziierte Aberrationen wie die Induktion der Frizzled 4 Expression und die interne Tandemduplikation hämatopoetischer RTKs führen zur Anreicherung von  $\beta$ -Catenin, das als Transkriptionsaktivator des WNT Signalwegs dient und als Substrat von AIM1 bestimmt werden konnte. Um weitere Interaktionspartner von  $\beta$ -Catenin zu identifizieren, die möglicherweise dessen Funktion regulieren oder das Protein mit neuen biologischen Prozessen in Verbindung bringen, war zuvor ein *yeast two hybrid* Experiment durchgeführt worden. Hierbei war  $\beta$ -Catenin als Köder gegen eine Genbibliothek aus humanem Knochenmark eingesetzt worden. Bei der Untersuchung wurden RNA Polymerase II, Polypeptid B (RPB2), *receptor for activated C-kinase 1* (Rack1), *capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 2* (CAPZ $\alpha$ 2), *Rho GDP dissociation inhibitor  $\beta$*  (RhoGDI $\beta$ ) und Hämoglobin  $\alpha$ 2 (HBA) als potentielle Bindungspartner von  $\beta$ -Catenin gefunden. Zur Verifizierung der Resultate wurden im Rahmen dieser Arbeit die Interaktionen zunächst mittels *in vitro* Transkription/Translation (TNT Reaktion) und anschließendem GST Pull-down untersucht.

Hierzu wurden  $\beta$ -Catenin wt sowie dessen Armadillo Domäne (Del7) als GST-Fusionsproteine aus BL21(DE3) aufgereinigt. Die Expression der an Glutathion-Agarose gekoppelten Proteine wurde mit Hilfe einer SDS-PAGE und anschließender CBB Färbung bestätigt (Abbildung 32 A).

Um die Transkription ausgehend von einem T7 Promotor zu ermöglichen, wurden die cDNAs der möglichen  $\beta$ -Catenin Interaktionspartner mittels PCR aus dem *yeast two hybrid* Plasmid pGAD amplifiziert und in den Vektor pcDNA3 kloniert. Es konnten lediglich von HBA und RhoGDI $\beta$  die vollständigen Sequenzen isoliert werden. Von den drei anderen Kandidaten wurden die im *yeast two hybrid* identifizierten cDNA Fragmente kloniert. In Abbildung 32 B sind die entsprechenden Proteinabschnitte dargestellt.

Die pcDNA3 Expressionskonstrukte wurden für die TNT Reaktion in Anwesenheit von [ $^{35}$ S]-markiertem Methionin eingesetzt. Die *in vitro* translatierten, radioaktiv markierten Proteine wurden im Anschluß mit den rekombinanten GST-Fusionsproteinen inkubiert, nach mehrmaligem Waschen per SDS-PAGE aufgetrennt und Interaktionen mittels Autoradiographie analysiert (Abbildung 32 C).



**Abbildung 32: Verifizierung potentieller  $\beta$ -Catenin Interaktionspartner mittels *in vitro* Transkription/Translation.** (A) GST, GST- $\beta$ -Catenin wt und GST-Del7 wurden aus *E. coli* BL21(DE3) aufgereinigt. Die Expression der rekombinanten Proteine wurde mittels SDS-PAGE und Coomassie Brilliant Blue Färbung überprüft. (B) Schematische Darstellung der *in vitro* produzierten Proteinabschnitte (dunkel) möglicher  $\beta$ -Catenin Bindungspartner im Vergleich zu ihrer vollständigen Proteinsequenz (hell). Die Zahlen auf der rechten Seite geben die korrespondierenden Aminosäuren (AS) der Fragmente an, in Klammern steht die Gesamteproteinlänge. (C) *In vitro* transkribierte und translatierte Proteine mit [ $^{35}$ S]-Markierung wurden für den GST Pull-down eingesetzt. Die Interaktion mit  $\beta$ -Catenin wt sowie Del7 wurde nach SDS-PAGE im Autoradiogramm sichtbar gemacht. (RK: Reaktionskontrolle)

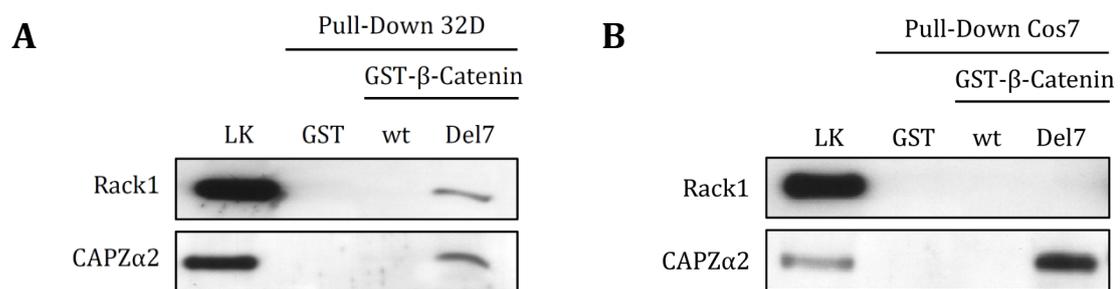
Vier der fünf untersuchten Proteine konnten als  $\beta$ -Catenin Interaktionspartner verifiziert werden. RPB2, Rack1, CAPZ $\alpha$ 2 und RhoGDI $\beta$  zeigten eine Bindung an wildtypisches  $\beta$ -Catenin sowie an dessen Armadillo Domäne. Die Interaktion von  $\alpha$ -Hämoglobin konnte hingegen nicht bestätigt werden.

#### 6.4.2. Die Armadillo Domäne von $\beta$ -Catenin interagiert mit CapZ $\alpha$ 2 und Rack1 *in vitro*

Mittels GST Pull-down *in vitro* transkribierter und translaterter Proteine konnte die Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit RPB2, Rack1, CAPZ $\alpha$ 2 und RhoGDI $\beta$  nachgewiesen werden. Mit Ausnahme von RhoGDI $\beta$  wurden jedoch nur Fragmente der jeweiligen Proteine analysiert. Um die Bindung der nativen Proteine an  $\beta$ -Catenin zu untersuchen, wurden GST

Pull-down Experimente mit Lysaten aus 32D sowie Cos7 Zellen und GST-Fusionsproteinen von  $\beta$ -Catenin wt bzw. Del7 durchgeführt. Die Präzipitate wurden im Westernblot mit spezifischen Antikörpern gegen die potentiellen  $\beta$ -Catenin Interaktionspartner analysiert.

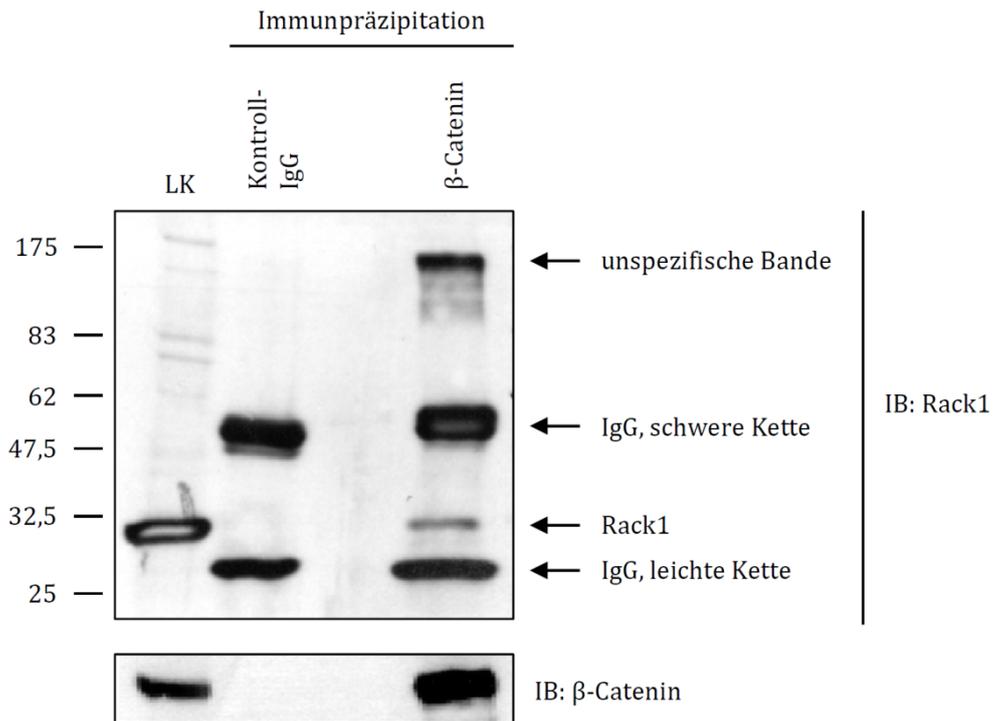
Auf diesem Weg konnte die Assoziation von CAPZ $\alpha$ 2 und Rack1 mit der Armadillo Domäne von  $\beta$ -Catenin, nicht jedoch mit dem wildtypischen Protein nachgewiesen werden. Interessanterweise wurde Rack1 nur aus Lysaten von 32D Zellen präzipitiert (Abbildung 33). Die Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit RPB2 und RhoGDI $\beta$  konnten mittels GST Pull-down nicht verifiziert werden.



**Abbildung 33: Rack1 und CapZ $\alpha$ 2 binden an die Armadillo Domäne von  $\beta$ -Catenin.** Lysate aus 32D (A) und Cos7 Zellen (B) wurden mit GST- $\beta$ -Catenin und GST-Del7 inkubiert. Die Assoziation von Rack1 und CapZ $\alpha$ 2 mit GST-Fusionsproteinen wurde im Westernblot mit spezifischen Antikörpern analysiert.

### 6.4.3. $\beta$ -Catenin und Rack1 sind *in vivo* Bindungspartner

Rack1 und CapZ $\alpha$ 2 interagieren mit  $\beta$ -Catenin. Die Bindung konnte in verschiedenen *in vitro* Experimenten bestätigt werden. Um die Assoziation der Proteine auch *in vivo* zu zeigen, wurden NIH3T3 Zellen lysiert und endogenes  $\beta$ -Catenin mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers präzipitiert. Anschließend wurden die Proben im Westernblot auf die Coimmunpräzipitation von Rack1 und CapZ $\alpha$ 2 untersucht. Für das *capping protein* konnte keine Interaktion detektiert werden. Endogenes Rack1 konnte hingegen als *in vivo* Bindungspartner von  $\beta$ -Catenin nachgewiesen werden (Abbildung 34).



**Abbildung 34:  $\beta$ -Catenin bindet *in vivo* an Rack1.** NIH3T3 wurden lysiert und die Lysate zur Immunpräzipitation von  $\beta$ -Catenin eingesetzt. Gleiche Mengen Protein wurden parallel mit einem Isotypen-Antikörper inkubiert. Nach dem Waschen der Präzipitate wurde die Bindung von Rack1 an  $\beta$ -Catenin im Westernblot mit einem spezifischen Antikörper untersucht.  $\beta$ -Catenin wurde zur Bestätigung der IP nachgewiesen. (IP: Immunpräzipitation; IgG: Immunglobulin G; IB: Immunblot)

Zusammengenommen zeigen die Resultate, dass Rack1, ein Adapterprotein mit sieben  $\beta$ -Propeller Struktur (WD40 repeats)<sup>295, 296</sup>, ein neuer Interaktionspartner von  $\beta$ -Catenin ist. Die Bindung der beiden Proteine wird durch die Armadillo Domäne von  $\beta$ -Catenin vermittelt, sie ist zellspezifisch und erfolgt direkt, denn die Assoziation konnte auch in einem zellfreien System nachgewiesen werden. Die weitere Validierung der in der vorliegenden Arbeit identifizierten Interaktionspartner bietet die Möglichkeit, die Funktionen von  $\beta$ -Catenin in der Hämatopoese besser zu verstehen und sogar neue Therapieansätze zur Behandlung der akuten myeloischen Leukämie zu finden.

## 7. DISKUSSION

Kanonische WNT Signaltransduktion spielt eine Schlüsselrolle in vielen Entwicklungsprozessen sowie in der Homöostase adulter Stammzellen. Daher ist die aberrante Aktivierung der Kaskade häufig mit der Entstehung von Krebs verbunden. In verschiedenen soliden Tumoren wurden Mutationen von Komponenten des Degradationskomplexes oder  $\beta$ -Catenin selbst nachgewiesen, die die Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin induzieren und zur konstitutiven Aktivierung des Signalwegs führen (Übersichtsartikel in<sup>297</sup>).

In den vergangenen Jahren wurde eine Vielzahl von Studien publiziert, in denen die Deregulation klassischer WNT Signaltransduktion auch in leukämischen Zellkulturmodellen und primären AML Blasten nachgewiesen wurde<sup>131, 298</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass  $\beta$ -Catenin in der akuten myeloischen Leukämie im Vergleich zu anderen hämatologischen Neoplasien höher exprimiert wird<sup>299</sup> und dass die Expression des Proteins mit einer schlechten Prognose verbunden ist<sup>300-302</sup>. Bisher konnten jedoch keine Mutationen von Komponenten der Signalkaskade als Ursache der aberranten Aktivierung identifiziert werden. Vielmehr erfolgt die Induktion kanonischer WNT Signaltransduktion in der akuten myeloischen Leukämie durch epigenetische Stummschaltung negativer Regulatoren<sup>144-148</sup> oder Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin *downstream* bekannter Onkogene der Erkrankung<sup>130, 132, 135</sup>. Unsere Gruppe konnte in diesem Zusammenhang zeigen, dass auch die onkogene Rezeptortyrosinkinase FLT3-ITD in der Lage ist,  $\beta$ -Catenin zu stabilisieren und die klassische WNT Signalkaskade zu aktivieren. Unabhängig davon wurde in FLT3-ITD transformierten Zellen die Induktion der Frizzled 4 Expression nachgewiesen<sup>135, 173</sup>.

Welche Funktion dem WNT Rezeptor FZD4 in der akuten myeloischen Leukämie zukommt und welcher Mechanismus der Aktivierung des WNT/ $\beta$ -Catenin Signalwegs durch die ITD Mutation zu Grunde liegt, konnte bisher nicht aufgeklärt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde FZD4 als ein generelles Zielgen in der AML identifiziert, dessen Expression in Anwesenheit des kanonischen WNT Liganden WNT3A zur Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin führt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die interne Tandemduplikation des Stammzellrezeptors KIT ebenso wie FLT3-ITD die klassische WNT Signaltransduktion aktiviert. Dies erfolgt über einen gemeinsamen Mechanismus, der  $\beta$ -Catenin durch inhibitorische GSK3 Phosphorylierung vor proteosomalem Abbau schützt.

Die hohe Stabilität von  $\beta$ -Catenin in leukämischen Zellen sowie der Befund, dass auch aminoterminal phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin in ITD transformierten Zellen akkumuliert, gaben den Anlaß dazu, weitere Funktionen von  $\beta$ -Catenin im hämatopoetischen System zu untersuchen. Das Protein wies in Abhängigkeit vom betrachteten Phosphorylierungsmuster eine spezifische subzelluläre Verteilung in der Mitose auf und konnte als neues Substrat der mitotischen Kinase Aurora B identifiziert werden. Außerdem wurde das Adapterprotein Rack1 durch verschiedene *in vitro* und *in vivo* Experimente als ein weiterer Interaktionspartner von  $\beta$ -Catenin verifiziert.

## 7.1. Die Rolle von FZD4 in der Pathogenese der AML

Im Jahr 2002 entdeckten Robitaille et al., dass in familiärer exsudativer Vitreoretinopathie (FEVR) ein Allel des FZD4 Gens mutiert ist, und stellten so erstmals eine Verbindung zwischen einem Frizzled Rezeptor und einer humanen Erkrankung her<sup>303</sup>. Seitdem konnte die Deregulation verschiedener Proteine der FZD Familie auch im Zusammenhang mit Leukämie nachgewiesen werden. In der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) konnte die Überexpression von FZD3, FZD1 und FZD6 gezeigt werden, während FZD7 und FZD8 von einem Großteil der Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) exprimiert wird<sup>304-306</sup>. FZD4, dessen Deregulation auch bei einer bestimmten Art von Prostatakrebs und bei Adenomen des Darms nachgewiesen werden konnte<sup>162, 307</sup>, wurde als Zielgen von FLT3-ITD in einem AML Zellkulturmodell identifiziert<sup>135, 173</sup>.

Um mehr über die Funktion von Frizzled 4 im hämatopoetischen System und in der akuten myeloischen Leukämie zu erfahren, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Expression des Rezeptors in primären, humanen Zellen analysiert. Dabei zeigte sich, dass FZD4 in AML Patientenproben im Vergleich zu gesundem Knochenmark vermehrt exprimiert wurde. Fast ein Drittel der leukämischen Knochenmärker wies sogar sehr hohe Konzentrationen des Proteins auf. Anders als im Zellkulturmodell<sup>135, 173</sup> konnte in den primären Zellen jedoch keine Korrelation zwischen FLT3 Status und Frizzled 4 Expression festgestellt werden. Dies galt sowohl für AML Proben, die mittels Microarray Analysen untersucht worden sind, als

auch für die im Gewebearray betrachteten Knochenmarksbiopsien (Daten nicht gezeigt). Da der FLT3 Rezeptor in unterschiedlichen Mengen auf der Oberfläche von 70-90 % der AML Blasten exprimiert wird<sup>39, 43</sup>, wurde außerdem der Zusammenhang zwischen FLT3 Proteinlevel und FZD4 Expression analysiert (Daten nicht gezeigt). Auch hier konnte keine Wechselwirkung abgeleitet werden. Dessen ungeachtet wurde in dieser Arbeit *downstream* von KIT-ITD ebenfalls eine erhöhte Frizzled 4 mRNA Expression nachgewiesen. Anders als bei den Wildtyprezeptoren führt FLT3-ITD bzw. KIT-ITD induzierte Signaltransduktion zu einer starken Aktivierung von STAT5<sup>63, 173</sup>. Für diesen Transkriptionsfaktor wurden kürzlich Cis regulatorische Elemente im *FZD4* Gen identifiziert<sup>308</sup>, was eine Erklärung für die Induktion der Frizzled 4 Expression durch onkogene RTKs im Zellkulturmodell bietet. In leukämischen Blasten existieren offensichtlich weitere Mechanismen, die die Expression des WNT Rezeptors steuern und zu einem generellen Kennzeichen der AML machen.

Ebenso wie bei den leukämischen Biopsien konnte auch bei 80 % der CD34 angereicherten Proben von gesunden Spendern Frizzled 4 im Gewebearray detektiert werden. Das Transmembranprotein CD34 ist ein humaner Oberflächenmarker für primitive, hämatopoetische Zellen<sup>253-256</sup>, dessen Expression auch auf Blasten undifferenzierter AMLs nachgewiesen wird<sup>255, 257</sup>. Da leukämische Zellen in ihrem Reifegrad CD34 positiven Vorläuferzellen ähneln, werden die gesunden Progenitoren häufig als Kontrollzellen eingesetzt<sup>288, 309, 310</sup>. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten stehen in Übereinstimmung mit Untersuchungen im murinen System, wo Frizzled 4 Expression bereits mit dem Vorläufer-/Stammzellkompartiment mit in Verbindung gebracht werden konnte<sup>311, 312</sup>. Darüber hinaus bieten sie eine Erklärung dafür, dass FZD4 in verschiedenen Studien, in denen die Genexpressionsprofile von Blasten und gesunden CD34<sup>+</sup> Zellen verglichen worden sind, bisher nicht als Zielgen in der AML identifiziert werden konnte<sup>313, 314</sup>. Ob die Frizzled 4 Expression letztlich durch leukämische Transformation bzw. AML assoziierte Onkogene induziert wird oder eher ein Charakteristikum des Vorläuferphänotyps leukämischer Blasten darstellt, muß in weiteren Experimenten untersucht werden. In jedem Fall läßt die Expression von FZD4 auf eine erhöhte Sensitivität der Zellen gegenüber WNT Liganden schließen, und ihr scheint darüber hinaus eine prognostische Relevanz zuzukommen (siehe unten).

Rezeptoren der Frizzled Familie können nach Bindung eines Liganden drei verschiedene Signalwege induzieren. (i) Kanonische WNT Signaltransduktion reguliert mittels  $\beta$ -Catenin Stabilisierung Genexpression, Proliferation und Differenzierung, während der (ii) WNT/*planar cell polarity* (PCP) und der (iii) WNT/Calcium Weg, die zusammengenommen als nicht-kanonische Signalkaskaden bezeichnet werden, Migration sowie die Ausbildung der Zellpolarität kontrollieren<sup>64, 65</sup>. Üblicherweise wird die Induktion

der klassischen Signalkaskade den Vertretern der „WNT1-Klasse“ der WNT Liganden zugeschrieben<sup>68</sup>, die dadurch charakterisiert sind, dass sie in *Xenopus laevis* Embryonen eine zweite dorsal-ventrale Körperachse induzieren und murine C57MG Brustepithelzellen morphologisch transformieren können. Die Liganden der „WNT5A-Klasse“ sind hierzu nicht in der Lage<sup>67, 69, 315</sup>. Stattdessen können sie gegenüber den „WNT1-Klasse“ Proteinen durch Induktion nicht-kanonischer Signaltransduktion antagonistisch wirken<sup>69, 316-320</sup>. Einige Untersuchungen konnten jedoch deutlich machen, dass die Fähigkeit eines bestimmten WNT Liganden, entweder die kanonische oder die nicht-kanonische Signaltransduktion zu induzieren, nicht absolut ist, sondern von verschiedenen Faktoren abhängt und für jedes System einzeln betrachtet werden muß<sup>71, 321</sup>.

In der vorliegenden Arbeit wurde Frizzled 4 in der myeloischen Mausprogenitorzelllinie 32D als spezifischer Rezeptor von WNT3A identifiziert, einem Liganden der „WNT1-Klasse“<sup>69</sup>. Entsprechend dem klassischen Modell führte die Bindung von WNT3A an FZD4 in diesem Kontext zur Akkumulation von  $\beta$ -Catenin. Zuvor ist Frizzled 4 sowohl mit kanonischer als auch mit nicht-kanonischer Signaltransduktion in Verbindung gebracht worden. Xu et al. konnten zeigen, dass die Bindung des WNT Agonisten Norrin an FZD4 und den Corezeptor LRP5 die klassische WNT Kaskade induziert<sup>156</sup>, während humanes sowie murines Frizzled 4 in anderen Studien als Rezeptoren des WNT/Calcium Signalwegs identifiziert worden sind<sup>161, 303, 322</sup>. Interessanterweise ist der FZD4/LRP5 Rezeptorkomplex auch nach Bindung von WNT5A, das als typischer Vertreter der nicht-kanonischen WNT Liganden gilt, in der Lage, den klassischen WNT Signalweg zu aktivieren, wohingegen die alleinige Expression von Frizzled 4 in Gegenwart von WNT5A nicht zur Transkription von WNT Zielgenen führt<sup>71</sup>. In diesem Zusammenhang postulierten Mikels et al. ein Modell, wonach nicht die WNT Liganden selbst, sondern das Vorhandensein von WNT Rezeptoren und Corezeptoren die Aktivierung einer bestimmten *downstream* Kaskade diktiert.

Schließlich wurde in dieser Arbeit untersucht, ob sich aufgrund der Frizzled 4 Expression eine Überlebensprognose für AML Patienten ableiten ließ. In der retrospektiven Analyse konnte ein uneinheitlicher Zusammenhang aufgezeigt werden: Ein sehr hoher FZD4 Proteinspiegel war mit einer guten Überlebenswahrscheinlichkeit verknüpft, während eine mittlere Expression des WNT Rezeptors zur Umkehr der Überlebensprognose führte. Dies könnte auf die Induktion zweier unterschiedlicher Signalwege zurückzuführen sein. Der kanonischen WNT Signaltransduktion wird in der akuten myeloischen Leukämie eine transformierende Funktion zugeschrieben. Die Kaskade wird von verschiedenen AML assoziierten Onkogenen aktiviert<sup>130, 132, 135</sup>, und  $\beta$ -Catenin Überexpression konnte als eigenständiger, prognostischer Faktor identifiziert werden, der mit Rezidiv und einem verkürzten Gesamtüberleben korreliert<sup>299-302</sup>. Im Gegensatz dazu besitzt der nicht-

kanonische WNT/Ca<sup>2+</sup> Signalweg aufgrund seiner antagonistischen Wirkung gegenüber dem klassischen WNT Signalweg tumorsuppressive Eigenschaften, die vor allem auf die Aktivierung durch WNT5A zurückgeführt werden<sup>323-327</sup>.

Möglicherweise induziert eine mittlere FZD4 Expression in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus dem AML Zellkulturmodell die Aktivierung des klassischen WNT Signalwegs, der seinerseits zur leukämischen Transformation beiträgt und die schlechte Prognose bedingt. Auf der anderen Seite könnte eine sehr hohe Frizzled 4 Expression dazu führen, dass der obligatorische Corezeptor LRP5/6 zum limitierenden Faktor für die Induktion der kanonischen Signaltransduktion wird, und FZD4 allein zusätzlich eine nicht-kanonische Signalkaskade aktiviert, die als Tumorsuppressor wirkt und die Transkription von WNT Zielgenen inhibiert. Diese Hypothese steht in Einklang mit dem Modell von Mikels et al.<sup>71</sup>, muß in der Zukunft jedoch durch weitere Studien und größere Patientenkohorte bestätigt werden.

Obwohl bisher kein Beispiel für eine dosisabhängige, gegensätzliche Wirkung eines WNT Signalproteins beschrieben worden ist, gibt es eine Entsprechung in einem völlig anderen System. Sirtuin 1 (Sirt1) ist eine NAD<sup>+</sup> abhängige Proteindeacetylase<sup>328, 329</sup>, die Apoptose sowie Alterungsprozesse reguliert und in der Muskeldifferenzierung eine wichtige Rolle spielt<sup>330-333</sup>. Erwachsene Sirt1 *knockout* Mäuse besitzen anomale Herzventrikel, doch die meisten Tiere sterben bereits kurz nach der Geburt aufgrund vielfältiger Entwicklungsfehler<sup>334, 335</sup>. Alcendor et al. konnte zeigen, dass eine moderate Überexpression von Sirt1 im Herzen vor oxidativem Stress schützt und Alterungsprozesse verlangsamt, wohingegen eine starke Überexpression Apoptose sowie Hypertrophie induziert<sup>336</sup>. Folglich ist die Induktion entgegengesetzter biologischer Prozesse durch unterschiedliche Konzentrationen ein und desselben Mediators kein Einzelfall.

## 7.2. WNT Signaltransduktion als Mediator ITD vermittelter leukämischer Transformation

FLT3 und KIT sind zwei strukturell und funktionell verwandte Rezeptortyrosinkinasen<sup>19</sup>. Beide RTKs werden von hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert<sup>23, 24</sup>, interagieren mit Proteinen der SRC Kinase Familie und sind in der Lage, den JAK/STAT, den MAPK sowie den PI3K/Akt Signalweg zu induzieren<sup>28, 29, 31-34</sup>. Aberrante KIT und FLT3 Varianten konnten in Patienten mit akuter myeloischer Leukämie identifiziert werden, wobei FLT3 Mutationen deutlich häufiger auftreten. Zumeist werden interne Tandemduplikationen des Rezeptors nachgewiesen, die mit einer schlechten Prognose

verbunden sind<sup>45-49, 135</sup>. ITD führt zur konstitutiven Aktivierung von FLT3, ändert jedoch zusätzlich die Art des *downstream* Signals<sup>173</sup>. Hierzu gehört auch die Induktion der klassischen WNT Signalkaskade durch FLT3-ITD, nicht jedoch durch den FL stimulierten Wildtyprezeptor<sup>135</sup>. Bei ihren Untersuchungen der internen Tandemduplikation des Stammzellrezeptors konnten Corbacioglu et al. ebenfalls Abweichungen in der Signalqualität zwischen KIT-ITD und SCF behandeltem KIT wt feststellen<sup>63</sup>. Etwaige Effekte auf den kanonischen WNT Signalweg wurden in ihrer Studie jedoch nicht analysiert. Daher sollte im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht werden, ob die Induktion klassischer WNT Signaltransduktion auch für die leukämische Transformation durch die seltene ITD Mutation des Stammzellrezeptors<sup>54, 63</sup> eine Rolle spielt.

In dem zu diesem Zweck analysierten AML Zellkulturmodell induzierte die Expression von KIT-ITD im Gegensatz zu Liganden stimuliertem KIT wt die Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin. Es konnte außerdem die Induktion der Frizzled 4 Expression nachgewiesen werden. Der erhöhte  $\beta$ -Catenin Spiegel war funktionell wirksam: Er führte zur TCF abhängigen Promotoraktivierung des WNT Zielgens c-Myc. Vor allem aber inhibierte die Anwesenheit eines dominant negativen TCF4 das klonale Wachstum KIT-ITD transformierter Zellen. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten verdeutlichen, dass die onkogene Wirkung der Rezeptortyrosinkinase KIT-ITD ebenso wie FLT3-ITD zumindest in Teilen von der Induktion der klassischen WNT Signalkaskade abhängt.

Kennzeichen eines aktiven WNT Signalwegs ist die Akkumulation des zentralen Proteins  $\beta$ -Catenin, das als obligatorischer Transkriptionsaktivator von TCF/LEF die Signale in den Kern überträgt<sup>72, 73</sup>. Hier konnte gezeigt werden, dass die erhöhte  $\beta$ -Catenin Expression in KIT-ITD und FLT3-ITD transfizierten Zellen nicht auf eine transkriptionelle Induktion, sondern auf die Inhibition von GSK3 $\alpha/\beta$  zurückzuführen ist. Die konstitutiv aktive Kinase ist das Schlüsselenzym kanonischer WNT Signaltransduktion insofern, dass es in Abwesenheit eines WNT Liganden die Degradation von  $\beta$ -Catenin einleitet und auf diese Weise dessen zytosolische Konzentration reguliert<sup>76, 84</sup>. Durch Aktivierung der klassischen WNT Kaskade wird GSK3 an die Membran rekrutiert und  $\beta$ -Catenin aus dem Degradationskomplex freigesetzt<sup>103</sup>. Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Arbeit eine ITD abhängige GSK3 Phosphorylierung als Ursache der Kinaseinhibition identifiziert, die mit einer erhöhten  $\beta$ -Catenin Stabilität korrelierte. Die Behandlung mit PKC412, einem spezifischen FLT3 Inhibitor, verhinderte hingegen die Phosphorylierung von GSK3 und führte folgerichtig zur Erniedrigung der  $\beta$ -Catenin Konzentration. Diese Befunde zeigen, dass die AML assoziierte ITD Mutation aberrante WNT Signaltransduktion durch eine neuartige Vernetzung zweier Signalkaskaden bewirkt, in deren Zentrum GSK3 steht.

Wie genau die interne Tandemduplikation GSK3 Phosphorylierung vermittelt, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten. Möglicherweise ist aber Akt, das selbst durch die Rezeptortyrosinkinasen FLT3 und KIT aktiviert wird<sup>31, 34</sup>, an diesem Mechanismus beteiligt. Aus dem Insulin Signalweg ist bekannt, dass Proteinkinase B die Serinreste S9 und S21 von GSK3 $\alpha$  bzw. GSK3 $\beta$  phosphoryliert, was zur Inhibition der GSK3 Kinaseaktivität führt<sup>270, 271</sup>. In Einklang hiermit wurde in ITD exprimierenden Zellen eine Korrelation zwischen Akt Aktivierung und Glycogen Synthase Kinase 3 Phosphorylierung nachgewiesen. Eine solche Verknüpfung von Akt und GSK3/ $\beta$ -Catenin Kaskade konnte bereits für Gliomazellen und Zellen des Plattenepithelkarzinoms der Speiseröhre aufgezeigt werden<sup>337, 338</sup>. Allerdings dürften weitere Moleküle die Phosphorylierung von GSK3 durch Akt regulieren, denn Proteinkinase B wird sowohl durch FLT3 wt als auch durch FLT3-ITD aktiviert<sup>34</sup>, jedoch nur im Falle der onkogenen RTK kann die Inhibition von GSK3 nachgewiesen werden.

Vor Kurzem wurde die direkte Interaktion zwischen  $\beta$ -Catenin und FLT3 bzw. KIT beschrieben<sup>136, 206</sup>. Die Autoren konnten zeigen, dass beide RTKs in der Lage sind,  $\beta$ -Catenin an nicht näher charakterisierten Tyrosinresten zu phosphorylieren, was die nukleäre Translokation des Proteins vereinfacht und  $\beta$ -Catenin abhängige Transkription fördert<sup>139</sup>. Da in ihrer Untersuchung nukleäres phospho- $\beta$ -Catenin besonders in leukämischen Zellen mit ITD oder TKD Mutation gefunden wurde, schlagen Kajiguchi et al. vor, dass die Tyrosinphosphorylierung ein wichtiger Mechanismus onkogener  $\beta$ -Catenin Aktivierung ist. Diese Hypothese steht zwar nicht im Widerspruch zu den in der vorliegenden Arbeit präsentierten Daten, bietet jedoch keine Erklärung für ein anderes Modell, wonach in erster Linie N-terminal unphosphoryliertes  $\beta$ -Catenin für die transkriptionelle Aktivierung von WNT Zielgenen verantwortlich ist<sup>339, 340</sup>. Des Weiteren erfolgt die Tyrosinphosphorylierung  $\beta$ -Catenins sowohl durch onkogene RTKs als auch durch die Liganden stimulierten Wildtyprezeptoren<sup>136, 206</sup>, während die Vernetzung von FLT3 bzw. KIT Signaltransduktion und der klassischen WNT Kaskade allein durch die interne Tandemduplikation induziert wird. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass die aberrante Aktivierung des WNT/ $\beta$ -Catenin Signalwegs ein allgemeines Merkmal hämatopoetischer Rezeptortyrosinkinasen mit ITD Mutation darstellt. Die untersuchten RTKs bedienen sich eines gemeinsamen Mechanismus, der wahrscheinlich unter Beteiligung von Akt die Inhibition von GSK3 induziert. Hierdurch wird  $\beta$ -Catenin stabilisiert und kann die TCF abhängige Transkription von Zielgenen wie c-Myc einleiten, die ihrerseits zur leukämischen Transformation beitragen können.

### 7.3. Identifikation neuer Interaktionspartner bringt $\beta$ -Catenin in Verbindung mit Mitose

Multifunktionale Proteine erlauben einer Zelle die Koordination unterschiedlicher biologischer Prozesse. Eines dieser Proteine ist  $\beta$ -Catenin, dessen Rolle als Adaptermolekül in *adherens junctions* und als Transkriptionsaktivator in der klassischen WNT Signalkaskade wiederholt beschrieben worden ist (Übersichtsartikel in<sup>341</sup>). Neuere Untersuchungen geben jedoch Hinweise darauf, dass  $\beta$ -Catenin nicht nur eine duale Funktion ausübt, sondern an einer Vielzahl unterschiedlicher Prozesse beteiligt ist. So konnte das Protein in Kolonkarzinomzellen als Coaktivator von *hypoxia induced factor 1 $\alpha$*  (HIF1 $\alpha$ ) identifiziert werden<sup>342</sup>, während andere Studien eine Rolle bei der Organisation der Zentrosomen und der mitotischen Spindel beschreiben<sup>212-214, 282</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche  $\beta$ -Catenin Phosphorylierungsmuster in mitotischen Zellen mit einer unterschiedlichen Lokalisation des Proteins verbunden sind und dass  $\beta$ -Catenin ein Substrat der mitotischen Kinase Aurora B ist, was zusammengenommen möglicherweise auf eine neue Funktion von  $\beta$ -Catenin in der Mitose hinweist, die unabhängig von seiner Aufgabe an den Zentrosomen ist.

Ausgehend von der Entdeckung, dass in ITD transformierten Zellen nicht nur  $\beta$ -Catenin, sondern auch Serin/Threonin phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin akkumuliert, einer Modifikation die normalerweise mit der proteosomalen Degradation des Proteins einhergeht<sup>84</sup>, wurde die subzelluläre Verteilung  $\beta$ -Catenins mit Hilfe zweier phosphospezifischer Antikörper untersucht. Die Analyse identifizierte phospho- $\beta$ -Catenin S33/37/T41 im hämatopoetischen System als ständiges zentrosomales Protein, das in der Zytokinese auch in der Zellteilungsfurche nachgewiesen werden konnte und während der Mitose die höchste zytoplasmische Konzentration erreichte. Die beobachtete Assoziation mit den Zentrosomen war sehr konsistent und konnte in 32D, primären AML Blasten, murinen Knochenmarkszellen sowie verschiedenen humanen, leukämischen Zelllinien (Daten nicht gezeigt) detektiert werden. Sie steht in Übereinstimmung mit Publikationen anderer Gruppen, die  $\beta$ -Catenin in verschiedenen Modellen adhärenter Zelllinien mit der Organisation des Spindelapparats und der Teilung von Mutter- und Tochterzentrosom eingangs der Mitose in Verbindung bringen<sup>212-214, 282</sup>.

Huang et al. konnten zeigen, dass die Ausbildung einer astralen Spindel von der aminoterminalen Phosphorylierung  $\beta$ -Catenins (S33/37/T41) abhängt, und postulierten, dass diese Modifikation gleichzeitig die Voraussetzung für eine zentrosomale Lokalisation  $\beta$ -Catenins darstellt<sup>214</sup>. Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit kein Beleg für eine solche Ursache-Wirkungsbeziehung entdeckt werden. Die Mutation verschiedener

aminoterminaler  $\beta$ -Catenin Reste zeigte keinerlei Einfluss auf die Assoziation des Proteins mit den Zentrosomen. Daher scheint die Phosphorylierung vielmehr in Folge der zentrosomalen Bindung einzutreten. Diese Gegenhypothese wird durch Untersuchungen von Bahmanyar et al. und Hadjihannas et al. gestützt, die den Einfluss stabilisierender  $\beta$ -Catenin Mutationen, wie sie häufig in Kolonkarzinomen gefunden werden, auf die Zentrosomenkohäsion analysiert haben. Sie konnten aufgrund der Mutationen der aminoterminalen, regulatorischen Reste zwar eine verminderte Kohäsion und die Ausbildung extrazentrosomaler Strukturen nachweisen, die zentrosomale Lokalisation von  $\beta$ -Catenin als solche wurde jedoch nicht beeinträchtigt<sup>213, 282, 343</sup>. Letztlich wurden die Armadillo *repeats* als die Domäne identifiziert, die die Bindung von  $\beta$ -Catenin an die Zentrosomen vermittelt<sup>213</sup>.

Unter Verwendung eines zweiten phosphospezifischen Antikörpers konnte eine völlig neuartige Lokalisation von  $\beta$ -Catenin an den Kinetochoren kondensierter Chromosomen identifiziert werden. Phospho- $\beta$ -Catenin T41/S45 wurde zuerst in der Prophase der Mitose in Assoziation mit chromosomalen Strukturen detektiert. Beim Übergang zur Anaphase war die Verlagerung an die Zentralspindel und mit Einsetzen der Zellteilung in den Midbody nachzuweisen. Diese spezifische Lokalisation konnte in 32D, NIH3T3, Blasten von AML Patienten und murinem Knochenmark (Daten nicht gezeigt) detektiert werden und wurde weder durch die Anwesenheit des Onkogens KIT-ITD noch durch die Stimulation mit verschiedenen Wachstumsfaktoren beeinflusst. Interessanterweise wies in PLK1 Inhibitor behandelten primären AML Blasten auch S33/37/T41 phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin eine Assoziation mit den Kinetochoren auf. Dies könnte zweierlei bedeuten. (i) Phosphorylierung durch PLK1 spielt eine Rolle für die „richtige“ Modifikation aminoterminaler Reste von Kinetochor gebundenem  $\beta$ -Catenin. Tatsächlich wurde  $\beta$ -Catenin S718 kürzlich als Target der mitotischen Kinase PLK1 identifiziert<sup>215</sup>. (ii) Die untersuchten Zellen trugen unbekannte Aberrationen, die die Regulation der  $\beta$ -Catenin Lokalisation und/oder Phosphorylierung in der Mitose beeinflussen. Auch in einigen leukämischen Zelllinien (NB4, KCL-22, Kasumi-1), die jeweils unterschiedliche chromosomale Translokationsprodukte exprimieren, konnte phospho- $\beta$ -Catenin S33/37/T41 an Stelle der anderen Phosphorylierungsvariante an den Kinetochoren detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Diese Daten suggerieren, dass die Regulation der  $\beta$ -Catenin Phosphorylierung an den Kinetochoren vielfältig ist und eine „falsche“ Phosphorylierung, wie sie in den leukämischen Zelllinien detektiert werden konnte, möglicherweise zum Fortschreiten einer Leukämieerkrankung beiträgt (siehe unten).

Die oben beschriebene mitotische Lokalisation von  $\beta$ -Catenin korreliert exakt mit der zuvor publizierten subzellulären Verteilung von Aurora Kinase B (AIM1)<sup>289, 290</sup>. AIM1 ist die

katalytisch aktive Komponente des *chromosomal passenger complex* (CPC)<sup>285, 344, 345</sup>, der außerdem aus den regulatorischen Untereinheiten *inner centromer protein* (INCENP)<sup>346, 347</sup>, Survivin<sup>348</sup> und Borealin<sup>349</sup> besteht. Diese sind für die vollständige Aktivierung der Kinase und die richtige Lokalisation des Komplexes erforderlich<sup>350-353</sup>. CPC Proteine koordinieren verschiedene mitotische Prozesse, die sich in der Wanderungsbewegung des Komplexes widerspiegeln. In der Prophase induziert er durch Phosphorylierung von Histon H3 die Heterochromatinprotein 1 $\alpha$  (HP1 $\alpha$ ) Dissoziation von den Chromosomen. CPC ist weiterhin für die richtige Anordnung der Chromosomen in der Metaphaseplatte verantwortlich, korrigiert fehlerhafte Bindungen der Spindelfasern an Kinetochore, reguliert und organisiert den Aufbau der Zentralspindel und ist notwendig für die Zytokinese (Übersichtsartikel in<sup>354</sup>). Mittels Immunfluoreszenzanalyse konnte die Colokalisation von Aurora B und  $\beta$ -Catenin in allen Phasen der Mitose nachgewiesen werden, was für eine CPC abhängige Funktion von  $\beta$ -Catenin in der Zellteilung spricht.

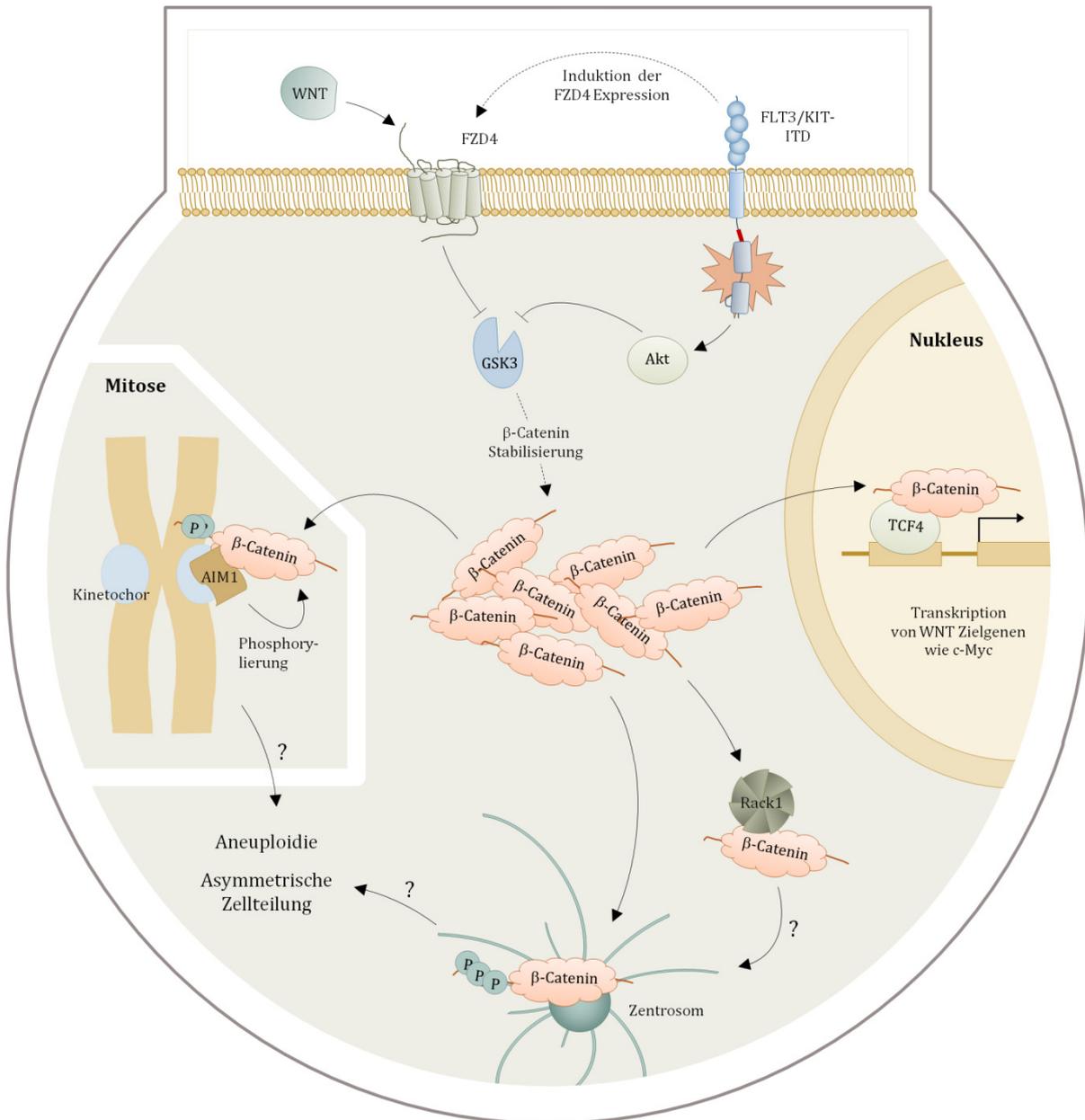
Darüber hinaus wurde in *in vitro* Assays  $\beta$ -Catenin als Bindungspartner und neues Substrat von AIM1 bestimmt. Die Serin/Threoninkinase Aurora B phosphoryliert Konsensusmotive des Typs (R/K)<sub>1-3-x</sub>-(S/T) oder (R/K)-(R/K)-x<sub>0-2</sub>-(S/T)<sup>355-357</sup>. Bei der Sequenzanalyse von  $\beta$ -Catenin konnte ein solches Erkennungsmotiv für Serin 675 identifiziert werden (K-K-R-L-S). Dieser Aminosäurerest ist auch Target der Protein-kinase A. Phosphorylierung durch PKA an dieser Position inhibiert die Ubiquitylierung und Degradation  $\beta$ -Catenins unabhängig vom Phosphorylierungsstatus regulatorischer Reste in der aminoterminalen Domäne<sup>205</sup>. Vielleicht erfolgt die Modifikation an S675 in der Mitose durch Aurora B, wobei die Phosphorylierung selbst ihre Funktion beibehält und Kinetochor gebundenes phospho- $\beta$ -Catenin T41/S45 vor einem frühzeitigen Abbau schützt.

Die Funktion von  $\beta$ -Catenin an Zentrosomen und Kinetochoren könnte weiterhin durch die Interaktion mit dem Adapterprotein Rack1 beeinflusst werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die zuvor in einem *yeast two hybrid screen* identifizierte Bindung beider Proteine *in vivo* verifiziert. Der *receptor for activated C-kinase 1* ist an zahlreichen zytosolischen Prozessen beteiligt (Übersichtsartikel in<sup>358-361</sup>), zeigt in der Mitose allerdings vor allem eine Lokalisation an Kinetochoren, den Zentrosomen sowie im Midbody<sup>362, 363</sup> und ist somit unter Umständen auch an der Regulation  $\beta$ -Catenin abhängiger Prozesse in der Mitose beteiligt.

Obwohl  $\beta$ -Catenin vor allem mit der klassischen WNT Signaltransduktion in Verbindung gebracht wird, konnten in den letzten Jahren immer mehr Belege für eine Beteiligung des Proteins und anderer Komponenten der Signalkaskade an mitotischen Prozessen gefunden werden, die im Folgenden kurz zusammengefaßt werden. (i) Die zytosolische  $\beta$ -Catenin Konzentration unterliegt einer Zellzyklus regulierten Oszillation, mit einem Peak in der G2/M-Phase und einer drastischen Reduktion beim Übergang in die

G1-Phase<sup>207</sup>. (ii) Entsprechend konnte die höchste Aktivität der  $\beta$ -Catenin abhängigen Transkription von WNT Zielgenen in der G2/M-Phase detektiert werden<sup>364</sup>. (iii)  $\beta$ -Catenin ist Ziel verschiedener mitotischer Kinasen, zum Beispiel PLK1<sup>215</sup> und Nek2<sup>213</sup> und (iv) an der Ausbildung eines astralen Spindelapparats beteiligt<sup>214</sup>. (v)  $\beta$ -Catenin, Axin2 und GSK3 assoziieren mit den Zentrosomen und regulieren die Teilung von Mutter- und Tochterzentrosom<sup>212-214, 282, 343</sup>, (vi) Glycogen Synthase Kinase 3 ist außerdem an der Organisation der mitotischen Spindel beteiligt<sup>365</sup>. (vii) DVL ist ein Substrat von PLK1, trägt zur stabilen Bindung der Mikrotubuli an die Kinetochore bei und spielt eine Rolle in der Aktivierung des *spindle assembly checkpoints*<sup>366</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde die Assoziation von  $\beta$ -Catenin mit den Kinetochoren sowie dessen Colokalisation mit und Phosphorylierung durch Aurora Kinase B als ein neues Indiz für die Funktion des WNT Signalwegs in der Mitose identifiziert.

Obwohl bisher eindeutige Beweise für eine Funktion von AIM1 in der Leukämogenese sowie der Pathogenese anderer Krebserkrankungen fehlen, konnten in jüngerer Vergangenheit gute Erfolge mit spezifischen Aurora Kinase B Inhibitoren bei der Behandlung leukämischer Zellen *in vitro* und *in vivo* erzielt werden. Einige dieser Substanzen werden bereits in klinischen Studien getestet<sup>367-369</sup>. In dieser Arbeit konnte eine leichte, aber signifikante Erhöhung des Aurora B mRNA Levels in AML Blasten gegenüber CD34<sup>+</sup> Zellen gemessen werden. Eine andere Untersuchung stellt eine Korrelation zwischen Aurora B Deregulation und einer ungünstigen Zytogenetik in AML Patienten fest<sup>287</sup>. Desweiteren konnte AIM1 Überexpression in verschiedenen Zellkulturmodellen mit der Induktion von Aneuploidie in Verbindung gebracht werden<sup>345, 370-372</sup>. Diese numerische Chromosomenaberration, bei der ganze Chromosomen fehlen oder überzählig sind, ist wiederum ein Kennzeichen akuter myeloischer Leukämien<sup>373-378</sup>. Onkogen induzierte  $\beta$ -Catenin Stabilisation oder aberrante Phosphorylierung des Kinetochor gebundenen Proteins könnte die Aktivität von Aurora B beeinflussen und in Kooperation mit der Kinase Aneuploidie induzieren. Auch die fehlerhafte Teilung von Mutter- und Tochterzentrosom wird mit dieser Art der Genommutation in Verbindung gebracht und liefert einen weiteren denkbaren Link zwischen  $\beta$ -Catenin Deregulation bzw. WNT Signaltransduktion auf der einen und Chromosomenaberration auf der anderen Seite. Viele Theorien gehen davon aus, dass Aneuploidie nicht in erster Linie am Prozess der Leukämogenese beteiligt ist, sondern eher in Folge der Transformation entsteht. Nichtsdestotrotz stellt sie eine zusätzliche Aberration dar, die Einfluss auf die Prognose und Behandlung von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie hat.



**Abbildung 35: Arbeitsmodell der β-Catenin Regulation und Funktion in der Pathogenese der AML.** AML assoziierte Alterationen der Rezeptortyrosinkinasen FLT3 und KIT bedingen durch GSK3 Inaktivierung die Akkumulation von β-Catenin. Zudem induzieren sie die Expression von FZD4. Der WNT Rezeptor führt seinerseits zu einer ligandenabhängigen Stabilisierung von β-Catenin. β-Catenin (i) aktiviert die TCF abhängige Transkription von WNT Zielgenen, (ii) bindet Rack1 und AIM1 und (iii) zeigt in Abhängigkeit von seinem Phosphorylierungsmuster entweder eine zentrosomale Lokalisation oder eine Assoziation mit Kinetochoren kondensierter Chromosomen in der Mitose. Möglicherweise sind einige dieser Funktionen von β-Catenin an der Entstehung von Aneuploidie und/oder fehlerhafter asymmetrischer Zellteilung beteiligt, zwei Kennzeichen von akuter myeloischer Leukämie.

In der Initiation einer AML Erkrankung wäre außerdem ein Effekt aberranter WNT Signaltransduktion auf die asymmetrische Zellteilung (*asymmetric cell division, ACD*) möglich. Akute myeloische Leukämie ist durch klonale Proliferation differenzierungs-

gestörter Vorläuferzellen der myeloischen Entwicklungsreihe charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass diese Blasten Abkömmlinge einer leukämischen Stammzelle sind, die die Fähigkeit zur ungehemmten Proliferation und zur Selbsterneuerung erworben hat<sup>379, 380</sup>. Dies wird wahrscheinlich durch eine fehlerhafte Verteilung von Eigenschaften der Zelldeterminierung während der asymmetrischen Zellteilung hervorgerufen. Es ist anzunehmen, dass in Folge einer aberranten ACD an Stelle einer Tochterzelle mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung sowie einer zweiten, proliferativ aktiven Tochterzelle mit einer begrenzten Überlebensfähigkeit zwei identische Zellen generiert werden, die beide Eigenschaften in sich vereinen. In verschiedenen Modellorganismen, wie *Caenorhabditis elegans*, Seeanemone oder Zebrafisch<sup>381-384</sup>, konnte der WNT Signalweg bereits mit ACD in Verbindung gebracht werden. Ob die aberrante Aktivierung der Kaskade in der humanen Leukämogenese zur Induktion einer fehlerhaften asymmetrischen Zellteilung führt, sollte Inhalt weiterer Untersuchungen sein.

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Daten erlauben einen umfassenden Blick auf die Rolle des klassischen WNT Signalwegs und von  $\beta$ -Catenin in der akuten myeloischen Leukämie (Abbildung 35). Es konnte gezeigt werden, dass die Kaskade durch verschiedene AML assoziierte Aberrationen aktiviert wird, was in erster Linie zur Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin führt. In einer frühen Phase der Leukämogenese könnte dies zum einen die Transkription wichtiger WNT Zielgene induzieren, die ihrerseits zur Transformation beitragen, und andererseits Einfluss auf die asymmetrische Zellteilung ausüben, wodurch die frühe Leukämiezelle die Fähigkeit zur Selbsterneuerung sowie zur ungehemmten Proliferation erhält. In einer späteren Phase könnte die Bindung von dereguliertem  $\beta$ -Catenin an die Kinetochore und Zentrosomen zusätzlich Aneuploidie verursachen. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass WNT/ $\beta$ -Catenin Signaltransduktion an vielen Prozessen der Leukämieentstehung beteiligt ist, was den Signalweg zu einem attraktiven Target für die Entwicklung neuer Medikamente und Therapieansätze macht.



## 8. LITERATUR

1. McCulloch, E. A. Normal stem cells and the clonal hemopathies. *Prog Clin Biol Res* 184, 21-38 (1985).
2. Wingo, P. A., Tong, T. & Bolden, S. Cancer statistics, 1995. *CA Cancer J Clin* 45, 8-30 (1995).
3. Schoch, C. et al. Dependence of age-specific incidence of acute myeloid leukemia on karyotype. *Blood* 98, 3500 (2001).
4. Bennett, J. M. et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 33, 451-8 (1976).
5. Bennett, J. M. et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 103, 620-5 (1985).
6. Harris, N. L. et al. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Ann Oncol* 10, 1419-32 (1999).
7. Vardiman, J. W., Harris, N. L. & Brunning, R. D. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 100, 2292-302 (2002).
8. Grisolano, J. L., Wesselschmidt, R. L., Pelicci, P. G. & Ley, T. J. Altered myeloid development and acute leukemia in transgenic mice expressing PML-RAR alpha under control of cathepsin G regulatory sequences. *Blood* 89, 376-87 (1997).
9. Yuan, Y. et al. AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10398-403 (2001).
10. Kelly, L. M. et al. FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model. *Blood* 99, 310-8 (2002).
11. Gilliland, D. G. Hematologic malignancies. *Curr Opin Hematol* 8, 189-91 (2001).
12. Kosmider, O. & Moreau-Gachelin, F. From mice to human: the "two-hit model" of leukemogenesis. *Cell Cycle* 5, 569-70 (2006).
13. Paschka, P. Core binding factor acute myeloid leukemia. *Semin Oncol* 35, 410-7 (2008).
14. Liu, H., Cheng, E. H. & Hsieh, J. J. MLL fusions: pathways to leukemia. *Cancer Biol Ther* 8, 1204-11 (2009).
15. Melnick, A. & Licht, J. D. Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 93, 3167-215 (1999).
16. Snaddon, J. et al. Mutations of CEBPA in acute myeloid leukemia FAB types M1 and M2. *Genes Chromosomes Cancer* 37, 72-8 (2003).

17. Verhaak, R. G. et al. Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood* 106, 3747-54 (2005).
18. Bowen, D. T. et al. RAS mutation in acute myeloid leukemia is associated with distinct cytogenetic subgroups but does not influence outcome in patients younger than 60 years. *Blood* 106, 2113-9 (2005).
19. Yarden, Y. & Ullrich, A. Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* 57, 443-78 (1988).
20. Matthews, W., Jordan, C. T., Wiegand, G. W., Pardoll, D. & Lemischka, I. R. A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. *Cell* 65, 1143-52 (1991).
21. Lyman, S. D. et al. Characterization of the protein encoded by the *flt3* (*flk2*) receptor-like tyrosine kinase gene. *Oncogene* 8, 815-22 (1993).
22. Yarden, Y. et al. Human proto-oncogene *c-kit*: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *Embo J* 6, 3341-51 (1987).
23. Brasel, K. et al. Expression of the *flt3* receptor and its ligand on hematopoietic cells. *Leukemia* 9, 1212-8 (1995).
24. Ogawa, M. et al. Expression and function of *c-kit* in hemopoietic progenitor cells. *J Exp Med* 174, 63-71 (1991).
25. Ikuta, K. & Weissman, I. L. Evidence that hematopoietic stem cells express mouse *c-kit* but do not depend on steel factor for their generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1502-6 (1992).
26. Heiss, E. et al. Identification of Y589 and Y599 in the juxtamembrane domain of Flt3 as ligand-induced autophosphorylation sites involved in binding of Src family kinases and the protein tyrosine phosphatase SHP2. *Blood* 108, 1542-50 (2006).
27. Price, D. J. et al. Direct association of Csk homologous kinase (CHK) with the diphosphorylated site Tyr568/570 of the activated *c-KIT* in megakaryocytes. *J Biol Chem* 272, 5915-20 (1997).
28. Lennartsson, J. et al. Phosphorylation of Shc by Src family kinases is necessary for stem cell factor receptor/*c-kit* mediated activation of the Ras/MAP kinase pathway and *c-fos* induction. *Oncogene* 18, 5546-53 (1999).
29. Zhang, S. & Broxmeyer, H. E. Flt3 ligand induces tyrosine phosphorylation of *gab1* and *gab2* and their association with *shp-2*, *grb2*, and PI3 kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 277, 195-9 (2000).
30. Zhang, S., Mantel, C. & Broxmeyer, H. E. Flt3 signaling involves tyrosyl-phosphorylation of SHP-2 and SHIP and their association with Grb2 and Shc in Baf3/Flt3 cells. *J Leukoc Biol* 65, 372-80 (1999).
31. Blume-Jensen, P., Janknecht, R. & Hunter, T. The *kit* receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Curr Biol* 8, 779-82 (1998).
32. Deberry, C., Mou, S. & Linnekin, D. Stat1 associates with *c-kit* and is activated in response to stem cell factor. *Biochem J* 327 ( Pt 1), 73-80 (1997).
33. Dosil, M., Wang, S. & Lemischka, I. R. Mitogenic signalling and substrate specificity of the Flk2/Flt3 receptor tyrosine kinase in fibroblasts and interleukin 3-dependent hematopoietic cells. *Mol Cell Biol* 13, 6572-85 (1993).
34. Mizuki, M. et al. Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood* 96, 3907-14 (2000).
35. Ryan, J. J. et al. Stem cell factor activates STAT-5 DNA binding in IL-3-derived bone marrow mast cells. *Exp Hematol* 25, 357-62 (1997).
36. Serve, H., Hsu, Y. C. & Besmer, P. Tyrosine residue 719 of the *c-kit* receptor is essential for binding of the P85 subunit of phosphatidylinositol (PI) 3-kinase and for *c-kit*-associated PI 3-kinase activity in COS-1 cells. *J Biol Chem* 269, 6026-30 (1994).
37. Weiler, S. R. et al. JAK2 is associated with the *c-kit* proto-oncogene product and is phosphorylated in response to stem cell factor. *Blood* 87, 3688-93 (1996).

38. Bene, M. C. et al. The reliability and specificity of c-kit for the diagnosis of acute myeloid leukemias and undifferentiated leukemias. The European Group for the Immunological Classification of Leukemias (EGIL). *Blood* 92, 596-9 (1998).
39. Rosnet, O. et al. Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells. *Leukemia* 10, 238-48 (1996).
40. Schwartz, S. et al. Expression of the C-kit receptor (CD117) is a feature of almost all subtypes of de novo acute myeloblastic leukemia (AML), including cytogenetically good-risk AML, and lacks prognostic significance. *Leuk Lymphoma* 34, 85-94 (1999).
41. Valverde, L. R. et al. C-kit receptor (CD117) expression in acute leukemia. *Ann Hematol* 72, 11-5 (1996).
42. Ikeda, H. et al. Expression and functional role of the proto-oncogene c-kit in acute myeloblastic leukemia cells. *Blood* 78, 2962-8 (1991).
43. Carow, C. E. et al. Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias. *Blood* 87, 1089-96 (1996).
44. Schnittger, S. et al. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood* 100, 59-66 (2002).
45. Nakao, M. et al. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 10, 1911-8 (1996).
46. Thiede, C. et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 99, 4326-35 (2002).
47. Steudel, C. et al. Comparative analysis of MLL partial tandem duplication and FLT3 internal tandem duplication mutations in 956 adult patients with acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 37, 237-51 (2003).
48. Kondo, M. et al. Prognostic value of internal tandem duplication of the FLT3 gene in childhood acute myelogenous leukemia. *Med Pediatr Oncol* 33, 525-9 (1999).
49. Liang, D. C. et al. Clinical relevance of internal tandem duplication of the FLT3 gene in childhood acute myeloid leukemia. *Cancer* 94, 3292-8 (2002).
50. Abu-Duhier, F. M. et al. Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 113, 983-8 (2001).
51. Yamamoto, Y. et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* 97, 2434-9 (2001).
52. Choudhary, C. et al. AML-associated Flt3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with Flt3 ITD mutations. *Blood* 106, 265-73 (2005).
53. Lennartsson, J., Jelacic, T., Linnekin, D. & Shivakrupa, R. Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit. *Stem Cells* 23, 16-43 (2005).
54. Beghini, A. et al. KIT activating mutations: incidence in adult and pediatric acute myeloid leukemia, and identification of an internal tandem duplication. *Haematologica* 89, 920-5 (2004).
55. Care, R. S. et al. Incidence and prognosis of c-KIT and FLT3 mutations in core binding factor (CBF) acute myeloid leukaemias. *Br J Haematol* 121, 775-7 (2003).
56. Gari, M. et al. c-kit proto-oncogene exon 8 in-frame deletion plus insertion mutations in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 105, 894-900 (1999).
57. Kohl, T. M., Schnittger, S., Ellwart, J. W., Hiddemann, W. & Spiekermann, K. KIT exon 8 mutations associated with core-binding factor (CBF)-acute myeloid leukemia (AML) cause hyperactivation of the receptor in response to stem cell factor. *Blood* 105, 3319-21 (2005).
58. Beghini, A. et al. C-kit mutations in core binding factor leukemias. *Blood* 95, 726-7 (2000).
59. Schnittger, S. et al. KIT-D816 mutations in AML1-ETO-positive AML are associated with impaired event-free and overall survival. *Blood* 107, 1791-9 (2006).
60. Heinrich, M. C. et al. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 21, 4342-9 (2003).

61. Antonescu, C. R. et al. Association of KIT exon 9 mutations with nongastric primary site and aggressive behavior: KIT mutation analysis and clinical correlates of 120 gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 9, 3329-37 (2003).
62. Wang, Y. Y. et al. AML1-ETO and C-KIT mutation/overexpression in t(8;21) leukemia: implication in stepwise leukemogenesis and response to Gleevec. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1104-9 (2005).
63. Corbacioglu, S. et al. Newly identified c-KIT receptor tyrosine kinase ITD in childhood AML induces ligand-independent growth and is responsive to a synergistic effect of imatinib and rapamycin. *Blood* 108, 3504-13 (2006).
64. Boutros, M., Paricio, N., Strutt, D. I. & Mlodzik, M. Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. *Cell* 94, 109-18 (1998).
65. Kuhl, M., Sheldahl, L. C., Park, M., Miller, J. R. & Moon, R. T. The Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet* 16, 279-83 (2000).
66. McMahon, A. P. & Moon, R. T. Ectopic expression of the proto-oncogene int-1 in *Xenopus* embryos leads to duplication of the embryonic axis. *Cell* 58, 1075-84 (1989).
67. Wolda, S. L., Moody, C. J. & Moon, R. T. Overlapping expression of Xwnt-3A and Xwnt-1 in neural tissue of *Xenopus laevis* embryos. *Dev Biol* 155, 46-57 (1993).
68. Shimizu, H. et al. Transformation by Wnt family proteins correlates with regulation of beta-catenin. *Cell Growth Differ* 8, 1349-58 (1997).
69. Du, S. J., Purcell, S. M., Christian, J. L., McGrew, L. L. & Moon, R. T. Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos. *Mol Cell Biol* 15, 2625-34 (1995).
70. Kishida, S., Yamamoto, H. & Kikuchi, A. Wnt-3a and Dvl induce neurite retraction by activating Rho-associated kinase. *Mol Cell Biol* 24, 4487-501 (2004).
71. Mikels, A. J. & Nusse, R. Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol* 4, e115 (2006).
72. Behrens, J. et al. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382, 638-42 (1996).
73. Molenaar, M. et al. XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 86, 391-9 (1996).
74. Amit, S. et al. Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev* 16, 1066-76 (2002).
75. Ha, N. C., Tonzuka, T., Stamos, J. L., Choi, H. J. & Weis, W. I. Mechanism of phosphorylation-dependent binding of APC to beta-catenin and its role in beta-catenin degradation. *Mol Cell* 15, 511-21 (2004).
76. Ikeda, S. et al. Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. *Embo J* 17, 1371-84 (1998).
77. Sakanaka, C., Weiss, J. B. & Williams, L. T. Bridging of beta-catenin and glycogen synthase kinase-3beta by axin and inhibition of beta-catenin-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3020-3 (1998).
78. Liu, C. et al. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108, 837-47 (2002).
79. Wu, G. & He, X. Threonine 41 in beta-catenin serves as a key phosphorylation relay residue in beta-catenin degradation. *Biochemistry* 45, 5319-23 (2006).
80. Hart, M. et al. The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell. *Curr Biol* 9, 207-10 (1999).
81. Kimelman, D. & Xu, W. beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* 25, 7482-91 (2006).
82. Kitagawa, M. et al. An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of beta-catenin. *Embo J* 18, 2401-10 (1999).
83. Latres, E., Chiaur, D. S. & Pagano, M. The human F box protein beta-Trcp associates with the Cul1/Skp1 complex and regulates the stability of beta-catenin. *Oncogene* 18, 849-54 (1999).

84. Liu, C. et al. beta-Trcp couples beta-catenin phosphorylation-degradation and regulates *Xenopus* axis formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6273-8 (1999).
85. Winston, J. T. et al. The SCFbeta-TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in I $\kappa$ B $\alpha$  and beta-catenin and stimulates I $\kappa$ B $\alpha$  ubiquitination in vitro. *Genes Dev* 13, 270-83 (1999).
86. Brantjes, H., Roose, J., van De Wetering, M. & Clevers, H. All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors. *Nucleic Acids Res* 29, 1410-9 (2001).
87. Chen, G., Fernandez, J., Mische, S. & Courey, A. J. A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in *Drosophila* development. *Genes Dev* 13, 2218-30 (1999).
88. Roose, J. et al. The *Xenopus* Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature* 395, 608-12 (1998).
89. Valenta, T., Lukas, J. & Korinek, V. HMG box transcription factor TCF-4's interaction with CtBP1 controls the expression of the Wnt target Axin2/Conductin in human embryonic kidney cells. *Nucleic Acids Res* 31, 2369-80 (2003).
90. Pinson, K. I., Brennan, J., Monkley, S., Avery, B. J. & Skarnes, W. C. An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* 407, 535-8 (2000).
91. Kato, M. et al. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol* 157, 303-14 (2002).
92. Kelly, O. G., Pinson, K. I. & Skarnes, W. C. The Wnt co-receptors Lrp5 and Lrp6 are essential for gastrulation in mice. *Development* 131, 2803-15 (2004).
93. Tamai, K. et al. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 407, 530-5 (2000).
94. Liu, T., Liu, X., Wang, H., Moon, R. T. & Malbon, C. C. Activation of rat frizzled-1 promotes Wnt signaling and differentiation of mouse F9 teratocarcinoma cells via pathways that require Galpha(q) and Galpha(o) function. *J Biol Chem* 274, 33539-44 (1999).
95. Liu, X., Rubin, J. S. & Kimmel, A. R. Rapid, Wnt-induced changes in GSK3 $\beta$  associations that regulate beta-catenin stabilization are mediated by Galpha proteins. *Curr Biol* 15, 1989-97 (2005).
96. Wong, H. C. et al. Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled. *Mol Cell* 12, 1251-60 (2003).
97. Cliffe, A., Hamada, F. & Bienz, M. A role of Dishevelled in relocating Axin to the plasma membrane during wingless signaling. *Curr Biol* 13, 960-6 (2003).
98. Kishida, S. et al. DIX domains of Dvl and axin are necessary for protein interactions and their ability to regulate beta-catenin stability. *Mol Cell Biol* 19, 4414-22 (1999).
99. Smalley, M. J. et al. Interaction of axin and Dvl-2 proteins regulates Dvl-2-stimulated TCF-dependent transcription. *Embo J* 18, 2823-35 (1999).
100. Schwarz-Romond, T., Metcalfe, C. & Bienz, M. Dynamic recruitment of axin by Dishevelled protein assemblies. *J Cell Sci* 120, 2402-12 (2007).
101. Davidson, G. et al. Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature* 438, 867-72 (2005).
102. Zeng, X. et al. A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* 438, 873-7 (2005).
103. Zeng, X. et al. Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development* 135, 367-75 (2008).
104. Lee, E., Salic, A., Kruger, R., Heinrich, R. & Kirschner, M. W. The roles of APC and Axin derived from experimental and theoretical analysis of the Wnt pathway. *PLoS Biol* 1, E10 (2003).
105. Salic, A., Lee, E., Mayer, L. & Kirschner, M. W. Control of beta-catenin stability: reconstitution of the cytoplasmic steps of the wnt pathway in *Xenopus* egg extracts. *Mol Cell* 5, 523-32 (2000).

106. Cselenyi, C. S. et al. LRP6 transduces a canonical Wnt signal independently of Axin degradation by inhibiting GSK3's phosphorylation of beta-catenin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 8032-7 (2008).
107. Piao, S. et al. Direct inhibition of GSK3beta by the phosphorylated cytoplasmic domain of LRP6 in Wnt/beta-catenin signaling. *PLoS One* 3, e4046 (2008).
108. Wu, G., Huang, H., Garcia Abreu, J. & He, X. Inhibition of GSK3 phosphorylation of beta-catenin via phosphorylated PPPSPXS motifs of Wnt coreceptor LRP6. *PLoS One* 4, e4926 (2009).
109. Bilic, J. et al. Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science* 316, 1619-22 (2007).
110. Blitzer, J. T. & Nusse, R. A critical role for endocytosis in Wnt signaling. *BMC Cell Biol* 7, 28 (2006).
111. Yamamoto, H., Komekado, H. & Kikuchi, A. Caveolin is necessary for Wnt-3a-dependent internalization of LRP6 and accumulation of beta-catenin. *Dev Cell* 11, 213-23 (2006).
112. Taelman, V. F. et al. Wnt signaling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes. *Cell* 143, 1136-48.
113. Fagotto, F., Gluck, U. & Gumbiner, B. M. Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of beta-catenin. *Curr Biol* 8, 181-90 (1998).
114. Henderson, B. R. Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates beta-catenin subcellular localization and turnover. *Nat Cell Biol* 2, 653-60 (2000).
115. Neufeld, K. L., Zhang, F., Cullen, B. R. & White, R. L. APC-mediated downregulation of beta-catenin activity involves nuclear sequestration and nuclear export. *EMBO Rep* 1, 519-23 (2000).
116. Rosin-Arbesfeld, R., Townsley, F. & Bienz, M. The APC tumour suppressor has a nuclear export function. *Nature* 406, 1009-12 (2000).
117. Korinek, V. et al. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science* 275, 1784-7 (1997).
118. Morin, P. J. et al. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275, 1787-90 (1997).
119. Tsukamoto, A. S., Grosschedl, R., Guzman, R. C., Parslow, T. & Varmus, H. E. Expression of the int-1 gene in transgenic mice is associated with mammary gland hyperplasia and adenocarcinomas in male and female mice. *Cell* 55, 619-25 (1988).
120. Alman, B. A., Li, C., Pajerski, M. E., Diaz-Cano, S. & Wolfe, H. J. Increased beta-catenin protein and somatic APC mutations in sporadic aggressive fibromatoses (desmoid tumors). *Am J Pathol* 151, 329-34 (1997).
121. de La Coste, A. et al. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8847-51 (1998).
122. Webster, M. T. et al. Sequence variants of the axin gene in breast, colon, and other cancers: an analysis of mutations that interfere with GSK3 binding. *Genes Chromosomes Cancer* 28, 443-53 (2000).
123. He, T. C. et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281, 1509-12 (1998).
124. Tetsu, O. & McCormick, F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398, 422-6 (1999).
125. Shtutman, M. et al. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5522-7 (1999).
126. Cobas, M. et al. Beta-catenin is dispensable for hematopoiesis and lymphopoiesis. *J Exp Med* 199, 221-9 (2004).
127. Jeannet, G. et al. Long-term, multilineage hematopoiesis occurs in the combined absence of beta-catenin and gamma-catenin. *Blood* 111, 142-9 (2008).
128. Nemeth, M. J., Mak, K. K., Yang, Y. & Bodine, D. M. beta-Catenin expression in the bone marrow microenvironment is required for long-term maintenance of primitive hematopoietic cells. *Stem Cells* 27, 1109-19 (2009).

129. Staal, F. J. & Luis, T. C. Wnt signaling in hematopoiesis: crucial factors for self-renewal, proliferation, and cell fate decisions. *J Cell Biochem* 109, 844-9 (2010).
130. Wang, Y. et al. The Wnt/beta-catenin pathway is required for the development of leukemia stem cells in AML. *Science* 327, 1650-3 (2010).
131. Simon, M., Grandage, V. L., Linch, D. C. & Khwaja, A. Constitutive activation of the Wnt/beta-catenin signalling pathway in acute myeloid leukaemia. *Oncogene* 24, 2410-20 (2005).
132. Muller-Tidow, C. et al. Translocation products in acute myeloid leukemia activate the Wnt signaling pathway in hematopoietic cells. *Mol Cell Biol* 24, 2890-904 (2004).
133. Miller, J. R. & Moon, R. T. Analysis of the signaling activities of localization mutants of beta-catenin during axis specification in *Xenopus*. *J Cell Biol* 139, 229-43 (1997).
134. Simcha, I. et al. Differential nuclear translocation and transactivation potential of beta-catenin and plakoglobin. *J Cell Biol* 141, 1433-48 (1998).
135. Tickenbrock, L. et al. Flt3 tandem duplication mutations cooperate with Wnt signaling in leukemic signal transduction. *Blood* 105, 3699-706 (2005).
136. Kajiguchi, T. et al. FLT3 regulates beta-catenin tyrosine phosphorylation, nuclear localization, and transcriptional activity in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* 21, 2476-84 (2007).
137. Bonvini, P. et al. Geldanamycin abrogates ErbB2 association with proteasome-resistant beta-catenin in melanoma cells, increases beta-catenin-E-cadherin association, and decreases beta-catenin-sensitive transcription. *Cancer Res* 61, 1671-7 (2001).
138. Ilan, N., Tucker, A. & Madri, J. A. Vascular endothelial growth factor expression, beta-catenin tyrosine phosphorylation, and endothelial proliferative behavior: a pathway for transformation? *Lab Invest* 83, 1105-15 (2003).
139. Piedra, J. et al. Regulation of beta-catenin structure and activity by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 276, 20436-43 (2001).
140. Ma, Y. et al. SALL4, a novel oncogene, is constitutively expressed in human acute myeloid leukemia (AML) and induces AML in transgenic mice. *Blood* 108, 2726-35 (2006).
141. Shuai, X. et al. Overexpression of the novel oncogene SALL4 and activation of the Wnt/beta-catenin pathway in myelodysplastic syndromes. *Cancer Genet Cytogenet* 194, 119-24 (2009).
142. Kawano, Y. & Kypta, R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 116, 2627-34 (2003).
143. Chim, C. S., Fung, T. K., Wong, K. F., Lau, J. S. & Liang, R. Infrequent Wnt inhibitory factor-1 (Wif-1) methylation in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 30, 1135-9 (2006).
144. Suzuki, R. et al. Preferential hypermethylation of the Dickkopf-1 promoter in core-binding factor leukaemia. *Br J Haematol* 138, 624-31 (2007).
145. Jost, E. et al. Epigenetic inactivation of secreted Frizzled-related proteins in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 142, 745-53 (2008).
146. Valencia, A. et al. Wnt signaling pathway is epigenetically regulated by methylation of Wnt antagonists in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 23, 1658-66 (2009).
147. Fraga, M. F. et al. Epigenetic inactivation of the Groucho homologue gene TLE1 in hematologic malignancies. *Cancer Res* 68, 4116-22 (2008).
148. Figueroa, M. E. et al. MDS and secondary AML display unique patterns and abundance of aberrant DNA methylation. *Blood* 114, 3448-58 (2009).
149. Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., Lundin, L. G. & Schioth, H. B. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63, 1256-72 (2003).
150. Kirikoshi, H. et al. Molecular cloning and characterization of human Frizzled-4 on chromosome 11q14-q21. *Biochem Biophys Res Commun* 264, 955-61 (1999).
151. Koike, J. et al. Molecular cloning of Frizzled-10, a novel member of the Frizzled gene family. *Biochem Biophys Res Commun* 262, 39-43 (1999).
152. Wang, Y. et al. A large family of putative transmembrane receptors homologous to the product of the *Drosophila* tissue polarity gene *frizzled*. *J Biol Chem* 271, 4468-76 (1996).
153. Bhanot, P. et al. A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* 382, 225-30 (1996).

154. Dann, C. E. et al. Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. *Nature* 412, 86-90 (2001).
155. Nam, J. S., Turcotte, T. J., Smith, P. F., Choi, S. & Yoon, J. K. Mouse cristin/R-spondin family proteins are novel ligands for the Frizzled 8 and LRP6 receptors and activate beta-catenin-dependent gene expression. *J Biol Chem* 281, 13247-57 (2006).
156. Xu, Q. et al. Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell* 116, 883-95 (2004).
157. Bafico, A. et al. Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for FRP inhibition of Wnt signaling. *J Biol Chem* 274, 16180-7 (1999).
158. Rattner, A. et al. A family of secreted proteins contains homology to the cysteine-rich ligand-binding domain of frizzled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2859-63 (1997).
159. Rodriguez, J. et al. SFRP1 regulates the growth of retinal ganglion cell axons through the Fz2 receptor. *Nat Neurosci* 8, 1301-9 (2005).
160. Umbhauer, M. et al. The C-terminal cytoplasmic Lys-thr-X-X-X-Trp motif in frizzled receptors mediates Wnt/beta-catenin signalling. *Embo J* 19, 4944-54 (2000).
161. Sheldahl, L. C., Park, M., Malbon, C. C. & Moon, R. T. Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner. *Curr Biol* 9, 695-8 (1999).
162. Gregorieff, A. et al. Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology* 129, 626-38 (2005).
163. Wang, Y., Huso, D., Cahill, H., Ryugo, D. & Nathans, J. Progressive cerebellar, auditory, and esophageal dysfunction caused by targeted disruption of the frizzled-4 gene. *J Neurosci* 21, 4761-71 (2001).
164. Dufourcq, P. et al. Regulation of endothelial cell cytoskeletal reorganization by a secreted frizzled-related protein-1 and frizzled 4- and frizzled 7-dependent pathway: role in neovessel formation. *Am J Pathol* 172, 37-49 (2008).
165. Black, G. C. et al. Coats' disease of the retina (unilateral retinal telangiectasis) caused by somatic mutation in the NDP gene: a role for norrin in retinal angiogenesis. *Hum Mol Genet* 8, 2031-5 (1999).
166. Rehm, H. L. et al. Vascular defects and sensorineural deafness in a mouse model of Norrie disease. *J Neurosci* 22, 4286-92 (2002).
167. Jiao, X., Ventruto, V., Trese, M. T., Shastry, B. S. & Hejtmancik, J. F. Autosomal recessive familial exudative vitreoretinopathy is associated with mutations in LRP5. *Am J Hum Genet* 75, 878-84 (2004).
168. Toomes, C. et al. Mutations in LRP5 or FZD4 underlie the common familial exudative vitreoretinopathy locus on chromosome 11q. *Am J Hum Genet* 74, 721-30 (2004).
169. Toomes, C. et al. Spectrum and frequency of FZD4 mutations in familial exudative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 2083-90 (2004).
170. Schuback, D. E., Chen, Z. Y., Craig, I. W., Breakefield, X. O. & Sims, K. B. Mutations in the Norrie disease gene. *Hum Mutat* 5, 285-92 (1995).
171. Ohlmann, A. et al. Ectopic norrin induces growth of ocular capillaries and restores normal retinal angiogenesis in Norrie disease mutant mice. *J Neurosci* 25, 1701-10 (2005).
172. Planutis, K. et al. Regulation of norrin receptor frizzled-4 by Wnt2 in colon-derived cells. *BMC Cell Biol* 8, 12 (2007).
173. Mizuki, M. et al. Suppression of myeloid transcription factors and induction of STAT response genes by AML-specific Flt3 mutations. *Blood* 101, 3164-73 (2003).
174. Huber, A. H., Nelson, W. J. & Weis, W. I. Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell* 90, 871-82 (1997).
175. Choi, H. J., Huber, A. H. & Weis, W. I. Thermodynamics of beta-catenin-ligand interactions: the roles of the N- and C-terminal tails in modulating binding affinity. *J Biol Chem* 281, 1027-38 (2006).

176. Cox, R. T., Pai, L. M., Kirkpatrick, C., Stein, J. & Peifer, M. Roles of the C terminus of Armadillo in Wingless signaling in *Drosophila*. *Genetics* 153, 319-32 (1999).
177. Mo, R. et al. The terminal region of beta-catenin promotes stability by shielding the Armadillo repeats from the axin-scaffold destruction complex. *J Biol Chem* 284, 28222-31 (2009).
178. Takemaru, K. I. & Moon, R. T. The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression. *J Cell Biol* 149, 249-54 (2000).
179. Vlemminckx, K., Kemler, R. & Hecht, A. The C-terminal transactivation domain of beta-catenin is necessary and sufficient for signaling by the LEF-1/beta-catenin complex in *Xenopus laevis*. *Mech Dev* 81, 65-74 (1999).
180. Hecht, A., Litterst, C. M., Huber, O. & Kemler, R. Functional characterization of multiple transactivating elements in beta-catenin, some of which interact with the TATA-binding protein in vitro. *J Biol Chem* 274, 18017-25 (1999).
181. Barth, A. I., Nathke, I. S. & Nelson, W. J. Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9, 683-90 (1997).
182. McCrea, P. D. & Gumbiner, B. M. Purification of a 92-kDa cytoplasmic protein tightly associated with the cell-cell adhesion molecule E-cadherin (uvomorulin). Characterization and extractability of the protein complex from the cell cytostructure. *J Biol Chem* 266, 4514-20 (1991).
183. Ozawa, M., Baribault, H. & Kemler, R. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *Embo J* 8, 1711-7 (1989).
184. Yoshida, C. & Takeichi, M. Teratocarcinoma cell adhesion: identification of a cell-surface protein involved in calcium-dependent cell aggregation. *Cell* 28, 217-24 (1982).
185. Yoshida-Noro, C., Suzuki, N. & Takeichi, M. Molecular nature of the calcium-dependent cell-cell adhesion system in mouse teratocarcinoma and embryonic cells studied with a monoclonal antibody. *Dev Biol* 101, 19-27 (1984).
186. Cox, R. T., Kirkpatrick, C. & Peifer, M. Armadillo is required for adherens junction assembly, cell polarity, and morphogenesis during *Drosophila* embryogenesis. *J Cell Biol* 134, 133-48 (1996).
187. Pai, L. M. et al. *Drosophila* alpha-catenin and E-cadherin bind to distinct regions of *Drosophila* Armadillo. *J Biol Chem* 271, 32411-20 (1996).
188. Peifer, M., Orsulic, S., Sweeton, D. & Wieschaus, E. A role for the *Drosophila* segment polarity gene armadillo in cell adhesion and cytoskeletal integrity during oogenesis. *Development* 118, 1191-207 (1993).
189. Jho, E., Lomvardas, S. & Costantini, F. A GSK3beta phosphorylation site in axin modulates interaction with beta-catenin and Tcf-mediated gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 266, 28-35 (1999).
190. Rubinfeld, B. et al. Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* 272, 1023-6 (1996).
191. Rubinfeld, B., Tice, D. A. & Polakis, P. Axin-dependent phosphorylation of the adenomatous polyposis coli protein mediated by casein kinase 1epsilon. *J Biol Chem* 276, 39037-45 (2001).
192. Huber, A. H. & Weis, W. I. The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell* 105, 391-402 (2001).
193. Lee, M. H., Koria, P., Qu, J. & Andreadis, S. T. JNK phosphorylates beta-catenin and regulates adherens junctions. *Faseb J* 23, 3874-83 (2009).
194. Park, C. S. et al. Modulation of beta-catenin phosphorylation/degradation by cyclin-dependent kinase 2. *J Biol Chem* 279, 19592-9 (2004).
195. Bek, S. & Kemler, R. Protein kinase CKII regulates the interaction of beta-catenin with alpha-catenin and its protein stability. *J Cell Sci* 115, 4743-53 (2002).
196. Palka-Hamblin, H. L. et al. Identification of beta-catenin as a target of the intracellular tyrosine kinase PTK6. *J Cell Sci* 123, 236-45 (2010).
197. Coluccia, A. M. et al. Bcr-Abl stabilizes beta-catenin in chronic myeloid leukemia through its tyrosine phosphorylation. *Embo J* 26, 1456-66 (2007).

198. Roura, S., Miravet, S., Piedra, J., Garcia de Herreros, A. & Dunach, M. Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 274, 36734-40 (1999).
199. Du, C., Jaggi, M., Zhang, C. & Balaji, K. C. Protein kinase D1-mediated phosphorylation and subcellular localization of beta-catenin. *Cancer Res* 69, 1117-24 (2009).
200. Piedra, J. et al. p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin Interaction. *Mol Cell Biol* 23, 2287-97 (2003).
201. Wu, X. et al. Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling. *Cell* 133, 340-53 (2008).
202. Rhee, J., Buchan, T., Zukerberg, L., Lilien, J. & Balsamo, J. Cables links Robo-bound Abl kinase to N-cadherin-bound beta-catenin to mediate Slit-induced modulation of adhesion and transcription. *Nat Cell Biol* 9, 883-92 (2007).
203. Fang, D. et al. Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *J Biol Chem* 282, 11221-9 (2007).
204. Taurin, S., Sandbo, N., Qin, Y., Browning, D. & Dulin, N. O. Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 281, 9971-6 (2006).
205. Hino, S., Tanji, C., Nakayama, K. I. & Kikuchi, A. Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase stabilizes beta-catenin through inhibition of its ubiquitination. *Mol Cell Biol* 25, 9063-72 (2005).
206. Kajiguchi, T., Lee, S., Lee, M. J., Trepel, J. B. & Neckers, L. KIT regulates tyrosine phosphorylation and nuclear localization of beta-catenin in mast cell leukemia. *Leuk Res* 32, 761-70 (2008).
207. Olmeda, D., Castel, S., Vilaro, S. & Cano, A. Beta-catenin regulation during the cell cycle: implications in G2/M and apoptosis. *Mol Biol Cell* 14, 2844-60 (2003).
208. Damalas, A. et al. Excess beta-catenin promotes accumulation of transcriptionally active p53. *Embo J* 18, 3054-63 (1999).
209. Damalas, A., Kahan, S., Shtutman, M., Ben-Ze'ev, A. & Oren, M. Deregulated beta-catenin induces a p53- and ARF-dependent growth arrest and cooperates with Ras in transformation. *Embo J* 20, 4912-22 (2001).
210. Kim, K., Pang, K. M., Evans, M. & Hay, E. D. Overexpression of beta-catenin induces apoptosis independent of its transactivation function with LEF-1 or the involvement of major G1 cell cycle regulators. *Mol Biol Cell* 11, 3509-23 (2000).
211. Orford, K., Orford, C. C. & Byers, S. W. Exogenous expression of beta-catenin regulates contact inhibition, anchorage-independent growth, anoikis, and radiation-induced cell cycle arrest. *J Cell Biol* 146, 855-68 (1999).
212. Kaplan, D. D., Meigs, T. E., Kelly, P. & Casey, P. J. Identification of a role for beta-catenin in the establishment of a bipolar mitotic spindle. *J Biol Chem* 279, 10829-32 (2004).
213. Bahmanyar, S. et al. beta-Catenin is a Nek2 substrate involved in centrosome separation. *Genes Dev* 22, 91-105 (2008).
214. Huang, P., Senga, T. & Hamaguchi, M. A novel role of phospho-beta-catenin in microtubule regrowth at centrosome. *Oncogene* 26, 4357-71 (2007).
215. Arai, T. et al. Identification of beta-catenin as a novel substrate of Polo-like kinase 1. *Cell Cycle* 7, 3556-63 (2008).
216. Kuhnert, F. et al. Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 266-71 (2004).
217. Onishi, M. et al. Applications of retrovirus-mediated expression cloning. *Exp Hematol* 24, 324-9 (1996).
218. Kitamura, T. et al. Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: powerful tools in functional genomics. *Exp Hematol* 31, 1007-14 (2003).
219. Beissert, T. et al. Targeting of the N-terminal coiled coil oligomerization interface by a helix-2 peptide inhibits unmutated and imatinib-resistant BCR/ABL. *Int J Cancer* 122, 2744-52 (2008).

220. Grignani, F. et al. High-efficiency gene transfer and selection of human hematopoietic progenitor cells with a hybrid EBV/retroviral vector expressing the green fluorescence protein. *Cancer Res* 58, 14-9 (1998).
221. Greenberger, J. S., Sakakeeny, M. A., Humphries, R. K., Eaves, C. J. & Eckner, R. J. Demonstration of permanent factor-dependent multipotential (erythroid/neutrophil/basophil) hematopoietic progenitor cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 2931-5 (1983).
222. Brattain, M. G., Fine, W. D., Khaled, F. M., Thompson, J. & Brattain, D. E. Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Res* 41, 1751-6 (1981).
223. Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74 (1977).
224. Gey, G. O., Coffman, W. D. & Kubicek, M. T. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res* 12, 264-65 (1952).
225. Schneider, U., Schwenk, H. U. & Bornkamm, G. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* 19, 621-6 (1977).
226. Lozzio, C. B. & Lozzio, B. B. Cytotoxicity of a factor isolated from human spleen. *J Natl Cancer Inst* 50, 535-8 (1973).
227. Asou, H. et al. Establishment of a human acute myeloid leukemia cell line (Kasumi-1) with 8;21 chromosome translocation. *Blood* 77, 2031-6 (1991).
228. Kubonishi, I. & Miyoshi, I. Establishment of a Ph1 chromosome-positive cell line from chronic myelogenous leukemia in blast crisis. *Int J Cell Cloning* 1, 105-17 (1983).
229. Koefler, H. P. & Golde, D. W. Acute myelogenous leukemia: a human cell line responsive to colony-stimulating activity. *Science* 200, 1153-4 (1978).
230. Willert, K. et al. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423, 448-52 (2003).
231. Schonberger, J. et al. Establishment and characterization of the follicular thyroid carcinoma cell line ML-1. *J Mol Med* 78, 102-10 (2000).
232. Lange, B. et al. Growth factor requirements of childhood acute leukemia: establishment of GM-CSF-dependent cell lines. *Blood* 70, 192-9 (1987).
233. Lanotte, M. et al. NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3). *Blood* 77, 1080-6 (1991).
234. Jainchill, J. L., Aaronson, S. A. & Todaro, G. J. Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J Virol* 4, 549-53 (1969).
235. Wang, C. et al. Mast cell growth factor, a ligand for the receptor encoded by c-kit, affects the growth in culture of the blast cells of acute myeloblastic leukemia. *Leukemia* 5, 493-9 (1991).
236. Morita, S., Kojima, T. & Kitamura, T. Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* 7, 1063-6 (2000).
237. Keydar, I. et al. Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *Eur J Cancer* 15, 659-70 (1979).
238. Ponten, J. & Macintyre, E. H. Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol Microbiol Scand* 74, 465-86 (1968).
239. Sundstrom, C. & Nilsson, K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* 17, 565-77 (1976).
240. Warner, N. L., Moore, M. A. & Metcalf, D. A transplantable myelomonocytic leukemia in BALB-c mice: cytology, karyotype, and muramidase content. *J Natl Cancer Inst* 43, 963-82 (1969).
241. Orford, K., Crockett, C., Jensen, J. P., Weissman, A. M. & Byers, S. W. Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin. *J Biol Chem* 272, 24735-8 (1997).
242. Hall, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41, 95-98 (1999).
243. Landy, A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu Rev Biochem* 58, 913-49 (1989).

244. Weisberg, R. A., Enquist, L. W., Foeller, C. & Landy, A. Role for DNA homology in site-specific recombination. The isolation and characterization of a site affinity mutant of coliphage lambda. *J Mol Biol* 170, 319-42 (1983).
245. Hartley, J. L., Temple, G. F. & Brasch, M. A. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* 10, 1788-95 (2000).
246. Bernard, P. & Couturier, M. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol* 226, 735-45 (1992).
247. Miki, T., Park, J. A., Nagao, K., Murayama, N. & Horiuchi, T. Control of segregation of chromosomal DNA by sex factor F in *Escherichia coli*. Mutants of DNA gyrase subunit A suppress letD (ccdB) product growth inhibition. *J Mol Biol* 225, 39-52 (1992).
248. Lorenz, W. W., McCann, R. O., Longiaru, M. & Cormier, M. J. Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 4438-42 (1991).
249. Matthews, J. C., Hori, K. & Cormier, M. J. Substrate and substrate analogue binding properties of *Renilla* luciferase. *Biochemistry* 16, 5217-20 (1977).
250. Frohling, S. et al. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood* 100, 4372-80 (2002).
251. Kottaridis, P. D. et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* 98, 1752-9 (2001).
252. Worch, J. et al. The serine-threonine kinase MNK1 is post-translationally stabilized by PML-RARalpha and regulates differentiation of hematopoietic cells. *Oncogene* 23, 9162-72 (2004).
253. Katz, F. E., Tindle, R., Sutherland, D. R. & Greaves, M. F. Identification of a membrane glycoprotein associated with haemopoietic progenitor cells. *Leuk Res* 9, 191-8 (1985).
254. Watt, S. M. et al. Distribution and epitope analysis of the cell membrane glycoprotein (HPCA-1) associated with human hemopoietic progenitor cells. *Leukemia* 1, 417-26 (1987).
255. Civin, C. I. et al. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* 133, 157-65 (1984).
256. Simmons, D. L., Satterthwaite, A. B., Tenen, D. G. & Seed, B. Molecular cloning of a cDNA encoding CD34, a sialomucin of human hematopoietic stem cells. *J Immunol* 148, 267-71 (1992).
257. Tindle, R. W. et al. A novel monoclonal antibody BI-3C5 recognises myeloblasts and non-B non-T lymphoblasts in acute leukaemias and CGL blast crises, and reacts with immature cells in normal bone marrow. *Leuk Res* 9, 1-9 (1985).
258. Fenski, R. et al. Constitutive activation of FLT3 in acute myeloid leukaemia and its consequences for growth of 32D cells. *Br J Haematol* 108, 322-30 (2000).
259. Semenov, M. V. et al. Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr Biol* 11, 951-61 (2001).
260. Mao, B. et al. LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* 411, 321-5 (2001).
261. Lin, K. et al. The cysteine-rich frizzled domain of Frzb-1 is required and sufficient for modulation of Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11196-200 (1997).
262. Peifer, M., Sweeton, D., Casey, M. & Wieschaus, E. wingless signal and Zeste-white 3 kinase trigger opposing changes in the intracellular distribution of Armadillo. *Development* 120, 369-80 (1994).
263. Huber, O. et al. Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev* 59, 3-10 (1996).
264. Omer, C. A., Miller, P. J., Diehl, R. E. & Kral, A. M. Identification of Tcf4 residues involved in high-affinity beta-catenin binding. *Biochem Biophys Res Commun* 256, 584-90 (1999).
265. Veien, E. S., Grierson, M. J., Saund, R. S. & Dorsky, R. I. Expression pattern of zebrafish tcf7 suggests unexplored domains of Wnt/beta-catenin activity. *Dev Dyn* 233, 233-9 (2005).

266. Inge, L. J. et al. alpha-Catenin overrides Src-dependent activation of beta-catenin oncogenic signaling. *Mol Cancer Ther* 7, 1386-97 (2008).
267. Coluccia, A. M. et al. SKI-606 decreases growth and motility of colorectal cancer cells by preventing pp60(c-Src)-dependent tyrosine phosphorylation of beta-catenin and its nuclear signaling. *Cancer Res* 66, 2279-86 (2006).
268. Yost, C. et al. The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev* 10, 1443-54 (1996).
269. Hamaguchi, M. et al. p60v-src causes tyrosine phosphorylation and inactivation of the N-cadherin-catenin cell adhesion system. *Embo J* 12, 307-14 (1993).
270. Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M. & Hemmings, B. A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785-9 (1995).
271. Srivastava, A. K. & Pandey, S. K. Potential mechanism(s) involved in the regulation of glycogen synthesis by insulin. *Mol Cell Biochem* 182, 135-41 (1998).
272. Hunter, T. A tail of two src's: mutatis mutandis. *Cell* 49, 1-4 (1987).
273. Weisberg, E. et al. Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Cancer Cell* 1, 433-43 (2002).
274. Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M. & Sabatini, D. M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098-101 (2005).
275. Oakley, B. R., Oakley, C. E., Yoon, Y. & Jung, M. K. Gamma-tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in *Aspergillus nidulans*. *Cell* 61, 1289-301 (1990).
276. Stearns, T., Evans, L. & Kirschner, M. Gamma-tubulin is a highly conserved component of the centrosome. *Cell* 65, 825-36 (1991).
277. Zheng, Y., Jung, M. K. & Oakley, B. R. Gamma-tubulin is present in *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens* and is associated with the centrosome. *Cell* 65, 817-23 (1991).
278. Eidenmuller, J. et al. Phosphorylation-mimicking glutamate clusters in the proline-rich region are sufficient to simulate the functional deficiencies of hyperphosphorylated tau protein. *Biochem J* 357, 759-67 (2001).
279. Huang, W. & Erikson, R. L. Constitutive activation of Mek1 by mutation of serine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8960-3 (1994).
280. Shao, X. et al. Threonine 82 at the PDZ domain of PICK1 is critical for AMPA receptor interaction and localization. *Neurochem Int* 56, 962-70 (2010).
281. Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. & Kemler, R. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J* 16, 3797-804 (1997).
282. Bahmanyar, S., Guiney, E. L., Hatch, E. M., Nelson, W. J. & Barth, A. I. Formation of extra centrosomal structures is dependent on {beta}-catenin. *J Cell Sci* (2010).
283. Arnaud, L., Pines, J. & Nigg, E. A. GFP tagging reveals human Polo-like kinase 1 at the kinetochore/centromere region of mitotic chromosomes. *Chromosoma* 107, 424-9 (1998).
284. Murata-Hori, M., Tatsuka, M. & Wang, Y. L. Probing the dynamics and functions of aurora B kinase in living cells during mitosis and cytokinesis. *Mol Biol Cell* 13, 1099-108 (2002).
285. Schumacher, J. M., Golden, A. & Donovan, P. J. AIR-2: An Aurora/Ipl1-related protein kinase associated with chromosomes and midbody microtubules is required for polar body extrusion and cytokinesis in *Caenorhabditis elegans* embryos. *J Cell Biol* 143, 1635-46 (1998).
286. van Vugt, M. A. et al. Polo-like kinase-1 is required for bipolar spindle formation but is dispensable for anaphase promoting complex/Cdc20 activation and initiation of cytokinesis. *J Biol Chem* 279, 36841-54 (2004).
287. Lucena-Araujo, A. R. et al. High expression of AURKA and AURKB is associated with unfavorable cytogenetic abnormalities and high white blood cell count in patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Res* (2010).

288. Renner, A. G. et al. Polo-like kinase 1 is overexpressed in acute myeloid leukemia and its inhibition preferentially targets the proliferation of leukemic cells. *Blood* 114, 659-62 (2009).
289. Fu, J., Bian, M., Jiang, Q. & Zhang, C. Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Mol Cancer Res* 5, 1-10 (2007).
290. Whitfield, M. L. et al. Identification of genes periodically expressed in the human cell cycle and their expression in tumors. *Mol Biol Cell* 13, 1977-2000 (2002).
291. Crosio, C. et al. Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases. *Mol Cell Biol* 22, 874-85 (2002).
292. Giet, R. & Glover, D. M. Drosophila aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis. *J Cell Biol* 152, 669-82 (2001).
293. Hsu, J. Y. et al. Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* 102, 279-91 (2000).
294. Murnion, M. E. et al. Chromatin-associated protein phosphatase 1 regulates aurora-B and histone H3 phosphorylation. *J Biol Chem* 276, 26656-65 (2001).
295. Ron, D. et al. Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 839-43 (1994).
296. Goncalves, K. A. et al. Solution structure of the human signaling protein RACK1. *BMC Struct Biol* 10, 15 (2010).
297. Reya, T. & Clevers, H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434, 843-50 (2005).
298. Majeti, R. et al. Dysregulated gene expression networks in human acute myelogenous leukemia stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3396-401 (2009).
299. Serinsoz, E. et al. Aberrant expression of beta-catenin discriminates acute myeloid leukaemia from acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 126, 313-9 (2004).
300. Chen, C. C. et al. Prognostic significance of beta-catenin and topoisomerase IIalpha in de novo acute myeloid leukemia. *Am J Hematol* 84, 87-92 (2009).
301. Xu, J. et al. Clinical significance of nuclear non-phosphorylated beta-catenin in acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 140, 394-401 (2008).
302. Ysebaert, L. et al. Expression of beta-catenin by acute myeloid leukemia cells predicts enhanced clonogenic capacities and poor prognosis. *Leukemia* 20, 1211-6 (2006).
303. Robitaille, J. et al. Mutant frizzled-4 disrupts retinal angiogenesis in familial exudative vitreoretinopathy. *Nat Genet* 32, 326-30 (2002).
304. Khan, N. I., Bradstock, K. F. & Bendall, L. J. Activation of Wnt/beta-catenin pathway mediates growth and survival in B-cell progenitor acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 138, 338-48 (2007).
305. Lu, D. et al. Activation of the Wnt signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3118-23 (2004).
306. Wu, Q. L., Zierold, C. & Ranheim, E. A. Dysregulation of Frizzled 6 is a critical component of B-cell leukemogenesis in a mouse model of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 113, 3031-9 (2009).
307. Gupta, S. et al. FZD4 as a mediator of ERG oncogene-induced WNT signaling and epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells. *Cancer Res* 70, 6735-45 (2010).
308. Vidal, O. M. et al. In vivo transcript profiling and phylogenetic analysis identifies suppressor of cytokine signaling 2 as a direct signal transducer and activator of transcription 5b target in liver. *Mol Endocrinol* 21, 293-311 (2007).
309. Colmone, A. et al. Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science* 322, 1861-5 (2008).
310. Fiskus, W. et al. Combined epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A and the histone deacetylase inhibitor panobinostat against human AML cells. *Blood* 114, 2733-43 (2009).
311. Corrigan, P. M., Dobbin, E., Freeburn, R. W. & Wheadon, H. Patterns of Wnt/Fzd/LRP gene expression during embryonic hematopoiesis. *Stem Cells Dev* 18, 759-72 (2009).

312. Zhong, J. F. et al. Gene expression profile of murine long-term reconstituting vs. short-term reconstituting hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2448-53 (2005).
313. Miller, B. G. & Stamatoyannopoulos, J. A. Integrative meta-analysis of differential gene expression in acute myeloid leukemia. *PLoS One* 5, e9466 (2010).
314. Stirewalt, D. L. et al. Identification of genes with abnormal expression changes in acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 47, 8-20 (2008).
315. Wong, G. T., Gavin, B. J. & McMahon, A. P. Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes. *Mol Cell Biol* 14, 6278-86 (1994).
316. Torres, M. A. et al. Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early *Xenopus* development. *J Cell Biol* 133, 1123-37 (1996).
317. Topol, L. et al. Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation. *J Cell Biol* 162, 899-908 (2003).
318. Westfall, T. A. et al. Wnt-5/pipetail functions in vertebrate axis formation as a negative regulator of Wnt/beta-catenin activity. *J Cell Biol* 162, 889-98 (2003).
319. Yuzugullu, H. et al. Canonical Wnt signaling is antagonized by noncanonical Wnt5a in hepatocellular carcinoma cells. *Mol Cancer* 8, 90 (2009).
320. Nemeth, M. J., Topol, L., Anderson, S. M., Yang, Y. & Bodine, D. M. Wnt5a inhibits canonical Wnt signaling in hematopoietic stem cells and enhances repopulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15436-41 (2007).
321. Tu, X. et al. Noncanonical Wnt signaling through G protein-linked PKCdelta activation promotes bone formation. *Dev Cell* 12, 113-27 (2007).
322. Kuhl, M., Sheldahl, L. C., Malbon, C. C. & Moon, R. T. Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*. *J Biol Chem* 275, 12701-11 (2000).
323. Kremenevskaja, N. et al. Wnt-5a has tumor suppressor activity in thyroid carcinoma. *Oncogene* 24, 2144-54 (2005).
324. Liang, H. et al. Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue. *Cancer Cell* 4, 349-60 (2003).
325. Martin, V. et al. Epigenetic regulation of the non-canonical Wnt pathway in acute myeloid leukemia. *Cancer Sci* 101, 425-32 (2010).
326. Roman-Gomez, J. et al. WNT5A, a putative tumour suppressor of lymphoid malignancies, is inactivated by aberrant methylation in acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Cancer* 43, 2736-46 (2007).
327. Ying, J. et al. WNT5A exhibits tumor-suppressive activity through antagonizing the Wnt/beta-catenin signaling, and is frequently methylated in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 14, 55-61 (2008).
328. Vaziri, H. et al. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* 107, 149-59 (2001).
329. Imai, S., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M. & Guarente, L. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403, 795-800 (2000).
330. Alcendor, R. R., Kirshenbaum, L. A., Imai, S., Vatner, S. F. & Sadoshima, J. Silent information regulator 2alpha, a longevity factor and class III histone deacetylase, is an essential endogenous apoptosis inhibitor in cardiac myocytes. *Circ Res* 95, 971-80 (2004).
331. Chua, K. F. et al. Mammalian SIRT1 limits replicative life span in response to chronic genotoxic stress. *Cell Metab* 2, 67-76 (2005).
332. Luo, J. et al. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* 107, 137-48 (2001).
333. Pillai, J. B., Isbatan, A., Imai, S. & Gupta, M. P. Poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cardiac myocyte cell death during heart failure is mediated by NAD<sup>+</sup> depletion and reduced Sir2alpha deacetylase activity. *J Biol Chem* 280, 43121-30 (2005).

334. Cheng, H. L. et al. Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10794-9 (2003).
335. McBurney, M. W. et al. The mammalian SIR2alpha protein has a role in embryogenesis and gametogenesis. *Mol Cell Biol* 23, 38-54 (2003).
336. Alcendor, R. R. et al. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ Res* 100, 1512-21 (2007).
337. Han, L. et al. Inactivation of PI3K/AKT signaling inhibits glioma cell growth through modulation of beta-catenin-mediated transcription. *Brain Res* 1366, 9-17 (2010).
338. Kim, M. S. et al. Neurofilament heavy polypeptide regulates the Akt-beta-catenin pathway in human esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS One* 5, e9003 (2010).
339. Staal, F. J., Noort Mv, M., Strous, G. J. & Clevers, H. C. Wnt signals are transmitted through N-terminally dephosphorylated beta-catenin. *EMBO Rep* 3, 63-8 (2002).
340. Sadot, E. et al. Regulation of S33/S37 phosphorylated beta-catenin in normal and transformed cells. *J Cell Sci* 115, 2771-80 (2002).
341. Brembeck, F. H., Rosario, M. & Birchmeier, W. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev* 16, 51-9 (2006).
342. Kaidi, A., Williams, A. C. & Paraskeva, C. Interaction between beta-catenin and HIF-1 promotes cellular adaptation to hypoxia. *Nat Cell Biol* 9, 210-7 (2007).
343. Hadjihannas, M. V., Bruckner, M. & Behrens, J. Conductin/axin2 and Wnt signalling regulates centrosome cohesion. *EMBO Rep* 11, 317-24 (2010).
344. Adams, R. R. et al. INCENP binds the Aurora-related kinase AIRK2 and is required to target it to chromosomes, the central spindle and cleavage furrow. *Curr Biol* 10, 1075-8 (2000).
345. Terada, Y. et al. AIM-1: a mammalian midbody-associated protein required for cytokinesis. *Embo J* 17, 667-76 (1998).
346. Cooke, C. A., Heck, M. M. & Earnshaw, W. C. The inner centromere protein (INCENP) antigens: movement from inner centromere to midbody during mitosis. *J Cell Biol* 105, 2053-67 (1987).
347. Kim, J. H., Kang, J. S. & Chan, C. S. Sli15 associates with the ipl1 protein kinase to promote proper chromosome segregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 145, 1381-94 (1999).
348. Skoufias, D. A., Mollinari, C., Lacroix, F. B. & Margolis, R. L. Human survivin is a kinetochore-associated passenger protein. *J Cell Biol* 151, 1575-82 (2000).
349. Gassmann, R. et al. Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. *J Cell Biol* 166, 179-91 (2004).
350. Bishop, J. D. & Schumacher, J. M. Phosphorylation of the carboxyl terminus of inner centromere protein (INCENP) by the Aurora B Kinase stimulates Aurora B kinase activity. *J Biol Chem* 277, 27577-80 (2002).
351. Jelluma, N. et al. Mps1 phosphorylates Borealin to control Aurora B activity and chromosome alignment. *Cell* 132, 233-46 (2008).
352. Sessa, F. et al. Mechanism of Aurora B activation by INCENP and inhibition by hesperadin. *Mol Cell* 18, 379-91 (2005).
353. Vader, G., Kauw, J. J., Medema, R. H. & Lens, S. M. Survivin mediates targeting of the chromosomal passenger complex to the centromere and midbody. *EMBO Rep* 7, 85-92 (2006).
354. Ruchaud, S., Carmena, M. & Earnshaw, W. C. Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 798-812 (2007).
355. Guse, A., Mishima, M. & Glotzer, M. Phosphorylation of ZEN-4/MKLP1 by aurora B regulates completion of cytokinesis. *Curr Biol* 15, 778-86 (2005).
356. Kim, H. J., Kwon, H. R., Bae, C. D., Park, J. & Hong, K. U. Specific primary sequence requirements for Aurora B kinase-mediated phosphorylation and subcellular localization of TMAP during mitosis. *Cell Cycle* 9 (2010).
357. Meraldi, P., Honda, R. & Nigg, E. A. Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility. *Curr Opin Genet Dev* 14, 29-36 (2004).

358. Chong, Y. P., Ia, K. K., Mulhern, T. D. & Cheng, H. C. Endogenous and synthetic inhibitors of the Src-family protein tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta* 1754, 210-20 (2005).
359. Liu, Y. V. & Semenza, G. L. RACK1 vs. HSP90: competition for HIF-1 alpha degradation vs. stabilization. *Cell Cycle* 6, 656-9 (2007).
360. Mochly-Rosen, D., Smith, B. L., Chen, C. H., Disatnik, M. H. & Ron, D. Interaction of protein kinase C with RACK1, a receptor for activated C-kinase: a role in beta protein kinase C mediated signal transduction. *Biochem Soc Trans* 23, 596-600 (1995).
361. Nilsson, J., Sengupta, J., Frank, J. & Nissen, P. Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: a platform for signalling molecules on the ribosome. *EMBO Rep* 5, 1137-41 (2004).
362. Ai, E., Poole, D. S. & Skop, A. R. RACK-1 directs dynactin-dependent RAB-11 endosomal recycling during mitosis in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 20, 1629-38 (2009).
363. Skop, A. R., Liu, H., Yates, J., 3<sup>rd</sup>, Meyer, B. J. & Heald, R. Dissection of the mammalian midbody proteome reveals conserved cytokinesis mechanisms. *Science* 305, 61-6 (2004).
364. Davidson, G. et al. Cell cycle control of wnt receptor activation. *Dev Cell* 17, 788-99 (2009).
365. Izumi, N., Fumoto, K., Izumi, S. & Kikuchi, A. GSK-3beta regulates proper mitotic spindle formation in cooperation with a component of the gamma-tubulin ring complex, GCP5. *J Biol Chem* 283, 12981-91 (2008).
366. Kikuchi, K., Niikura, Y., Kitagawa, K. & Kikuchi, A. Dishevelled, a Wnt signalling component, is involved in mitotic progression in cooperation with Plk1. *Embo J* 29, 3470-83 (2010).
367. Nair, J. S., de Stanchina, E. & Schwartz, G. K. The topoisomerase I poison CPT-11 enhances the effect of the aurora B kinase inhibitor AZD1152 both in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 15, 2022-30 (2009).
368. Oke, A. et al. AZD1152 rapidly and negatively affects the growth and survival of human acute myeloid leukemia cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 69, 4150-8 (2009).
369. Yang, J. et al. AZD1152, a novel and selective aurora B kinase inhibitor, induces growth arrest, apoptosis, and sensitization for tubulin depolymerizing agent or topoisomerase II inhibitor in human acute leukemia cells in vitro and in vivo. *Blood* 110, 2034-40 (2007).
370. Nguyen, H. G., Chinnappan, D., Urano, T. & Ravid, K. Mechanism of Aurora-B degradation and its dependency on intact KEN and A-boxes: identification of an aneuploidy-promoting property. *Mol Cell Biol* 25, 4977-92 (2005).
371. Ota, T. et al. Increased mitotic phosphorylation of histone H3 attributable to AIM-1/Aurora-B overexpression contributes to chromosome number instability. *Cancer Res* 62, 5168-77 (2002).
372. Smith, S. L. et al. Overexpression of aurora B kinase (AURKB) in primary non-small cell lung carcinoma is frequent, generally driven from one allele, and correlates with the level of genetic instability. *Br J Cancer* 93, 719-29 (2005).
373. Hiddemann, W., Wormann, B., Gohde, W. & Buchner, T. DNA aneuploidies in adult patients with acute myeloid leukemia. Incidence and relation to patient characteristics and morphologic subtypes. *Cancer* 57, 2146-52 (1986).
374. Vidriales, M. B. et al. DNA aneuploidy in acute myeloblastic leukemia is associated with a high expression of lymphoid markers. *Cytometry* 22, 22-5 (1995).
375. Beyer, V. et al. Polysomy 8 defines a clinico-cytogenetic entity representing a subset of myeloid hematologic malignancies associated with a poor prognosis: report on a cohort of 12 patients and review of 105 published cases. *Cancer Genet Cytogenet* 160, 97-119 (2005).
376. Choi, J. et al. Prognostic significance of trisomy 6 in an adult acute myeloid leukemia with t(8;21). *Cancer Genet Cytogenet* 202, 141-3 (2010).
377. Gupta, V., Minden, M. D., Yi, Q. L., Brandwein, J. & Chun, K. Prognostic significance of trisomy 4 as the sole cytogenetic abnormality in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 27, 983-91 (2003).
378. Paulsson, K. & Johansson, B. Trisomy 8 as the sole chromosomal aberration in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Pathol Biol (Paris)* 55, 37-48 (2007).
379. Bonnet, D. & Dick, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3, 730-7 (1997).

380. Lapidot, T. et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 645-8 (1994).
381. Gong, Y., Mo, C. & Fraser, S. E. Planar cell polarity signalling controls cell division orientation during zebrafish gastrulation. *Nature* 430, 689-93 (2004).
382. Hardin, J. & King, R. S. The long and the short of Wnt signaling in *C. elegans*. *Curr Opin Genet Dev* 18, 362-7 (2008).
383. Mizumoto, K. & Sawa, H. Cortical beta-catenin and APC regulate asymmetric nuclear beta-catenin localization during asymmetric cell division in *C. elegans*. *Dev Cell* 12, 287-99 (2007).
384. Wikramanayake, A. H. et al. An ancient role for nuclear beta-catenin in the evolution of axial polarity and germ layer segregation. *Nature* 426, 446-50 (2003).

# 9. ANHANG

1. ABKÜRZUNGEN
2. DANKSAGUNG
3. CURRICULUM VITAE



# ABKÜRZUNGEN

A	Adenin
A	Alanin
ABL	<i>Abelson</i>
ACD	asymmetrische Zellteilung
AF4	<i>ALL1-fused gene from chromosome 4 protein</i>
AIM1	Aurora Kinase B
AK	Antikörper
ALL	Illaria lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
AML1	<i>acute myeloid leukemia 1 protein</i>
APAAP	Alkalische Phosphatase anti-Alkalische Phosphatase
APC	Adenomatöses Polyposis Coli
APL	Illaria promyelozytäre Leukämie
Arm	Armadillo Region
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
B-ALL	B-lymphoblastische Leukämie
BCA	Bicinchoninsäure
BCR	<i>breakpoint cluster region</i>
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
BSD	Blasticidin
C	Cytosin
C/EBP $\alpha$	<i>CCAAT/enhancer binding protein <math>\alpha</math></i>
CAPZ $\alpha$ 2	<i>capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 2</i>
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CBF	<i>core binding factor</i>
CBP	<i>CREB-binding protein</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDK2	Cyclin abhängige Kinase 2
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDS	kodierende Sequenz
CK	Casein Kinase
CLL	chronische lymphatische Leukämie

CML	chronische IVariablen Leukämie
CMV	Cytomegalie Virus
CPC	<i>chromosomal passenger complex</i>
CRD	cysteinreiche Domäne
CSF1	<i>colony-stimulating factor 1</i>
CTBP	<i>c-terminal binding protein</i>
CTNNB1	β-Catenin
D	Aspartat
DIX	Dishevelled und Axin
DKK	Dickkopf
DMSO	Dimethylsulfoxid
dn	dominant negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2-Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOC	<i>deoxycholic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
DVL	Dishevelled
E	Glutamat
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>enhanced grün fluoreszierendes Protein</i>
EGTA	Ethylendioxy-bis(ethylnitrilo)-tetraessigsäure
ETO	<i>eighty-twenty-one</i>
FAB	<i>French-American-British</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> , Durchflußzytometrie
FAM	6-Carboxyfluorescein
FCS	Fötales Kälberserum
FEVR	IVariable exsudative Vitreoretinopathie
FL	FLT3 Ligand
FLT3	<i>FMS-like tyrosine kinase 3</i>
fw	<i>forward</i>
FZD	Frizzled
G	Guanosin
GA	Gewebearray
GAB2	<i>GRB2-associated binding protein 2</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GIST	gastrointestinaler Stromatumor
GRB2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
GSK3	Glycogen Synthase Kinase
GST	Glutathion-S-Transferase
HBA	Hämoglobin α2
HDAC	Histondeacetylase

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF1 $\alpha$	<i>hypoxia induced factor 1<math>\alpha</math></i>
HMG	<i>high mobility group</i>
HP1 $\alpha$	Heterochromatinprotein 1 $\alpha$
HRP	Meerrettich Peroxidase
HSC	hämatopoetische Stammzelle
IB	Immunoblot
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IL3	Interleukin 3
IL6	Interleukin 6
INCENP	<i>inner centromer protein</i>
inv	Inversion
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalacto-pyranosid
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
ITD	interne Tandemduplikation
JAK	Janus Kinase
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i>
K	Kontrolle
K	Lysin
kb	Kilobasenpaare
KM	Knochenmark
L	Leucin
LEF	<i>lymphoid enhancer factor</i>
LK	Ladekontrolle
LRP	<i>low-density-lipoprotein receptor-related protein</i>
LSC	leukämische Stammzelle
LTR	<i>long terminal repeat</i>
LV	Leervektor
MAPK	mitogenaktivierte Protein Kinase
MCSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MLL	<i>mixed lineage leukemia protein-1</i>
MMLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MPSV	<i>myeloproliferative sarcoma virus</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MVB	<i>multivesicular body</i>
MYH11	<i>myosin, heavy chain 11</i>
N	Anzahl der Stichproben
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NBM	normales Knochenmark
NGFR	<i>nerve growth factor receptor</i>

NLS	<i>nuclear localization signal</i>
NPM1	Nukleophosmin 1
OD	optische Dichte
P	Prolin
p	Wahrscheinlichkeit
P, p	Phosphatgruppe, phospho-
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCMV	<i>PCC4-cell-passaged myeloproliferative sarcoma virus</i>
PCP	<i>planar cell polarity</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD	Pull-down
PDGFR	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>
PDZ	<i>PDS, disc-large and Z01</i>
PE	Phycoerythrin
pH	negativer, dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B, Akt
PKD1	Proteinkinase D1
PLK1	<i>Polo-like kinase 1</i>
PMFS	Phenylmethylsulfonylfluorid
PML	<i>promyelocytic leukemia protein</i>
PTK	Protein Tyrosin Kinase
R	Arginin
Rack1	<i>receptor for activated C-kinase 1</i>
RAR $\alpha$	Retinolsäurerezeptor $\alpha$
RAS	<i>rat sarcoma</i>
rev	<i>reverse</i>
RhoGDI $\beta$	<i>Rho GDP dissociation inhibitor <math>\beta</math></i>
Ripa	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
RK	Reaktionskontrolle
RNA	Ribonukleinsäure
RPB2	RNA Polymerase II, Polypeptid B
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RTKIII	Rezeptortyrosinkinase der Klasse III
S	Serin
SALL4	<i>sal-like 4</i>
SCF	Stammzellfaktor
SDS	Natriumdodecylsulfat
sFRP	<i>secreted Frizzled-related protein</i>
SHP2	<i>SH2-containing protein tyrosine phosphatase 2</i>
Sirt1	Sirtuin 1

Src	<i>Rous sarcoma</i>
StAbw	Standardabweichung
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
t	Translokation
T	Thymin
T	Threonin
TADB	<i>Tris assay dilution buffer</i>
TAE	Tris Acetat EDTA
TAMRA	6-Carboxytetramethyl-Rhodamin
TBE	TCF bindendes Element
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TCF	<i>T-cell factor</i>
TKD	Tyrosinkinasedomäne
TLE	<i>Transducin-like enhancer of split</i>
TNT	<i>in vitro</i> Transkription und Translation
Ub	Ubiquitin
UDG	Uracil N-Glycosylase
V	Valin
v/v	Volumenprozent
v/w	Gewichtsprozent
W	Tryptophan
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WIF1	<i>Wnt inhibitory factor 1</i>
WNT	<i>wingless/INT-1</i>
wt	Wildtyp
x	VIIvariable Aminosäurerest
Y, Tyr	Tyrosin
$\beta$ -TRCP	<i><math>\beta</math>-transducin repeat containing protein</i>
$\Delta$ NGFR	<i>Trunkierter nerve growth factor receptor</i>



# DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich noch kurz allen lieben Menschen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, mich unterstützt und manchmal auch ertragen haben:

- ... meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Dierks für die Übernahme des Referats und die Betreuung aus dem fernen Bielefeld
- ... Prof. Dr. Hubert Serve für die Möglichkeit, diese Dissertation in seiner Gruppe zu schreiben, für die Chance, an diesem spannenden Thema auch in Frankfurt weiterarbeiten zu können, für die Übernahme des Koreferats und sein Vertrauen in meine Fähigkeiten
- ... Prof. Dr. Lara Tickenbrock für die Betreuung und die hilfreiche Anleitung in den Anfängen, das Schreiben der Publikationen und ihre andauernde Unterstützung meiner vielen Projekte
- ... Prof. Dr. Carsten Müller-Tidow aus der alten Arbeitsgruppe in Münster für die Bereitstellung der Microarraydaten und seine stete Diskussionsbereitschaft
- ... Prof. Dr. Horst Bürger für die Hilfe bei der Erstellung, Färbung und Auswertung der Gewebearrays
- ... Marion Baas für die tolle Zeit an der gemeinsamen Bench, für die lustigen Tagträumereien von unserer WG in Erlangen und besonders für ihre technische Hilfe beim FZD und KIT Projekt
- ... Anita und Olesya, die mir in Frankfurt stets mit Rat und Tat zur Seite standen (während der Arbeit und danach), für das Korrekturlesen und die schöne Zeit, die wir hoffentlich auch weiterhin haben werden
- ... Frank S. und Özlem für noch mehr Korrekturlesen
- ... meinen Weggefährten Maike und Pavan, den Freunden aus Münster (Stephan, Shanti, Niklas, Fabienne, Mirle ...) sowie allen lieben, neuen Kollegen und Freunden (Christoph, Tanja, Saskia, Franzi, Jule, Elli ...) für den stetigen Erfahrungsaustausch, das gemeinsame Wachsen an den gestellten Aufgaben und die Zerstreung zwischendurch
- ... meiner Familie, die immer an mich geglaubt, mich unterstützt und motiviert hat, auch wenn's manchmal schwer war
- ... und abschließend Thomas ... für einfach alles!



# CURRICULUM VITAE

## PERSÖNLICHE DATEN

---

Name	Sina Hehn
Geburtstag	09. Oktober 1979
Geburtsort	Soltau (Niedersachsen)
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

## BILDUNG

---

09/2005 - Gegenwart	wissenschaftliche Mitarbeiterin, Bearbeitung der vorliegenden Doktorarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. med. Hubert Serve  09/2005 - 10/2007 am Universitätsklinikum Münster, Medizinische Klinik A, Hämatologie/Onkologie  seit 11/2007 am Universitätsklinikum Frankfurt/Main, Zentrum der inneren Medizin, Medizinische Klinik II, Hämatologie/Onkologie
11/2004 - 07/2005	Diplomarbeit am Universitätsklinikum Münster, Medizinische Klinik A, Bereich Hämatologie/Onkologie unter Anleitung von Prof. Dr. med. Hubert Serve, Titel:  „Der kanonikale Wnt-Signalweg und das zentrale Oncoprotein $\beta$ -Catenin in der Hämatopoese und der Leukämie“
10/1999 - 07/2005	Studium der Biochemie an der Universität Bielefeld mit Abschluß Diplom
06/1999	Allgemeine Hochschulreife am Gymnasium Munster

**TÄTIGKEITEN UND PRAKTIKA**

---

- 01/2003 - 01/2004                      Studentische Hilfskraft in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jürgen Wienands, Biochemie I, Universität Bielefeld
- 09/1999                                      Praktikum am Wehrwissenschaftliches Institut für Schutztechnologien- ABC-Schutz, Fachgruppe Biologie, Munster

**POSTERBEITRÄGE UND PUBLIKATIONEN**

---

Posterbeiträge:

**Hehn S**, Tickenbrock L, Steffen B, Müller-Tidow C, Serve H. "Aurora Kinase B induced  $\beta$ -catenin phosphorylation in the mitosis of normal and leukemic hematopoietic cells" (Poster), XVII Wilsede Meeting "Modern Trends in Human Leukemia", Wilsede, Deutschland (14.-18.06.2008).

**Hehn S**, Tickenbrock L, Berdel WE, Müller-Tidow C, Serve H. "Identification of new interaction partners for beta-Catenin in the human hematopoietic system" (Poster), 8<sup>th</sup> Young Scientists Meeting of the DGZ „Cell Biology of Cancer“, Heidelberg, Deutschland (21.-23.09.2006).

Publikationen:

Gueller S, **Hehn S**, Nowak V, Gery S, Serve H, Brandts CH, Koeffler HP. Adaptor protein Lnk binds to PDGF receptor and inhibits PDGF-dependent signaling. *Exp Hematol*. 2011 Feb 7. [Epub ahead of print]

Steffen B, Knop M, Bergholz U, Vakhrusheva O, Rode M, Kohler G, Henrichs MP, Bulk E, **Hehn S**, Stehling M, Dugas M, Baumer N, Tschanter P, Brandts C, Koschmieder S, Berdel WE, Serve H, Stocking C, Muller-Tidow C. AML1/ETO induces self-renewal in hematopoietic progenitor cells via the groucho related amino-terminal enhancer of split (AES) protein. *Blood*. 2011 Jan 25. [Epub ahead of print]

Yu J, Muller H, **Hehn S**, Koschmieder S, Schonig K, Berdel WE, Serve H, Muller-Tidow C. Construction and application of an inducible system for homogenous expression levels in bulk cell lines. *PLoS One*. 2009 Jul 30;4(7):e6445.

Tickenbrock L, **Hehn S**, Sargin B, Choudhary C, Baumer N, Buerger H, Schulte B, Muller O, Berdel WE, Muller-Tidow C, Serve H. Activation of Wnt signalling in acute myeloid leukemia by induction of Frizzled-4. *Int J Oncol*. 2008 Dec;33(6):1215-21.

Tickenbrock L, **Hehn S**, Sargin B, Evers G, Ng PR, Choudhary C, Berdel WE, Muller-Tidow C, Serve H. Activation of Wnt signaling in cKit-ITD mediated transformation and imatinib sensitivity in acute myeloid leukemia. *Int J Hematol*. 2008 Sep;88(2):174-80.

Tickenbrock L, Schwable J, Strey A, Sargin B, **Hehn S**, Baas M, Choudhary C, Gerke V, Berdel WE, Muller-Tidow C, Serve H. Wnt signaling regulates transendothelial migration of monocytes. *J Leukoc Biol*. 2006 Jun;79(6):1306-13.