Universitätsklinikum Ulm

Klinik für Kinder- und Jugendmedizin

Ärztlicher Direktor Prof. Dr. K.-M. Debatin

Die Bedeutung phosphorylisierter Signaltransduktionsproteine in der akuten pädiatrischen lymphoblastischen Leukämie

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Hannah Kunze

geboren in Günzburg

2016

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: PD. Dr. Lüder Hinrich Meyer
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Leopold Ludwig

Tag der Promotion: 07.07.2016

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis ..... **I**
Abkürzungsverzeichnis ..... **III**
1 Einleitung und Zielsetzung dieser Arbeit **1**
2 Material und Methoden **6**
2.1 Material 6
2.1.1 Geräte 6
2.1.2 Verbrauchsgegenstände und –materialien 7
2.1.3 Chemikalien 7
2.1.4 Stimulanzien 8
2.1.5 Antikörper 9
2.1.6 Lösungen und Puffer 10
2.1.7 Zelllinien 10
2.1.8 NOD/SCID-Maus-Xenotransplantationsmodell 11
2.1.9 Periphere Lymphozyten 12
2.1.10 Software 12
2.2 Methoden 13
2.2.1 Zellbiologische Arbeitstechniken 13
2.2.1.1 Zellkultur 13
2.2.1.2 Kryokonservieren von Zellen 13
2.2.1.3 DAPI-Routinefärbung zum Nachweis von Mykoplasmen 13
2.2.1.4 Isolierung der peripheren Lymphozyten mittels der Dichtegradienten-Zentrifugation 14
2.2.1.5 Isolierung der primären Leukämiezellen mittels der Dichtegradienten-Zentrifugation 15
2.2.2 Grundlagen der Durchflusszytometrie 15
2.2.3 Leukämietypisierung 16
2.2.4 Versuche 19
2.2.4.1 Durchflusszytometrische Messung der Phosphoepitope in Vorläufer-Leukämiezelllinien 19
2.2.4.2 Durchflusszytometrische Messung der Phosphoepitope in peripheren Lymphozyten und primären Leukämiezellen aus dem NOD/SCID-Maus-Xenotransplantationsmodell 20
2.2.5 Darstellung der Ergebnisse 21
2.2.6 Statistische Analyse 22

3 Ergebnisse 23

3.1 Aktivität der Signaltransduktionswege in peripheren Lymphozyten und in Vorläufer-Leukämiezelllinien 23

3.2 Vergleich der aktivierten Signaltransduktionswege zwischen Leukämiezellen und peripheren Lymphozyten 27

3.3 Analyse von Phosphorylierungsmustern bei den primären-B-Vorläufer-ALL-Zellen 29

4 Diskussion 36

5 Zusammenfassung 48

6 Literaturverzeichnis 50

Danksagung 74

Lebenslauf 75

Abkürzungsverzeichnis

AIEOP-BFM	it.: „Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica“, italienischer Verband für pädiatrische hämatologische Onkologie und Berlin-Frankfurt-Münster Behandlungsstudie
ALL	akute lymphoblastische Leukämie
AML	akute myeloischen Leukämie
AT	Adenosin-Thymidin Nukleosid
BCP-ALL	engl.: „B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia“, B-Zell-Vorläufer akute lymphoblastische Leukämie
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	engl.: „cluster of differentiation“, Nomenklatur der Oberflächenstruktur von Zellen
CO_2	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4′, 6-Diamidino-2-Phenylindol
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DMSO	Dimethylsulfoxid
ERK1/2	extrazellulär regulierte Signal-Kinase ½
FACS	engl.: „fluorescence-activated cell sorting“, Methode zur fluoreszenzaktivierten Zellanalyse
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	engl.: „forward scatter“, Vorwärtsstreulicht
G-CSF	engl.: „Granulocyte-Colony Stimulating Factor“, Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GlyA	Glycerin A
HBSS	engl.: „hank´s balanced salt solution“, eine ausgeglichene Salzlösung
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-N-Ethansulfonsäure
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KCl	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumhydrogenphosphat
JNK	c-Jun-NH2-Terminal-Kinase
JAK	Januskinase

MAP-Kinase	Mitogen-aktivierende Protein-Kinase
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MPO	Myeloperoxidase
MRD-Messung	engl.: „minimal residual disease“, Resterkrankung im submikroskopischen Bereich
NaCl	Natriumchlorid
NaH_3	Natriumazid
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenphosphat
NOD/SCID	engl.: „Non-Obese Diabetic/severe combined immunodeficiency”, Nicht-fettleibiger-diabetischer-Typ/schwere kombinierte Immundefizienz
p38	Protein des Mitogen aktivierten Proteinkinase Signalweg
PBS	engl.: „Dulbecco´s phosphate buffered saline”, phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Azetat
Raf	Ras-aktivierender-Faktor
Ras-Onkogen	engl.: „rat sarcoma proto oncogene”, Protoonkogen
PBMC	engl.: „peripheral blood mononuclear cell”, periphere mononukleäre Blutzelle
Rpm	engl.: „revolutions per minute“, Umdrehungen pro Minute
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium, Hydrogencarbonatpuffersystem basierend auf einer Lösung von Glucose, Aminosäuren, Salzen und Vitaminen
SSC	engl.: „sideward scatter“, Seitwärtsstreulicht
STAT	engl.: „signal transducers and activators of transcription”, Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
TdT	Terminale Desoxyribonukleotidyltransferase
TTL	engl.: „time to leukemia“, Zeit von der Transplantation bis zur Entwicklung der Leukämie im NOD/SCID-Maus-Xenotransplantationsmodell
Vv.	Vorverdünnung
WBC	engl.: „white blood cell count“, Anzahl von weißen Blutzellen

1 Einleitung und Zielsetzung dieser Arbeit

Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) ist mit 30,6 % aller bösartigen Neubildungen die häufigste maligne Erkrankung im Kindes- und Jugendalter (Deutsches Kinderkrebsregister, Jahresbericht 2015) (Kaatsch, 2010). Die Heilungsrate der pädiatrischen ALL konnte in den vergangenen Jahrzehnten auf über 80 % gesteigert werden und ist eine große Erfolgsgeschichte innerhalb der klinischen Tumorforschung (Conter et al., 2010) (Hunger et al., 2012) (Moricke et al., 2010) (Schrappe et al., 2000a) (Schrappe et al., 2000b) (Silverman et al., 2001) (Stary et al., 2014). Zu verdanken ist dieser Erfolg der Therapieoptimierung durch internationale kooperative Behandlungsprotokolle (Gaynon et al., 1997) (Moricke et al., 2010) (Pui et al., 2004) (Pui et al., 2010) (Reiter et al., 1994). Die Anpassung der Therapiemodalitäten in der aktuellen internationalen Studie AIEOP-BFM ALL 2009 (it.: „Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica“, italienischer Verband für pädiatrische hämatologische Onkologie und Berlin-Frankfurt-Münster Behandlungsstudie) erfolgt anhand von Risikomerkmalen, wie zum Beispiel dem Ansprechen auf Prednison, dem Erreichen der Remission, der minimalen Resterkrankung (MRD= engl.: „minimal residual disease“), sowie molekularer/chromosomaler Aberrationen (Conter et al., 2010) (Flohr et al., 2008) (Moricke et al., 2008) (Pui et al., 2003) (Stary et al., 2014) (Teachey and Hunger, 2013) (http://www.bfm-international.org/Common%20guidelines%20for%20diagnostic%20approaches%20to%20leukemias.pdf).

Trotz der gesteigerten Heilungsrate erleiden immer noch 20 % der Patienten ein Rezidiv ihrer Erkrankung, was mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Bhojwani et al., 2006) (Einsiedel et al., 2005) (Locatelli et al., 2012) (Pui and Evans, 2006) (Tallen et al., 2010). Die niedrigsten Überlebenschancen haben Patienten mit einem frühen Rückfall (Gaynon et al., 1998) (Lawson et al., 2000) (Nguyen et al., 2008). Zwei Drittel der Patienten mit einem Rezidiv werden zu Beginn der Therapie nicht der Hoch-Risiko-Gruppe zugerechnet (Conter et al., 2010) (Schrappe et al., 2000a). Dies unterstreicht die Notwendigkeit der Erforschung neuer Prognosefaktoren für eine individuelle risikoadaptierte Therapie. Neue zielgerichtete Therapieansätze liefern Studien über die molekularen Mechanismen der Tumorentstehung und -progression mit zahlreichen Störungen der intrazellulären Signalwege. In der Komplexität der Signaltransduktion ist die Homöostase der zellulären Prozesse wie Apoptose, Zellproliferation und -differenzierung entscheidend (Hanahan and Weinberg, 2000) (Hanahan and Weinberg, 2011) (Renan, 1993) (Santabarbara-Ruiz et al.,

2015). Die Tumorentstehung ist nicht nur auf die Fehlregulierung eines einzelnen Ereignisses zurückzuführen, sondern auf die Summe diverser intrazellulärer Veränderungen (Hanahan and Weinberg, 2000).

Die Signaltransduktionsproteine der STAT-Familie (Signaltransduktoren und -aktivatoren der Transkription) wurden bereits vor über 20 Jahren (Stark and Darnell, 2012) ursprünglich in der Signalübertragung von Interferonen entdeckt (Shuai et al., 1992) (Shuai et al., 1993) (Shuai et al., 1994). Im Anschluss konnte deren wichtige intrazelluläre Bedeutung in der Signalübermittlung von Wachstumsfaktoren bestätigt werden (Bacon et al., 1995) (Darnell et al., 1994) (Darnell, 1997) (Fu et al., 1990) (Fu et al., 1992) (Fu and Zhang, 1993) (Gouilleux et al., 1994) (Johnston et al., 1995) (Liongue et al., 2016) (Mui et al., 1995b) (Rothman et al., 1994) (Schindler et al., 1992b) (Zhong et al., 1994b). Aktuell sind sieben verschiedene STAT-Proteine bekannt: STAT1 bis STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6 (Akira et al., 1994) (Copeland et al., 1995) (Darnell et al., 1994) (Fu et al., 1992) (Hou et al., 1994) (Liongue et al., 2012) (Mui et al., 1995b) (Quelle et al., 1995) (Schindler et al., 1992a) (Stark and Darnell, 2012) (Tian et al., 1994) (Ward et al., 2000) (Yamamoto et al., 1994) (Zhong et al., 1994b). Die Bindung der Wachstumsfaktoren an den Wachstumsfaktorrezeptor führt intrazellulär zu einer Phosphorylierung der rezeptorgebundenen Tyrosinkinasen oder der rezeptorassoziierten zytoplasmatischen Kinasen, wie zum Beispiel der Janus-Kinase (Jak) (Brooks et al., 2014) (Fu et al., 1992) (Liongue et al., 2016) (Narazaki et al., 1994) (Quelle et al., 1994) (Schindler et al., 1992b) (Silvennoinen et al., 1993). Nach der Phosphorylierung der STAT-Proteine bilden sich aus den aktivierten Monomeren Homo- oder Heterodimere (O'Shea et al., 2015) (Shuai et al., 1994) (Ward et al., 2000). Diese Dimere wandern in den Nukleus, erkennen und binden spezifische Promoterregionen an der DNS und aktivieren die Transkription (Chen et al., 1998) (Fu et al., 1990) (Fu et al., 1992) (Larner et al., 1984) (Larner et al., 1986) (Levy et al., 1988) (Levy et al., 1989) (Schindler et al., 1992b) (Shuai et al., 1992) (Shuai et al., 1993) (Shuai et al., 1994) (Zhong et al., 1994a) (Zhong et al., 1994b). Zelluläre Prozesse wie die Entzündungsreaktion, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose werden über den geschilderten Signalweg reguliert (Bromberg et al., 1996) (Cressman et al., 1996) (Fukada et al., 1996) (Kaplan et al., 1996a) (Kaplan et al., 1996b) (Mui et al., 1995a) (Nosaka et al., 1999) (O'Shea et al., 2015) (Takeda et al., 1999) (Thierfelder et al., 1996). Die Bedeutung der aktivierten Signaltransduktionswege an den genannten zellulären Regulationsmechanismen wurde bei Knock-out Mäusen bestätigt. So waren Mäuse ohne STAT1 zwar lebensfähig, jedoch zeigten sich große Defizite in der Immunantwort auf

mikrobielle Pathogene (Dupuis et al., 2003) (Durbin et al., 1996) (Meraz et al., 1996). Mäuseembryos ohne STAT3 starben hingegen bereits in der Embryogenese (Takeda et al., 1997) und Mäuse ohne STAT5 zeigten Defizite in der Entwicklung verschiedener Blutzellreihen mit einer gesteigerten Apoptose (Birkenkamp et al., 2001) (Dumon et al., 1999) (Imada et al., 1998) (Sexl et al., 2000) (Teglund et al., 1998) (Yao et al., 2006).

Die ursprünglichen Untersuchungen der STAT-Proteine stammen aus den Versuchen an der Drosophila Fruchtfliege (Hanratty and Dearolf, 1993) (Harrison et al., 1995) (Hou et al., 1996) (Katsuyama et al., 2015) (Luo et al., 1995). In weiteren Untersuchungen konnte die gesteigerte Aktivierung der STAT-Signaltransduktionswege in Leukämiezelllinien (Weber-Nordt et al., 1996) und in peripheren Blutzellen von Patienten mit einer ALL oder AML (Gouilleux-Gruart et al., 1996) (Messina et al., 2016) bestätigt werden. Eine Aktivitätssteigerung des JAK/STAT-Signaltransduktionsweges ließ sich in verschiedenen Tumoren, wie beispielsweise in Plattenepithel-Tumoren im HNO- (Hals-Nasen-Ohren) und Ösophagus-Bereich (Grandis et al., 1998) (Grandis et al., 2000) (Pectasides et al., 2010) (Riebe et al., 2011) (Shukla et al., 2010) (You et al., 2012), in Brusttumoren (Garcia et al., 1997) (Garcia et al., 2001) (Huang et al., 2014) (Magkou et al., 2012) (Sartor et al., 1997), im Kolonkarzinom (Monnien et al., 2010) (Morikawa et al., 2011), im Enteropathie-assoziierten T-Zell-Lymphom (Nairismagi et al., 2016) sowie in Lymphomen und Leukämien (Andersson et al., 2013) (Benekli et al., 2002) (Benekli et al., 2009) (Birkenkamp et al., 2001) (Chai et al., 1997) (Chen et al., 2014) (Frank et al., 1997) (Gouilleux-Gruart et al., 1996) (Hayakawa et al., 1998) (Jeong et al., 2008) (Koskela et al., 2012) (Messina et al., 2016) (Rajala et al., 2013) (Spiekermann et al., 2002) (Weber-Nordt et al., 1996) (Yu et al., 1997) (Zhang et al., 1995) nachweisen. Eine JAK-Mutation wurde bei der Polycythaemia vera in bis zu 95 % beschrieben und erste Erfolge durch die Therapie mit einem JAK-Inhibitor erzielt (James et al., 2005) (Rampal et al., 2014).

Neben den STAT-Proteinen wurde eine Aktivierung der extrazellulär regulierten Signal-Kinase (ERK1/2), ein Familienmitglied der MAPK-Signaltransduktionsproteine (Mitogen-aktivierte Protein-Kinase), in 34-95 % der hämatologischen Erkrankungen beobachtet und mit einer vermehrten Proliferation in Verbindung gebracht (D'Angelo et al., 2009) (Gregorj et al., 2007) (Meng et al., 2003) (Milella et al., 2001) (Ricciardi et al., 2005) (van der Sligte et al., 2015) (Xia et al., 1995). Für die Aktivierung der MAPK-Signalkaskade spielt das Proto-Onkogen Rat sarcoma (Ras) eine zentrale Rolle (Leevers and Marshall, 1992) (Stokoe et al., 1994) und wird in über 20-30 % aller menschlichen Krebserkrankungen mutiert nachgewiesen (Bos et al., 1987) (Case et al., 2008) (Farr et al., 1988) (Flotho et al.,

1999) (Johnson et al., 2014) (Knight and Irving, 2014) (Messina et al., 2016) (Stirewalt et al., 2001). Ras wurde insbesondere bei ALL-Patienten mit einem Rückfall oder schlechter Prognose mutiert nachgewiesen (Case et al., 2008) (Driessen et al., 2013) (Irving et al., 2014). Ras übermittelt die extrazellulären Signale über weitere Proteinkinasen wie den Ras-aktivierenden-Faktor (raf), was schlussendlich zu einer Aktivierung der Familie der MAP-Kinasen führt (Case et al., 2008) (Diaz-Flores et al., 2013) (McCubrey et al., 1998) (Moodie et al., 1993) (Wood et al., 1992). In v-raf-transformierten Zellen sowie in Zellen mit einer Ras-Mutation lässt sich eine konstitutive Aktivierung von ERK1/2 nachweisen (Case et al., 2008) (Dent et al., 1992) (Howe et al., 1992) (Irving et al., 2014) (Kyriakis et al., 1992). Die p38 und c-Jun-NH2-Terminal-Kinase (JNK), als weitere Mitglieder der MAPK-Familie werden durch Stresssignale aktiviert, sind an der Apoptoseregulierung beteiligt (Bavaria et al., 2014) (Huang et al., 2016) (Lee et al., 2014) (Verheij et al., 1996) (Xia et al., 1995) und erhalten die Homöostase des Gewebes (Santabarbara-Ruiz et al., 2015). Fehlregulierungen bis hin zu Resistenzen in den Apoptosesignalwegen sind neben einer unkontrollierten Proliferation Merkmale des unbegrenzten Replikationspotentials von Tumorzellen (Del Poeta et al., 2003) (Hanahan and Weinberg, 2011).

Ausgewählte Proteine der STAT- und MAPK-Signaltransduktionswege werden in dieser Arbeit mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht. In der als Phosphoflow (Brown et al., 2015) (Krutzik et al., 2005) (Perez and Nolan, 2002) (Redell et al., 2011) bezeichneten Methode wird mit Antikörpern der phosphorylisierte und somit aktivierte Zustand von ausgewählten Signaltransduktionswegen (Chow et al., 2001) (Fleisher et al., 1999) (Ilangumaran et al., 2003) (Krutzik and Nolan, 2003) basal sowie nach der Stimulation mit Wachstumsfaktoren in peripheren Lymphozyten, in Zellen von Vorläufer-Leukämiezelllinien und in primären Leukämiezellen gemessen. Die Vervielfältigung der primären Leukämiezellen für anschließende *in vitro* Experimente erfolgte in einem in unserer Arbeitsgruppe etablierten NOD/SCID-Maus-Xenotransplantationsmodell (engl.: „Non-Obese Diabetic“, Nicht-fettleibiger-diabetischer-Typ; engl.: „severe combined immunodeficiency”, schwere kombinierte Immundefizienz) (Baersch et al., 1997) (Borgmann et al., 2000) (Kamel-Reid et al., 1989) (Meyer et al., 2011). Nach der Transplantation der pädiatrischen B-ALL-Zellen auf die NOD/SCID-Mäuse konnten in regelmäßigen Blutabnahmen mit Hilfe der Durchflusszytometrie im Blut der Mäuse die primären B-ALL-Zellen in ansteigender Anzahl nachgewiesen werden. Dabei wurde eine unterschiedlich lange Dauer zwischen der Transplantation einer Probe bis zur klinisch manifesten Leukämie in der Maus nachgewiesen (TTL= engl.: „time to leukemia”) (Meyer

et al., 2011). Eine kurze TTL-Zeit (engl.: „time to leukemia short“= TTL^{short}) ist ein prognostischer Faktor für einen frühen Rückfall. Diesem TTL^{short} Phänotyp können spezifische Genexpressionsprofile zugeschrieben werden (Meyer et al., 2011). Eine Assoziation der TTL-Zeit mit der Regulierung verschiedener Signalwege wurde bereits in weiteren Versuchen unserer Arbeitsgruppe bestätigt (Hasan et al., 2015) (Queudeville et al., 2012). Die Korrelation der Aktivität von ausgewählten Signaltransduktionswegen mit der TTL-Zeit sowie weiteren prognostischen Faktoren der ALL ist Gegenstand dieser Arbeit. Als weitere prognostische Faktoren werden einerseits patientenspezifische Risikofaktoren wie das Geschlecht, Patientenalter und die Leukozytenzahl zum Diagnosezeitpunkt sowie andererseits die Expression des TEL/AML Fusionsgens (auch als ETV6/RUNX bekannt) herangezogen (Cooper and Brown, 2015) (Hunger and Mullighan, 2015) (Nachman et al., 1997) (Nachman et al, 1998) (Nguyen et al., 2008) (Pui et al., 2003a) (Pullen et al., 1999) (Reiter et al., 1994) (Schrappe et al., 2000a) (Teachey and Hunger, 2013). Außerdem werden die Zellen der Patienten, die ein Rezidiv ihrer Erkrankung erleiden auf ein verändertes Aktivierungsmuster der Signaltransduktionswege hin untersucht.

Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, verschiedene Aktivierungs- und Phosphorylierungsmuster mit dem Therapieansprechen zu korrelieren, um ihre prognostische Bedeutung zu beurteilen und neue Therapieansätze aufzuzeigen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

– Absaugpumpe	KNF Neuberger GmbH (Freiburg, D.)
– Begasungsbrutschrank	Heraeus (Hanau, D.)
– Durchflusszytometer BD LSR II	Becton Dickinson Biosciences (BD) (San Jose, Kalifornien, USA)
– Feinwaage	Sartorius (Göttingen, D.)
– Fluoreszenzmikroskop	Olympus (Hamburg, D.)
– Magnetrührer mit Heizplatte	IKA-Labortechnik (Staufen i. Br., D.)
– Mehrkanalpipette (Pipetboy acu)	Integra Biosciences GmbH (Fernwald, D.)
– Mikroskop (DM IL)	Leica (Wetzlar, D.)
– Multipipette: Eppendorf Multipette plus	Eppendorf (Hamburg, D.)
– Sicherheitswerkbank Klasse 2 Typ: Hera safe	Heraeus (Hanau, D.)
– Vortexer	Bender& Hobein AG (Zürich, CH.)
– Wasserbad	VWR International GmbH (Darmstadt, D.)
– Zählkammer, Neubauer improved	Laboroptik (Friedrichsdorf, D.)
– Zentrifugen	
Varifuge 3.0 R	Heraeus (Hanau, D.)
Multifuge 3 S	Heraeus (Hanau, D.)

2.1.2 Verbrauchsgegenstände und –materialien

– Eppendorf Combitips plus	Eppendorf (Hamburg, D.)
– FACS-Tubes, Polypropylen 5 ml	BD (San Jose, Kalifornien, USA)
– Falcons, Polypropylen 15 und 50 ml	BD (San Jose, Kalifornien, USA)
– Kryoröhrchen	Thermo Fisher Scientific (Langenselbold, D.)
– Pipettenspitzen Eppendorf Research	Eppendorf (Hamburg, D.)
– Glaspipetten (Corning Costar Stripette)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D.)
– Filter	BD (San Jose, Kalifornien, USA)
– Zellkulturflaschen Wachstumsfläche 75 cm² Wachstumsfläche 12,5 cm²	BD (San Jose, Kalifornien, USA)

2.1.3 Chemikalien

– Albumin aus Rinderserum (BSA)	PAA Laboratories GmbH (Pasching, A.)
– Annexin V-Fluos	Sigma-Aldrich (Steinheim, D.)
– Biocoll Separationsmedium	Biochrom AG (Berlin, D.)
– 4′, 6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D.)
– Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D.)
– Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline 10x (PBS+)	Biochrom AG (Berlin, D.)
– FACS Clean	BD (San Jose, Kalifornien, USA)
– FACS Flow	BD (San Jose, Kalifornien, USA)
– FACS Rinse	BD (San Jose, Kalifornien, USA)
– Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D.)
– Hank´s Balanced Salt Solution (HBSS)	Gibco BRL (Karlsruhe, D.)
– Heparin-Natrium	Ratiopharm (Ulm, D.)
– Hydroxyethylpiperazin-N-Ethansulfonsäure (HEPES)	Gibco BRL (Karlsruhe, D.)

– KCl	Merck (Darmstadt, D.)
– L-Glutamin	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D.)
– Methanol	Sigma-Aldrich (Steinheim, D.)
– NaCl	Braun (Melsungen, D.)
– NaH_2PO_4	Merck (Darmstadt, D.)
– Natriumazid	Sigma-Aldrich (Steinheim, D.)
– Paraformaldehyd (PFA)	Merck (Darmstadt, D.)
– Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D.)
– Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D.)
– Saponin	Sigma-Aldrich (Steinheim, D.)
– Sodium pyruvat	Sigma-Aldrich (Steinheim, D.)
– Sterofundin	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, D.)
– Trypanblau	Sigma-Aldrich (Steinheim, D.)
– X-Vivo 10	Lonza Cologne AG (Köln, D.)

2.1.4 Stimulanzien

– Anisomycin (von Streptomyces griseolus)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D.)
– Rekombinante menschliche Interleukine-(IL-) 4, 6, 7, 10	R&D Systems GmbH (Wiesbaden-Nordenstadt, D.)
– INTRON® A (Interferon alfa-2b)	Schering-Plough (Kenilworth, USA)
– Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D.)

2.1.5 Antikörper

In Tabelle 1 und 2 sind die verwendeten Antikörper mit Angabe des Herstellers aufgeführt.

Tabelle 1: Darstellung der verwendeten Antikörper mit jeweiligem Fluorochrom und Herstellerangabe
Abkürzungen: BD= Becton Dickinson Biosciences; CD= engl.: „cluster of differentiation", Nomenklatur der Oberflächenstruktur von Zellen; GlyA= Serine Hydroxymethyltransferase; HLA-DR= humanes Leukozytenantigen; Ig= Immunglobulin; MPO= Myeloperoxidase; TdT= Terminale Desoxynukleotidyltransferase

Antikörper	Fluorochrom	Hersteller
CD1a	FITC	Serotec AbD (Düsseldorf, D.)
CD2, CD10, CD13, CD34	PE-Cy7	BD (San Jose, Kalifornien, USA)
CD3, CD14,	Pacific blue	BD (San Jose, Kalifornien, USA)
CD4, CD19, CD45,	AmCyan	BD (San Jose, Kalifornien, USA)
CD5, CD20, CD38, GlyA, TdT, Kappa	APC	BD (San Jose, Kalifornien, USA)
CD7, CD34, CD71, CD79a, CD117, Lambda	PE	BD (San Jose, Kalifornien, USA)
CD8, CD19, CD34, CD45, CD61, HLA-DR	PerCP	BD (San Jose, Kalifornien, USA)
CD15, CD22, CD38, CD65	FITC	BD (San Jose, Kalifornien, USA)
CD33, CD34, CD41a, CD45	PerCP-Cy5.5	BD (San Jose, Kalifornien, USA)
CD124	PE	Immunotec (Vaudreuil-Dorion, Quebec, Kanada)
CD133	APC	MACS Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D.)
IgM, MPO	FITC	DAKO (Hamburg, D.)
Isotyp-Kontrolle	FITC, PerCP, PE, APC AmCyan, PerCP-Cy5.5, PE-Cy7, Pacific blue	BD (San Jose, Kalifornien, USA)
Isotyp-Kontrolle Kaninchen	FITC	DAKO (Hamburg, D.)

Tabelle 2 zeigt die Antikörper für die Färbung der intrazellulären Signaltransduktionsproteine.

Tabelle 2: Antikörper zur Färbung der intrazellulären Signaltransduktionsproteine
Aufgeführt sind die Antikörper mit Angaben ihres Herstellers und dem jeweiligen Isotyp.
Abkürzungen: BD= Becton Dickinson Biosciences; ERK1/2= extrazellulär regulierte Signal-Kinase 1/2; IgG= ImmunglobulinG; JNK= c-Jun-NH2-Terminal-Kinase; MAPK= Mitogen-aktivierende Protein-Kinase; p38= Protein des Mitogen aktivierten Proteinkinase Signalwegs; Stat1- 6= engl.: „signal transducers and activators of transcription", Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription

Antikörper	Hersteller	Isotyp
Anti-Phospho-ERK1/2 (T202/Y204): Alexa Fluor® 647	BD (San Jose, Kalifornien, USA)	Maus IgG_1
Alexa Fluor® 647 Mouse Anti-p38 MAPK (pT180/pY182)	BD (San Jose, Kalifornien, USA)	Maus IgG_1
Phospho-JNK (Thr183/Tyr185) (G9) mAb (Alexa Fluor® 647 konjugiert)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt a. M.,D.)	Maus IgG_1
Anti-Phospho-Stat1 (pY701): Alexa Fluor® 647	BD (San Jose, Kalifornien, USA)	Maus IgG_{2a}
Anti-Phospho-Stat3 (pY705): Alexa Fluor® 647	BD (San Jose, Kalifornien, USA)	Maus IgG_{2a}
Anti-Phospho-Stat5 (pY694): Alexa Fluor® 647	BD (San Jose, Kalifornien, USA)	Maus IgG_1
Anti-Phospho-Stat6 (pY641): Alexa Fluor® 647	BD (San Jose, Kalifornien, USA)	Maus IgG_{2a}

2.1.6 Lösungen und Puffer

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Lösungen und Puffer verwendet:

–10 x PBS: 80,0 g Natriumchlorid (NaCl),
2,0 g Kaliumchlorid (KCl),
14,4 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4),
2,4 g Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)
in 1000 ml destillierten Wasser (pH 7,4)

–BSAazid: 500 ml PBS,
5 g BSA,
5 ml Natriumazid (NaH_3) (10 %)

–16 % PFA: 16 g PFA und
(Fixierungspuffer) 100 ml PBS-Puffer

2.1.7 Zelllinien

In sind die untersuchten B- und T-Vorläufer-Leukämiezelllinien dargestellt. Diese wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ GmbH, Braunschweig, D.) bezogen. Alle Kulturen wurden regelmäßig auf eine Kontamination mit Mykoplasmen hin untersucht (Unterpunkt 2.2.1.3).

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten B- und T-Vorläufer-Leukämiezelllinien
Aufgeführt sind die Immunphänotypen der B- und T-Vorläufer-Leukämiezelllinien und das zur Kultivierung verwendete Medium mit Zusätzen.
Abkürzungen: FKS= fetales Kälberserum; RPMI-1640= Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium, Hydrogencarbonatpuffersystem basierend auf einer Lösung von Glucose, Aminosäuren, Salzen und Vitaminen

Zellen	Immunphänotyp	Medium	Zusätze
MHH-CALL-2	Humane prä-B-ALL	RPMI-1640	20 % FKS, 5 ml L-Glutamin und 5 ml Sodium Pyruvat
RS4; 11	Humane prä-B-ALL	RPMI-1640	20 % FKS und 5 ml L-Glutamin
KOPN-8	Humane prä-B-ALL	RPMI-1640	20 % FKS und 5 ml L-Glutamin
Tanoue	Humane prä-B-ALL	RPMI-1640	20 % FKS und 5 ml L-Glutamin
NALM-6	Humane prä-B-ALL	RPMI-1640	20 % FKS und 5 ml L-Glutamin
REH	Humane common-B-ALL	RPMI-1640	20 % FKS und 5 ml L-Glutamin
Jurkat	Humane Vorläufer-T-ALL	RPMI-1640	20 % FKS und 5 ml L-Glutamin
MOLT-4	Humane Vorläufer-T-ALL	RPMI-1640	20 % FKS und 5 ml L-Glutamin
CCRF-CEM	Humane Vorläufer-T-ALL	RPMI-1640	20 % FKS und 5 ml L-Glutamin

2.1.8 NOD/SCID-Maus-Xenotransplantationsmodell

Die primären Leukämiezellen wurden im NOD/SCID-Maus-Transplantationsmodell vermehrt (Baersch et al., 1997) (Borgmann et al., 2000) (Kamel-Reid et al., 1989) (Meyer et al., 2011). Hierfür wurden primäre leukämische Zellen aus dem Knochenmark der Patienten isoliert. Nach der Typisierung der primären pädiatrischen Leukämiezellen (Unterpunkt 2.2.3) wurden diese intravenös in die laterale Schwanzvene der immundefizienten NOD/SCID-Mäuse transplantiert. Die transplantierten Leukämiezellen vermehrten sich über einige Wochen im hämatopoetischen und lymphatischen System der Maus und führten zur leukämischen Infiltration des Mäuseknochenmarks und der Mäusemilz. Durch wöchentliche Blutabnahmen wurde mittels der Durchflusszytometrie der Anteil der menschlichen Leukämiezellen an der Gesamtzellzahl im Blut der Mäuse bestimmt. Vor dem Auftreten von krankheitsassoziierten Symptomen wurden die Mäuse getötet. Die entnommene Mäusemilz wurde durch einen Filter in ein mit HBSS (engl.: „hank´s balanced salt solution“, eine ausgeglichene Salzlösung) gefülltes Röhrchen gepresst und gewaschen (im Folgenden, wenn nicht anders erwähnt, immer bestehend aus Zentrifugation mit 1300 rpm bei 4 °C für 7 Minuten). Im anschließenden Schritt wurden die Leukämiezellen auf 15 ml einer Kohlenhydratpolymerlösung (Ficoll) gegeben, um die Leukämiezellen aus der heterogenen Zellsuspension mittels der Dichtegradienten-Zentrifugation zu isolieren (Unterpunkt 2.2.1.5). Nach diesem Schritt standen die Zellen für die weitere Versuchsdurchführung zur Verfügung. In Tabelle 4 sind die wichtigsten Daten der verwendeten Studienpopulation dargestellt.

Tabelle 4: Studienpopulation
Abkürzungen: Nr.= Nummer; PGR= engl.: „prednison good response“, gutes Ansprechen auf die Prednison-Vorphase; TTL= engl. „time to leukemia”, Zeit von der Transplantation bis zur Entwicklung der Leukämie im Xenotransplantationsmodell; TTL^{short}= engl.: „time to leukemia short“, Entwicklung der Leukämie im NOD/SCID-Maus-Xenotransplantationsmodell innerhalb von zehn Wochen; TTL^{long}= engl.: „time to leukemia long“, Nachweis der Leukämie erst nach zehn Wochen; WBC= engl.: „white blood cell count“, Anzahl der Leukozyten

Nr.	Geschlecht	Alter bei Diagnose (Jahre)	Immun-phänotyp	WBC bei Diagnose (/µl Blut)	Ansprechen auf Prednison	Fusionsgen	TTL
1	männlich	10,7	common B-ALL	132000	PGR	Kein	TTL^{short}
2	männlich	1,4	prä-B-ALL	10500	PGR	Kein	TTL^{short}
3	männlich	15,2	prä-B-ALL	12400	PGR	Kein	TTL^{short}
4	weiblich	5,9	common B-ALL	86000	PGR	TEL/AML	TTL^{long}
5	weiblich	2,4	prä-B-ALL	15100	PGR	TEL/AML	TTL^{long}
6	männlich	4,8	common B-ALL	26000	PGR	TEL/AML	TTL^{long}
7	männlich	2,0	common B-ALL	3400	PGR	Kein	TTL^{long}
8	weiblich	10,8	common B-ALL	15000	PGR	Kein	TTL^{long}
9	männlich	12,0	common B-ALL	60800	PGR	Kein	TTL^{short}
10	weiblich	2,1	common B-ALL	35100	PGR	Kein	TTL^{long}
11	weiblich	2,6	prä-B-ALL	51700	PGR	Kein	TTL^{short}
12	weiblich	14,9	common B-ALL	13900	PGR	Kein	TTL^{long}

2.1.9 Periphere Lymphozyten

Zur Etablierung des Versuchsablaufes wurde von acht freiwilligen und gesunden Spendern (drei männliche und fünf weibliche) jeweils 50 ml Vollblut entnommen. Mittels der Dichtegradienten Zentrifugation (Unterpunkt 2.2.1.4) wurden die Lymphozyten aus dem Blut isoliert und anschließend untersucht.

2.1.10 Software

- Microsoft Office (Word 2007, Excel 2007)
- SSPS Version 16.0
- Heatmap Builder, Version 1.1
- FlowJo, Tree Star Inc., San Carlos, Kalifornien, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Arbeitstechniken

2.2.1.1 Zellkultur

Die Inkubation der Zellkulturen erfolgte im Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C und einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % CO_2. Jede Zelllinie wurde, abhängig von ihrer Wachstumsgeschwindigkeit, alle zwei bis drei Tage geteilt. Vor jedem Mediumwechsel mussten die Zellen unter dem Mikroskop auf ihre Morphologie und Dichte hin beurteilt werden. Somit konnte das Verhältnis von Medium zu Zellen an das momentane Teilungsverhalten der Zellen angepasst und die Zellen stets im logarithmischen Wachstum gehalten werden. Zur Kultivierung der humanen Leukämiezelllinien wurde das RPMI-1640 Medium mit diversen Zusätzen verwendet (Tabelle 3). Jede Manipulation an und mit den Zellen wurde unter sterilen Bedingungen unter einer Laminar-Air-Flow durchgeführt.

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde der Trypanblauausschlusstest herangezogen. Durch diesen Test wurden lebendige von toten Zellen unterschieden. Lebendige Zellen schlossen den Farbstoff aus, tote Zellen hingegen wurden blau eingefärbt. Die Anzahl der jeweiligen Zellen konnte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt werden.

2.2.1.2 Kryokonservieren von Zellen

Von jeder Zelllinie wurden Aliquots in regelmäßigen Abständen kryokonserviert und bei einer Temperatur von -80 °C gelagert. Das hierzu verwendete Medium bestand aus 700 µl Medium, 200 µl fetales Kälberserum (FKS) und 100 µl Dimethylsulfoxid (DMSO).

2.2.1.3 DAPI-Routinefärbung zum Nachweis von Mykoplasmen

Bei der Kultivierung der Zellkulturen musste auf die Reinheit von Bakterien, insbesondere von Mykoplasmen, geachtet werden. Mykoplasmen vermehrten sich zytoplasmatisch und waren unter einem Lichtmikroskop nicht sichtbar. Aus diesem Grund wurde zur Markierung von DNS routinemäßig die Zellsuspensionen mit 4′, 6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) als Fluoreszenzfarbstoff gefärbt.

Ablauf:

DAPI wurde mit Methanol im Verhältnis 1: 500 auf die zu untersuchenden Zellen gegeben und bei Raumtemperatur für zehn Minuten im Dunkeln inkubiert. Zur Ansicht unter einem Fluoreszenzmikroskop wurden davon 5 µl mit einem Tropfen Velta Shield auf einen Objektträger gegeben.

Auswertung:

DAPI lagerte sich als Verbindung bevorzugt an AT-reichen (Adenosin und Thymidin) Regionen in den kleinen Furchen der DNS an. Diese spezifische kovalente Bindung fluoreszierte bei Anregung mit ultraviolettem Licht im sichtbaren Bereich mit einer blaugrünen Farbe. Wenn die zu untersuchenden Zellen frei von Mykoplasmen waren, stellten sich nur die Zellkerne leuchtend und klar abgrenzbar vom schwarzen Zytoplasma dar. Von einer Kontamination musste ausgegangen werden, wenn das schwarze Zytoplasma von kleinen fluoreszierenden Punkten durchzogen war, was der zytoplasmatischen DNS der Mykoplasmen entsprach.

2.2.1.4 Isolierung der peripheren Lymphozyten mittels der Dichtegradienten-Zentrifugation

Das Blut der Probanden wurde heparinisiert und mit Hilfe der Dichtegradienten-Zentrifugation die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC= engl.: „peripheral blood mononuclear cell“) isoliert. Eine Kohlenhydratpolymer-Lösung erzeugte den notwendigen Dichtegradienten mit der spezifischen Dichte von 1.077 g/ml und trennte die Zellen entsprechend ihrer Dichte auf. An der Phasengrenze zwischen Serum und Kohlenhydratpolymerlösung sammelten sich die PBMC an.

Ablauf:

Zur Vorbereitung wurden 15 ml der Kohlenhydratpolymer-Lösung für 30 Minuten bei 37 °C im Wasserbad vorgewärmt. Ohne dass sich die zwei Phasen mischten, wurde das zu untersuchende Material vorsichtig auf diese Lösung geschichtet. Nach der zwanzigminütigen Zentrifugation mit 1300 rpm bei 4 °C (Beschleunigung 9, Bremsung 1) befand sich im Röhrchen, von oben nach unten gesehen, folgende Schichtung: Plasma, Ring aus PBMCs, Kohlenhydratpolymer-Lösung und auf dem Grund Erythrozyten, Thrombozyten, mehrkernige Granulozyten sowie Zellreste. Der PBMC-Ring wurde

vorsichtig abgenommen, in ein neues Röhrchen überführt und die darin enthaltenden Zellen standen für die weiteren Versuche zur Verfügung.

2.2.1.5 Isolierung der primären Leukämiezellen mittels der Dichtegradienten-Zentrifugation

Die primären Leukämiezellen wurden ebenfalls mittels der in 2.2.1.4 dargestellten Methode aus dem heterogenen Zellgemisch der Mäusemilz isoliert und konnten nach der Zentrifugation an der Phasengrenze zwischen Serum und Kohlenhydratpolymerlösung entnommen werden.

2.2.2 Grundlagen der Durchflusszytometrie

Das Ergebnis des Durchflusszytometers als ein optisches Messsystem beruht auf einer gleichzeitigen Messung mehrerer physikalischer und biochemischer Parameter. Die Analyse erfolgt mittels Streulicht- und Fluoreszenzsignale und setzt sich aus der Summe vieler schnell aufeinander folgender Einzelmessungen zusammen. Die in der Zellsuspension enthaltenen Zellen werden in einem laminaren Flüssigkeitsstrom einzeln hintereinander an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Die physikalischen Zelleigenschaften wie Größe, Form, Membranoberfläche und intrazelluläre granuläre Bestandteile führen zu einer Lichtstreuung. Eine Linse in Verlaufsrichtung des Laserstrahls (FSC, engl.: „forward scatter“, Vorwärtsstreulicht) und eine rechtwinklig dazu angebrachte Linse (SSC, engl.: „sideward scatter“, Seitwärtsstreulicht) sammeln und detektieren diese Lichtstreuung photometrisch. Je größer eine Zelle ist, desto stärker ist das Vorwärtsstreulicht. Je höher die Komplexität/Granularität ist, desto höher ist das Seitwärtsstreulicht. Eine gewünschte Zellpopulation kann anhand dieser Kriterien ausgewählt werden.

Das Durchflusszytometer registriert neben der Eigenfluoreszenz der Zellen auch Fluoreszenzfarbstoffe. Die zu untersuchenden Zellen werden mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten monoklonalen Antikörpern gegen ein entsprechendes Oberflächen- oder intrazelluläres Antigen markiert. Das Laserlicht regt diese Fluoreszenzfarbstoffe an und hebt somit die Elektronen auf ein höheres Energieniveau. Beim anschließenden Zurückführen der Elektronen auf ihr ursprüngliches Energieniveau emittieren diese die überschüssige Energie und machen das als Fluoreszenz sichtbar. Das gesammelte Licht wird durch verschiedene Filter nach Wellenlängenbereichen getrennt und zu unterschiedlichen Detektoren gelenkt. Die Mehrfarbenanalyse nimmt gleichzeitig die

Signale mehrerer verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe auf. Die Fotodioden und Fotodetektoren wandeln die optischen Signale in elektrische Signale um.
Die Signale wurden in der vorliegenden Arbeit über eine entsprechende Software (FlowJo) grafisch dargestellt und ausgewertet. Da sich die Spektren der eingesetzten Farbstoffe zum Teil überlappten, konnten die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten nicht vollständig durch die Lichtfilter getrennt werden. Dieser Fehler wurde vor der Messung kompensiert, indem von jedem registrierten Fluoreszenzsignal der durch die Überlappung entstehende Anteil abgezogen wurde.
Die Messungen dieser Arbeit erfolgten an einem BD LSR II Durchflusszytometer (Becton Dickinson).

2.2.3 Leukämietypisierung

Die Immunphänotypisierung wird in der Medizin zur Analyse der Expression verschiedener membranständiger und intrazellulärer Antigene angewendet, um mit Hilfe der Expressionsmuster deren Zugehörigkeit zu einer bestimmten Zellreihe und Differenzierungsgrad zu ermitteln. Die Methode der Immunphänotypisierung wird bei der akuten Leukämie, sowohl zur Typisierung von Erstdiagnosen, als auch zur Verlaufskontrolle eingesetzt.
Die verwendeten Leukämiezelllinien wurden einmalig vor den Versuchen mittels der Durchflusszytometrie (Unterpunkt 2.2.2) typisiert, um die genaue Markerexpression der Zelllinien aufzuzeigen.

Ablauf:

Zur Vorbereitung wurden die Antikörper dem Pipettierschema entsprechend in die Röhrchen gegeben (Tabelle 5). Anschließend wurden in jedes dieser Röhrchen 1x 10^6 Zellen gegeben und bei 4 °C für 20 Minuten inkubiert. Nach einem Waschschritt wurden die Röhrchen 1-6 mit 300 µl BSAazid aufgefüllt und bis zur Messung bei 4 °C gelagert. Die Röhrchen 7-11 wurden zusätzlich zytoplasmatisch gefärbt und mussten hierfür mit 100 µl PFA für 20 Minuten bei 4 °C fixiert werden. Dem Waschschritt folgend wurden 50 µl von 0,2 %-igen Saponin und anschließend die Antikörper für die zytoplasmatische Färbung hinzugefügt. Nach einer erneuten zwanzigminütigen Inkubationszeit bei 4 °C und anschließendem Waschschritt waren alle Röhrchen messbereit.

Tabelle 5: Pipettierschema der Antikörper für die Leukämietypisierung
Die einzelnen Antikörper wurden nacheinander im angegebenen Volumen in die Röhrchen gegeben um das in der letzten Zeile angegebene Verhältnis zu erreichen. Bei dem Kombinationsfarbstoff PE-Cy7 war eine Vorverdünnung notwendig. Die zytoplasmatischen Farbstoffe sind in der Tabelle grau hinterlegt. Abkürzungen: CD= engl.: „cluster of differentiation", Nomenklatur der Oberflächenstruktur von Zellen; GlyA= Serine Hydroxymethyltransferase; HLA-DR= humanes Leukozytenantigen; Ig= Immunglobulin; Iso rabbit= Isotypenkontrolle vom Kaninchen; MPO= Myeloperoxidase; TdT= Terminale Desoxyribonukleotidyltransferase; Vv.= Vorverdünnung; zyt.= zytoplasmatisch

Röhrchen	**FITC**	**PE**	**PerCp**	**PerCP-Cy5.5**	**PE-Cy7**	**Pacific blue**	**AmCyan**	**APC**
1	IgM	CD34	HLA-DR	CD45	CD10		CD19	CD20
2	CD1a	CD7	CD8	CD45	CD2	CD3	CD4	CD5
3	CD15	CD117	CD34	CD33	CD13	CD14	CD45	CD38
4	CD65	CD71	CD61	CD41a	CD34		CD45	GlyA
5	CD38	CD124	CD19	CD34	CD10		CD45	CD133
6	Isotyp	Isotyp	Isotyp	Isotyp	Isotyp	Isotyp	Isotyp	Isotyp
7	IgM zyt.	Lambda	CD45				CD19	Kappa
8	MPO zyt.		CD45					
9	CD22 zyt.	CD79a	CD45			CD3 zyt.	CD19	TdT zyt.
10	Isotyp		CD45			Isotyp		Isotyp
11	Iso rabbit		CD45					
Volumen	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	1 µl	5 µl	5 µl	1 µl
Verhältnis	1: 20	1: 20	1: 20	1: 20	1: 400 (Vv. 1: 4)	1: 20	1: 20	1: 100

Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des FlowJo Programms. Zur graphischen Darstellung wurde das Zweiparameter-Punktediagramm (Pseudo-Color-Plot) genutzt. In einem XY-Koordinatensystem entsprach hierbei jeder Punkt einer Zelle mit zwei Eigenschaften. Der Vergleich mit einer geeigneten Negativkontrolle (Isotyp) ermöglichte Aussagen bezüglich der Eigenschaften der Zellen. Durch das Setzen eines Auswahlfensters (Gate oder Region) um einen entsprechenden Bereich im Diagramm konnte eine bestimme Zellpopulation ausgewählt werden. Diese wurde anschließend bezüglich verschiedener Parameter in einem neuen XY-Diagramm untersucht.

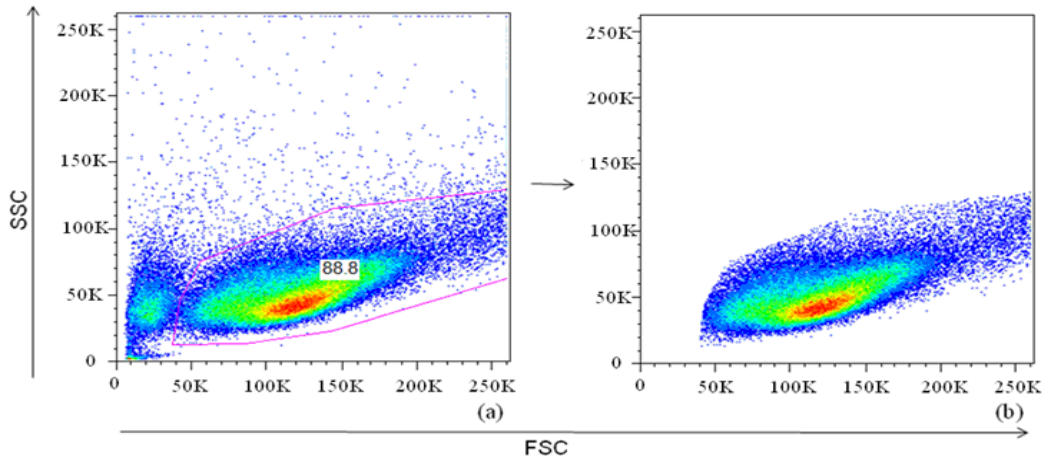


Abbildung 1: Elektronische Trennung einer Subpopulation mittels einer definierten Region
Untersucht und dargestellt wurden 50000 Zellen in einer Zweiparameterdarstellung mit dem Vorwärts- (FSC, x-Achse) und Seitwärtslicht (SSC, y-Achse). Durch das Setzten einer Region in Abbildung 1(a) (rosa umkreister Bereich) konnten 88,8 % der Gesamtzahl der gemessenen Zellen als vital definiert werden. Die ausgewählten Zellen wurden in Abbildung 1(b) isoliert dargestellt und konnten auf weitere Merkmale hin untersucht werden.
Abkürzungen: FSC= engl.: „forward scatter“, Vorwärtsstreulicht; K= Tausend; SSC= engl.: „sideward scatter“, Seitwärtsstreulicht

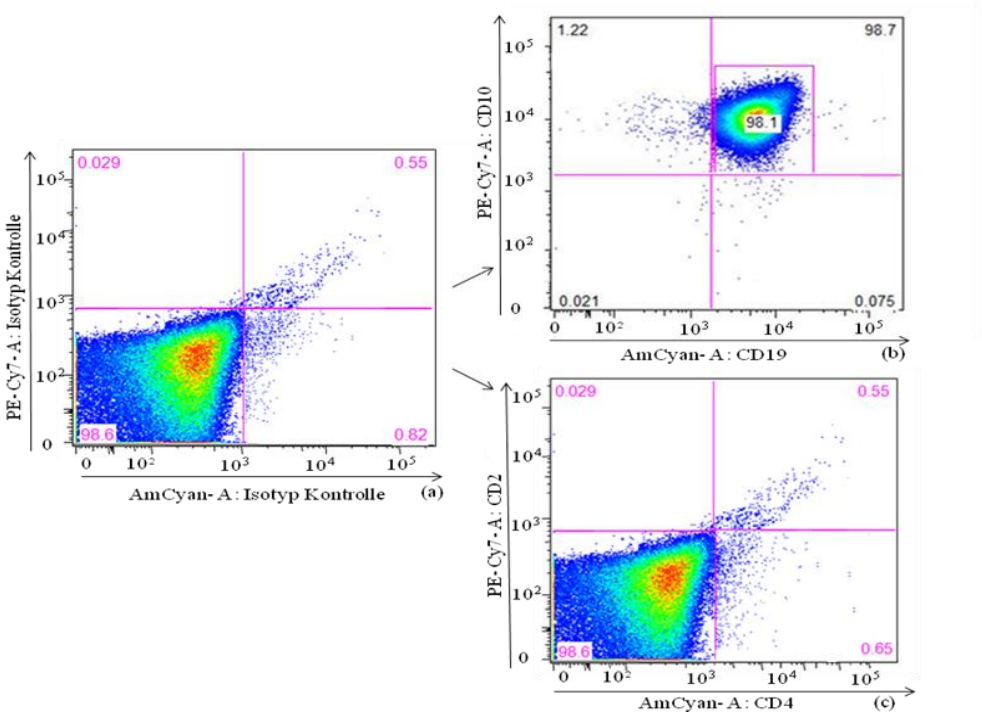


Abbildung 2: Darstellung positiver und negativer Signale für verschiedene Oberflächenmarker
Die untersuchten Zellen wurden im Koordinatensystem mit den Isotypkontrollen für PE-Cy7 und AmCyan dargestellt (Abbildung 2 (a)). Die gesetzten Grenzen bezüglich der Fluoreszenzfarbstoffe wurden als Kontrolllinien auf die weiteren Koordinatensysteme (b und c) mit der gleichen Färbung übertragen. So konnte ein positives Signal mit einem Anteil von 98,1 % der Zellen bezüglich der Expression der Oberflächenmarker CD10 und CD19 dargestellt werden (2 (b)). Ein negatives Signal im Bezug auf die Expression von CD2 und CD4 zeigt Abbildung 2 (c).
Abkürzungen: CD= engl.: „cluster of differentiation“, Nomenklatur der Oberflächenstruktur von Zellen

2.2.4 Versuche

2.2.4.1 Durchflusszytometrische Messung der Phosphoepitope in Vorläufer-Leukämiezelllinien

Die Phosphorylierung der Signaltransduktionsproteine wurden innerhalb einer Zelle vor (basal) sowie nach der Stimulation mit verschiedenen Stimulatoren mittels der Durchflusszytometrie untersucht (Brown et al., 2015) (Chow et al., 2001) (Krutzik et al., 2005) (Krutzik and Nolan, 2006) (Montag and Lotze, 2006) (Perez and Nolan, 2002).

Ablauf:

Die Zellen der zu untersuchenden Vorläufer-Leukämiezelllinie wurden zentrifugiert, gezählt und auf eine Zellkonzentration von 6x 10^6 Zellen/ml mit X-VIVO 10 eingestellt. In jedes beschriftete Röhrchen wurden steril 0,5 ml von dieser Zellsuspension gegeben und anschließend die verwendeten Simulatoren in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugegeben: PMA (100 nM), Anisomycin (0,5 µg/ml), Interferon-α (100 IU/ml) und Interleukine (je 100 ng/ml). Nach einer 15 minütigen Inkubation bei 37 °C wurden direkt 125 µl von 16 %-igem PFA hinzugegeben. Eine Endkonzentration von 3,2 % PFA fixierte die Zellen in ihrem momentanen Zustand. Nach einer Inkubation über 15 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Röhrchen direkt zentrifugiert und abgesaugt. Es schloss sich ein Waschschritt mit BSAazid an. Das verbliebene Zellpellet wurde mit 300 µl BSAazid aufgefüllt. Dieses Gemisch wurde in drei gleiche Gruppen mit jeweils 100 µl BSAazid aufgeteilt.
Für die Färbung der intrazellulären Phosphoepitope wurde die Zellmembran mit 0,5 ml eiskaltem 70 %-igen Methanol bei -20 °C permeabilisiert. Dies wurde nach zehn Minuten durch einen Waschschritt entfernt und anschließend die Antikörper für die intrazelluläre Färbung hinzugegeben. Nach einer 30 minütigen Inkubationsphase wurden die Zellen erneut mit BSAazid gewaschen.

Auswertung:

Pro Röhrchen wurden 50000 Zellen gemessen und anschließend mit dem FlowJo Programm ausgewertet (Abbildung 3). Der Versuch wurde mit jeder Zelllinie drei Mal wiederholt und der Mittelwert aus diesen Werten gebildet. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) wurden ermittelt. Die Reaktion auf die Stimulation konnte mittels der berechneten fold change Werte (fold change= $MFI_{stimuliert}/MFI_{unstimuliert}$) beurteilt werden (Krutzik et al., 2005).

2.2.4.2 Durchflusszytometrische Messung der Phosphoepitope in peripheren Lymphozyten und primären Leukämiezellen aus dem NOD/SCID-Maus-Xenotransplantationsmodell

Der Ablauf richtete sich nach dem im Unterpunkt 2.2.4.1 beschriebenen Vorgehen. Einige Schritte unterschieden sich jedoch und werden im Folgenden dargestellt.

Die Zellen mussten vor der Durchführung des Versuchs aus dem heterogenen Zellgemisch mittels der Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert werden (Unterpunkt 2.2.1.4 und 2.2.1.5). Die nach der Stimulation hinzugegebenen Oberflächen-Antikörper dienten der Unterscheidung der Zellen bei der Auswertung (Montag and Lotze, 2006). Bei den Versuchen mit dem Material der Xenotransplantate wurden für die Färbung der Leukämiezellen je 10 µl von CD19 im Fluorochrom FITC und von CD10 in PE in die Röhrchen hinzugefügt (Abbildung 3). Bei den PBMCs wurden zur Identifikation der B-Lymphozyten 10 µl von CD19 in FITC und für die Färbung der T-Lymphozyten 10 µl von CD3 in PE dazugegeben. Nach der Inkubation für 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur schloss sich ein Waschschritt an. Die weiteren Schritte folgten dem Protokoll aus Unterpunkt 2.2.4.1.

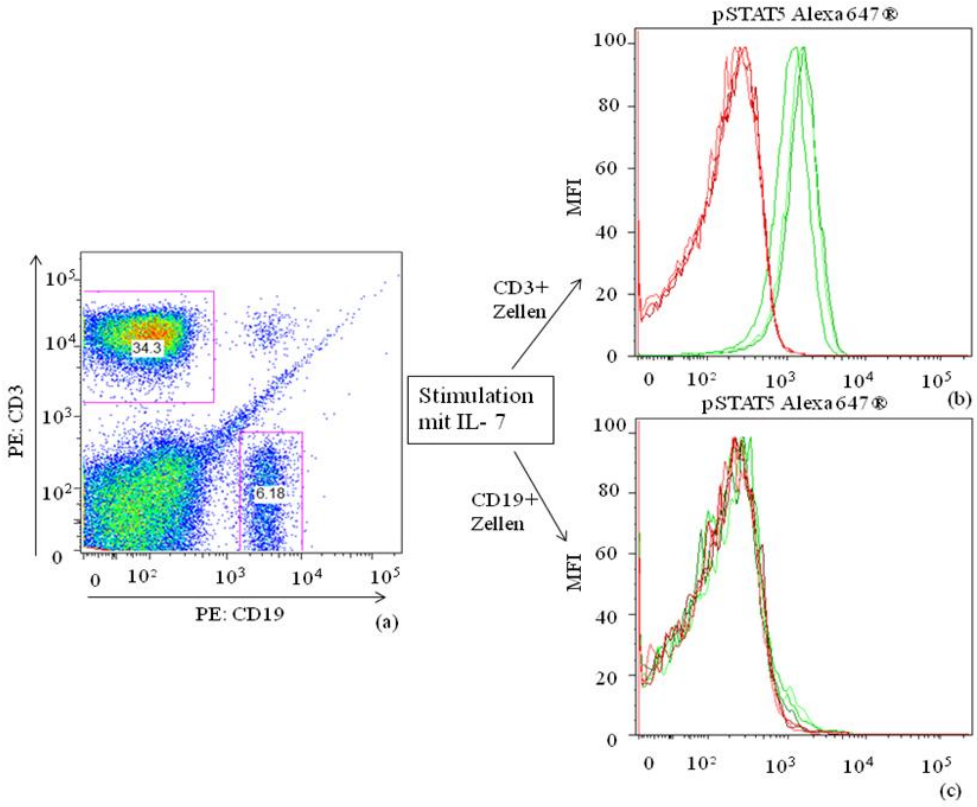


Abbildung 3: Schrittabfolge zur graphischen Darstellung der durchflusszytometrischen Messungen am Beispiel der peripheren Lymphozyten
Es wurden zwei Auswahlregionen bei der Untersuchung der peripheren mononuklearen Blutzellen gesetzt (Abbildung 3(a)). Anhand des Oberflächenmarker CD3 konnten 34,3 % der untersuchten Zellen als T-Lymphozyten und 6,18 % mit der Expression von CD19 als B-Lymphozyten definiert werden. Mittels drei Messproben konnten in Abbildung 3(b) die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der unstimulierten (rote Farbtöne) den stimulierten (grüne Farbtöne) Werten der T-Lymphozyten gegenüber gestellt werden. So ließ sich eine Steigerung der Phosphorylierung von STAT5 nach der Stimulation mit IL-7 zeigen (b). Bei den B-Lymphozyten hingegen zeigte sich nach der Stimulation mit IL-7 keine Reaktion bei den T-Lymphozyten (Abbildung 3(c)).
Abkürzungen: CD= engl.: „cluster of differentiation“, Nomenklatur der Oberflächenstruktur von Zellen; IL= Interleukin; MFI= mittlere Fluoreszenzintensität; pSTAT= engl.: „signal transducers and activators of transcription”, phosphorylisiertes Signaltransduktionsprotein der Familie der Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription

2.2.5 Darstellung der Ergebnisse

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden an peripheren Lymphozyten, den Zellen der B- und T-Vorläufer-Leukämiezelllinien sowie primären Leukämiezellen aus dem NOD/SCID-Maus-Xenotransplantationsmodell durchgeführt. Die verwendeten Heatmaps stellten einen optischen Vergleich der basalen und der stimulierten Werte dar und waren innerhalb der jeweiligen Datenmenge normalisiert. Hierzu wurden sie durch den jeweiligen niedrigsten Wert, der in dem untersuchten Phosphoepitop vorkam, geteilt. Anschließend wurde zur graphischen Darstellung der Logarithmus zur Basis zwei der Werte gebildet. Die jeweilige Stärke der basalen Phosphorylierung für ein Phosphoepitop

konnte somit anhand eines Farbumschlags von schwarz als schwächste bis hin zu gelb als stärkste Phosphorylierung in jeder Zeile einzeln abgelesen werden.
Nach der Stimulation wurden die fold change Werte mit Hilfe der SPPS Software bestimmt. Zur graphischen Darstellung wurde auch hier der Logarithmus zur Basis zwei gebildet. In den Heatmaps entsprach somit der Wert null keiner Reaktion auf die Stimulation und wurde in der Abbildung mit der Farbe schwarz dargestellt. Eine positive Reaktion der Stimulation projizierte sich mit gelben und eine negative mit blauen Farbtönen. Mit der jeweils unter den Abbildungen angegebenen Skalierung des Farbumschlags konnte die Stärke der Phosphorylierung in jeder Zeile der Heatmaps separat abgelesen werden.
Signifikante Unterschiede zwischen zwei Subgruppen der primären Leukämiezellen aus den NOD/SCID-Maus-Xenotransplantationsmodell wurden mit Box-Whisker-Plots dargestellt.

2.2.6 Statistische Analyse

Die charakteristischen Eigenschaften der Stichproben wurden vorerst mittels Methoden der deskriptiven Statistik mit Hilfe der SSPS Software begutachtet und anschließend bewertet. Dazu wurden die Ergebnisse mittels Heatmaps oder in Form von Box-Whisker-Plots dargestellt. Die Berechnung der charakteristischen Kenngrößen wie der Standardabweichung und des Medians folgten. Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen wurden mittels des U-Tests nach Mann und Whitney berechnet. Wenn mehr als zwei Gruppen gleichzeitig zu vergleichen waren, wurde der Kruskal-Wallis-Test zur Bestimmung der Signifikanz herangezogen. Eine statistische Signifikanz zwischen zwei Größen wurde bei beiden Tests mit einem p-Wert kleiner 0,05 erreicht.

3 Ergebnisse

3.1 Aktivität der Signaltransduktionswege in peripheren Lymphozyten und in Vorläufer-Leukämiezelllinien

Die Sensitivität der Methode wurde anhand der unterschiedlich starken Phosphorylierung der Signaltransduktionsproteine bei den peripheren B- und T-Lymphozyten bestätigt. Wie in Abbildung 4 dargestellt, konnten B- von T-Lymphozyten anhand einer signifikant stärkeren basalen Phosphorylierung von ERK, p38, JNK, STAT3 und STAT6 differenziert werden. Bei STAT1 hingegen ließ sich eine ausgeprägtere basale Phosphorylierung bei den T-Lymphozyten nachweisen. Nur bei STAT5 konnte zwischen den B- und T-Lymphozyten kein Unterschied detektiert werden.

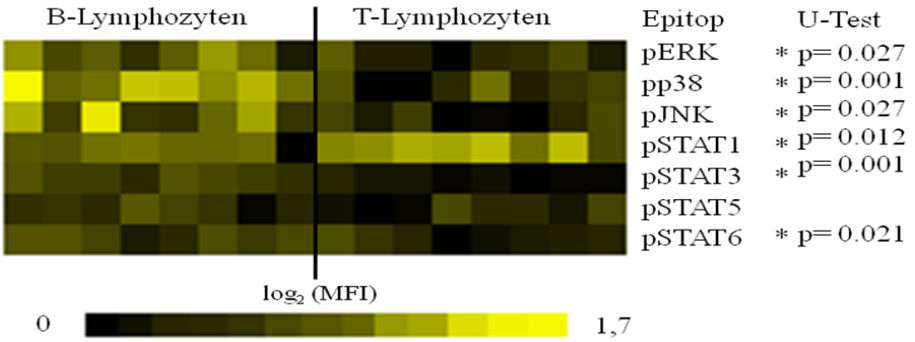


Abbildung 4: Basale Phosphorylierung der Signaltransduktionsproteine bei den peripheren Lymphozyten der Kontrollprobanden
Dargestellt sind die Signaltransduktionsproteine mittels ihrer normalisierten basalen mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI-Werte) im $\log_2$. Die Stärke der basalen Phosphorylierung der B- und T-Lymphozyten kann anhand der Färbung erkannt und mit der angegeben Skalierung des Farbumschlags (schwarz= schwächere Aktivität; gelb= stärkere Aktivität) in jeder Zeile separat abgelesen werden. Signifikante Unterschiede zwischen den B- und T-Lymphozyten wurden mit dem U-Test mit $p<0.05$ bestimmt.
Abkürzungen: MFI= mittlere Fluoreszenzintensität; pERK= phosphorylisierte extrazellulär regulierte Signal-Kinase 1/2; pJNK= phosphorylisierte Januskinase; pp38= phosphorylisiertes Protein des Mitogen aktivierten Proteinkinase Signalwegs; pSTAT= engl.: „signal transducers and activators of transcription", phosphorylisiertes Signaltransduktionsprotein der Familie der Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription; * $p<0.05$, signifikant (U-Test)

Neben den peripheren B- und T-Lymphozyten wurden die Versuche an den B-Vorläufer-Leukämiezelllinien KOPN, NALM-6, RS4; 11, MHH-CALL-2, REH und Tanoue sowie den T-Vorläufer-Leukämiezelllinien CCRF-CEM, Jurkat und MOLT-4 durchgeführt. Die Untersuchungen bei den genannten Leukämiezelllinien wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten wiederholt und die Mittelwerte davon zur Darstellung der aktivierten Signaltransduktionswege bei den B- und T-Vorläufer-Leukämiezelllinien herangezogen. Es konnte bei den T-Vorläufer-Leukämiezelllinien im Vergleich zu den B-Vorläufer-

Leukämiezelllinien bei allen untersuchten Phosphoepitopen eine stärkere basale Phosphorylierung detektiert werden. Diese Unterschiede waren bis auf pJNK mit dem U-Test statistisch signifikant (Abbildung 5).

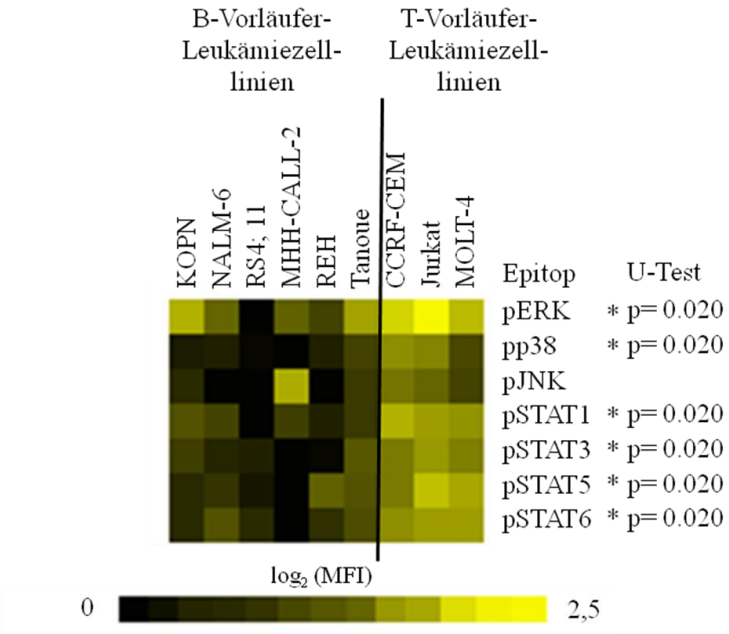


Abbildung 5: Basale Phosphorylierung der Signaltransduktionsproteine bei den Vorläufer-Leukämiezelllinien
Dargestellt sind die Signaltransduktionsproteine mittels ihrer normalisierten basalen mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI-Werte) im $\log_2$. Die Stärke der basalen Phosphorylierung bei den B- und T-Vorläufer-Leukämiezelllinien kann anhand der Färbung erkannt und mit der angegeben Skalierung des Farbumschlags (schwarz= schwächere Aktivität; gelb= stärkere Aktivität) in jeder Zeile separat abgelesen werden. Signifikante Unterschiede zwischen den B- und T-Vorläufer-Leukämiezelllinien wurden mit dem U-Test mit $p<0.05$ bestimmt.
Abkürzungen: MFI= mittlere Fluoreszenzintensität; pERK= phosphorylisierte extrazellulär regulierte Signal-Kinase 1/2; pJNK= phosphorylisierte Januskinase; pp38= phosphorylisiertes Protein des Mitogen aktivierten Proteinkinase Signalwegs; pSTAT= engl.: „signal transducers and activators of transcription", phosphorylisiertes Signaltransduktionsprotein der Familie der Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription; * $p<0.05$, signifikant (U-Test)

Wie in der Einleitung geschildert, greifen Wachstumsfaktoren über die Phosphorylierung der Signaltransduktionsproteine in verschiedene Regulationsmechanismen der Zellen ein. In den weiteren Untersuchungen wurde die Aktivität der Signaltransduktionswege bei den Lymphozyten und den Vorläufer-Leukämiezelllinien nach der Stimulation mit verschiedenen Wachstumsfaktoren bestimmt und in Heatmaps anhand der fold change Werte visualisiert.

Bei der MAPK-Familie zeigte sich eine homogene Aktivierung nach der Stimulation bei den B- und T-Lymphozyten. Es ließ sich nur bei p38 nach der Stimulation mit PMA eine stärkere Phosphorylierung bei den T-Lymphozyten feststellen. Anders war dies bei der Phosphorylierung der STAT-Signaltransduktionsproteine. Nach der Stimulation konnte

eine stärkere Aktivierung der STAT-Signaltransduktionswege bei den T-Lymphozyten gemessen werden (Abbildung 6). Statistisch signifikant waren die Unterschiede zwischen den B- und T-Lymphozyten bei STAT1 nach der Stimulation mit IL-6, bei STAT3 mit IL-6 und IL-10 sowie bei STAT5 mit IL-7.

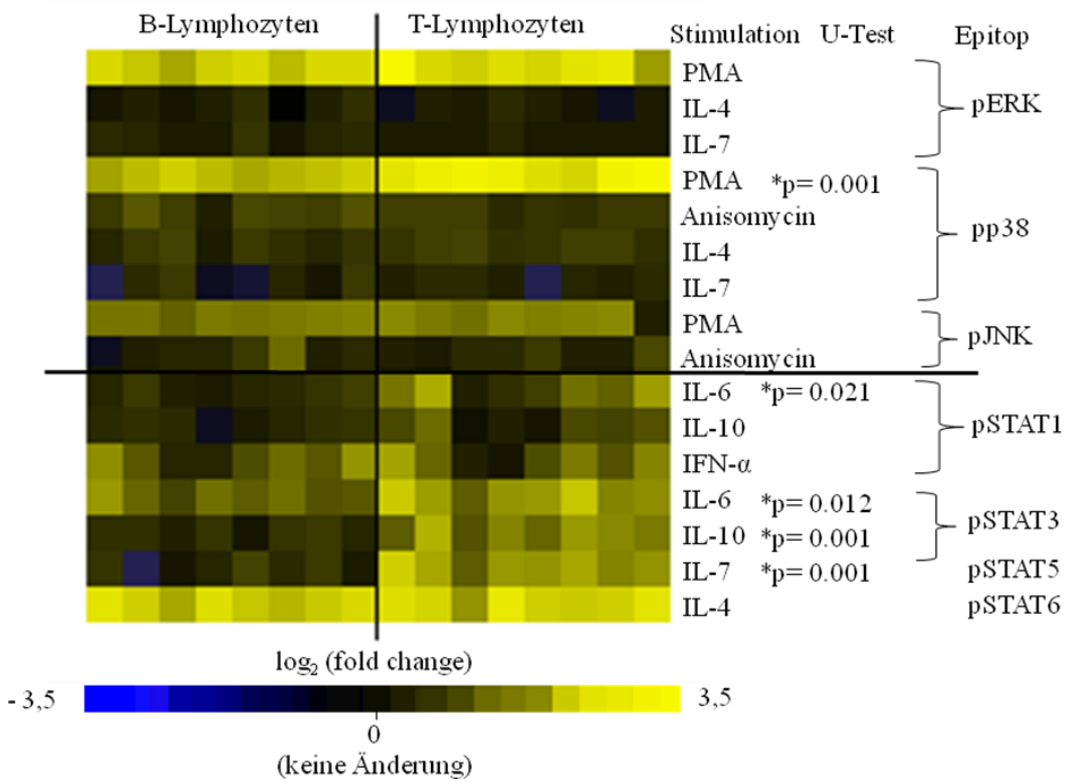


Abbildung 6: Phosphorylierung der Signaltransduktionsproteine bei den peripheren Lymphozyten der Kontrollprobanden nach der Stimulation
Die Zellen der peripheren Lymphozyten wurden mit verschiedenen Wachstumsfaktoren stimuliert. Im Anschluss wurde die Aktivität der Signaltransduktionswege gemessen und anhand der fold change Werte im log_2 dargestellt. Die fold change Werte können anhand der Färbung erkannt und mit der angegeben Skalierung des Farbumschlags (schwarz= keine Änderung der Aktivität; gelb= gesteigerte Aktivität; blau= reduzierte Aktivität) in jeder Zeile separat abgelesen werden. Signifikante Unterschiede zwischen den B- und T-Lymphozyten wurden mit dem U-Test mit $p<0.05$ bestimmt.
Abkürzungen: fold change Werte (fold change= $MFI_{stimuliert}/MFI_{unstimuliert}$); IL= Interleukin; INF-α= Interferon α; MFI= mittlere Fluoreszenzintensität; pERK= phosphorylisierte extrazellulär regulierte Signal-Kinase 1/2; pJNK= phosphorylisierte Januskinase; PMA= Phorbol-12-Myristat-13-Azetat; pp38= phosphorylisiertes Protein des Mitogen aktivierten Proteinkinase Signalwegs; pSTAT= engl.: „signal transducers and activators of transcription", phosphorylisiertes Signaltransduktionsprotein der Familie der Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription; * $p<0.05$, signifikant (U-Test)

Zwischen den B- und T-Vorläufer-Leukämiezelllinien konnten nach der Stimulation statistisch signifikante Unterschiede bei den MAPK-Signaltransduktionswegen beobachtet werden. Die B-Vorläufer-Leukämiezelllinien reagierten mit einer stärkeren Phosphorylierung von ERK nach der Stimulation mit PMA sowie IL-7. Anders nach der Stimulation mit IL-4 und der Aktivierung von ERK. Hier ließ sich bei den T-Vorläufer-

Leukämiezelllinien eine stärkere Phosphorylierung von ERK messen. Die Stimulation mit IL-4 sowie IL-7 zeigte eine stärkere Aktivierung von p38 bei den T-Vorläufer-Leukämiezelllinien. Nach der Stimulation mit PMA und Anisomycin stellte sich eine stärkere Phosphorylierung von p38 bei den B-Vorläufer-Leukämiezelllinien dar. Bei den untersuchten STAT-Signaltransduktionsproteinen konnte nur ein signifikanter Unterschied gemessen werden. Nach der Stimulation mit IL-4 zeigte sich bei den B-Vorläufer-Leukämiezelllinien eine stärkere Aktivität von STAT4.

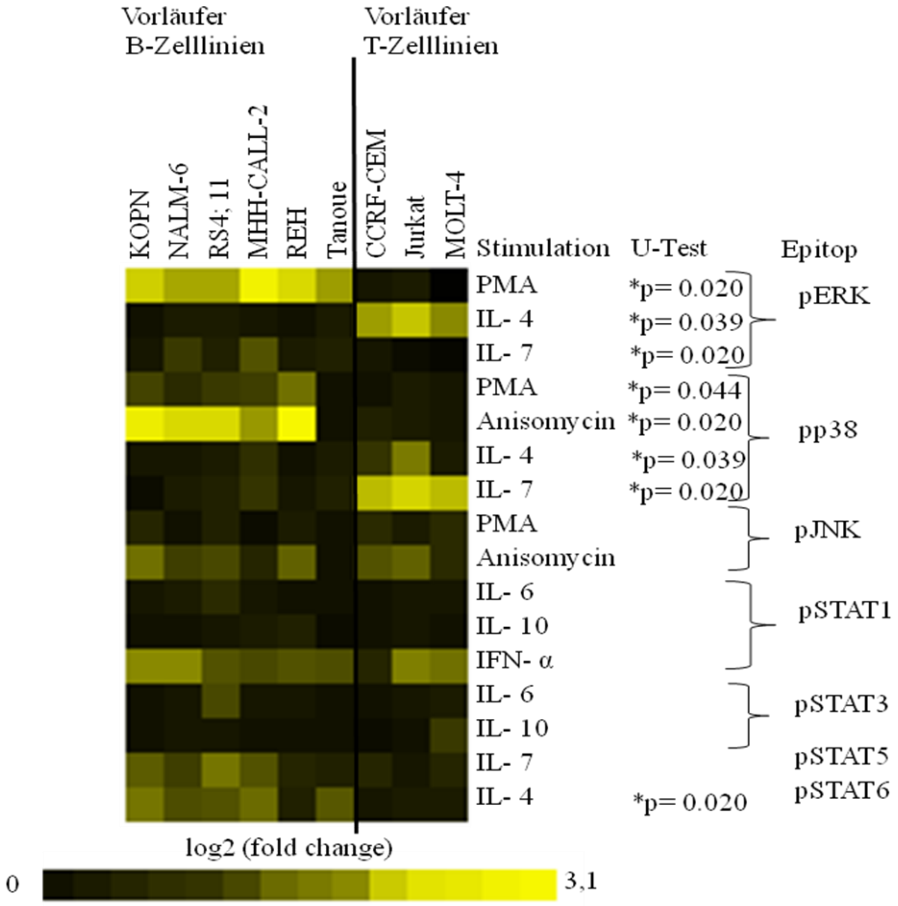


Abbildung 7: Phosphorylierung der Signaltransduktionsproteine bei den Vorläufer-Leukämiezelllinien nach der Stimulation

Die Zellen der Vorläufer-Leukämiezelllinien wurden mit verschiedenen Wachstumsfaktoren stimuliert. Im Anschluss wurde die Aktivität der Signaltransduktionswege gemessen und anhand der fold change Werte im log_2 dargestellt. Die fold change Werte können anhand der Färbung erkannt und mit der angegeben Skalierung des Farbumschlags (schwarz= keine Änderung der Aktivität; gelb= gesteigerte Aktivität; blau= reduzierte Aktivität) in jeder Zeile separat abgelesen werden. Signifikante Unterschiede zwischen den B- und T-Vorläufer-Leukämiezelllinien wurden mit dem U-Test mit $p<0.05$ bestimmt.

Abkürzungen: fold change Werte (fold change= $MFI_{stimuliert}/MFI_{unstimuliert}$); IL= Interleukin; INF-α= Interferon α; MFI= mittlere Fluoreszenzintensität; pERK= phosphorylisierte extrazellulär regulierte Signal-Kinase 1/2; pJNK= phosphorylisierte Januskinase; PMA= Phorbol-12-Myristat-13-Azetat; pp38= phosphorylisiertes Protein des Mitogen aktivierten Proteinkinase Signalwegs; pSTAT= engl.: „signal transducers and activators of transcription", phosphorylisiertes Signaltransduktionsprotein der Familie der Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription; * $p<0.05$, signifikant (U-Test)

3.2 Vergleich der aktivierten Signaltransduktionswege zwischen Leukämiezellen und peripheren Lymphozyten

In den weiteren Versuchen wurde die Aktivität der Signaltransduktionsproteine in primären Leukämiezellen aus dem NOD/SCID-Maus-Xenotransplantationsmodell untersucht und diese Ergebnisse mit den zuvor beschriebenen der B-Lymphozyten und B-Vorläufer-Leukämiezelllinien verglichen.

Es ließ sich bei allen untersuchten Signaltransduktionswegen eine höhere basale Aktivität bei den Leukämiezellen, als bei den Lymphozyten darstellen. Die höchsten MFI-Werte konnten bei den B-Vorläufer-Leukämiezelllinien und die niedrigsten bei den peripheren B-Lymphozyten gemessen werden.

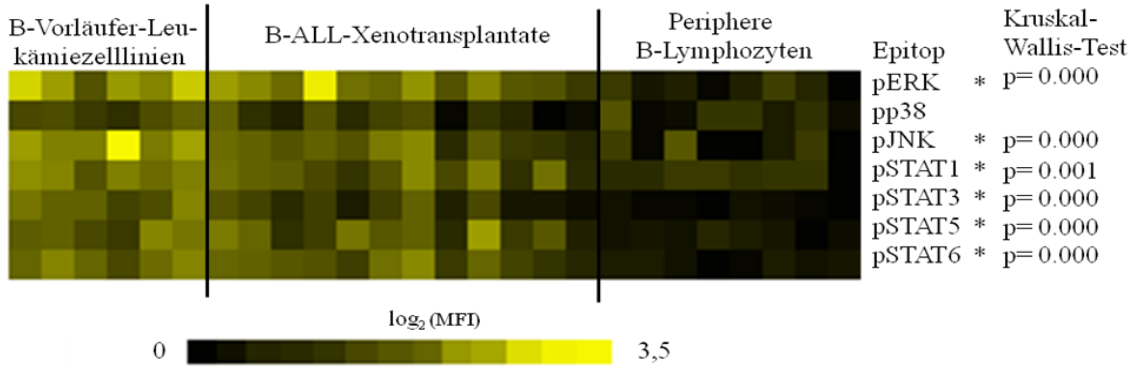


Abbildung 8: Basale Phosphorylierung der Signaltransduktionsproteine bei den drei untersuchten Gruppen

Dargestellt ist die basale Phosphorylierung der Signaltransduktionsproteine der B-Vorläufer-Leukämiezelllinien, der primären Leukämiezellen der B-ALL-Xenotransplantate und der peripheren B-Lymphozyten der Kontrollprobanden mittels ihrer normalisierten basalen mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI-Werte) im $\log_2$. Die Stärke der basalen Phosphorylierung ist anhand der Färbung zu erkennen und kann mit der angegeben Skalierung des Farbumschlags (schwarz= schwächere Aktivität; gelb= stärkere Aktivität) in jeder Zeile separat abgelesen werden. Signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test mit $p<0.05$ bestimmt.

Abkürzungen: ALL= akute lymphatische Leukämie; MFI= mittlere Fluoreszenzintensität; pERK= phosphorylisierte extrazellulär regulierte Signal-Kinase 1/2; pJNK= phosphorylisierte Januskinase; pp38= phosphorylisiertes Protein des Mitogen aktivierten Proteinkinase Signalwegs; pSTAT= engl.: „signal transducers and activators of transcription", phosphorylisiertes Signaltransduktionsprotein der Familie der Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription; * $p<0.05$, signifikant (Kruskal-Wallis-Test)

Nach der Stimulation zeigte sich eine stärkere Phosphorylierung der Signaltransduktionsproteine bei den peripheren B-Lymphozyten im Vergleich zu den B-Vorläufer-Leukämiezellen und den primären Leukämiezellen aus dem NOD/SCID-Maus-Xenotransplantationsmodell. Mit dem Kruskal-Wallis-Test konnten statistisch signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen bei JNK und p38 nach der Stimulation mit PMA nachgewiesen werden. Ebenfalls konnten nach der Stimulation mit IL-6 bei STAT3 und

mit IL-4 bei STAT6 bei den peripheren B-Lymphozyten höhere fold change Werte festgestellt werden. Hingegen präsentierte sich nach der Stimulation mit Anisomycin eine schwächere Phosphorylierung von p38 bei den peripheren B-Lymphozyten.

Bei den B-Lymphozyten von verschiedenen Probanden ließ sich bei p38 und STAT5 nach der Stimulation mit IL-7, bei JNK nach der Stimulation mit Anisomycin sowie bei STAT1 nach der Stimulation mit IL-10 eine hemmende Wirkung der Wachstumsfaktoren mit fold change Werten im $\log_2$ unter 0 messen.

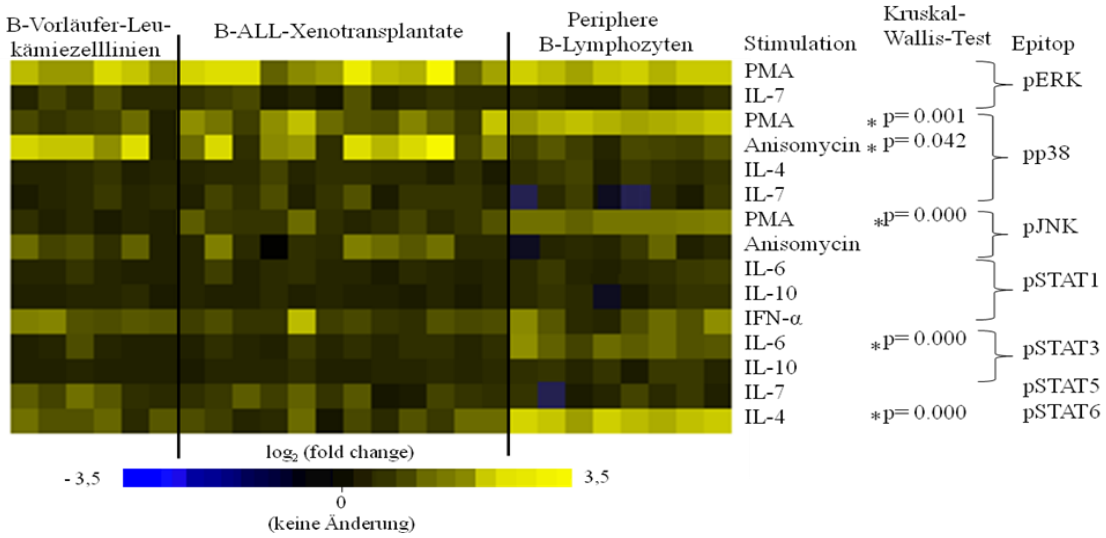


Abbildung 9: Phosphorylierung der Signaltransduktionsproteine nach der Stimulation der drei untersuchten Gruppen

Die Zellen der Vorläufer-Leukämiezelllinien, die primären Leukämiezellen der B-ALL-Xenotransplantate und peripheren B-Lymphozyten wurden mit verschiedenen Wachstumsfaktoren stimuliert. Die anschließende Phosphorylierung der Signaltransduktionsproteine wurde gemessen und anhand der fold change Werte im $\log_2$ dargestellt. Die fold change Werte können anhand der Färbung erkannt und mit der angegeben Skalierung des Farbumschlags (schwarz= keine Änderung der Aktivität; gelb= gesteigerte Aktivität; blau= reduzierte Aktivität) in jeder Zeile separat abgelesen werden. Signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test mit $p<0.05$ bestimmt.

Abkürzungen: ALL= akute lymphatische Leukämie; fold change Werte (fold change= $MFI_{stimuliert}/MFI_{unstimuliert}$); IL= Interleukin; INF-α= Interferon α; MFI= mittlere Fluoreszenzintensität; pERK= phosphorylisierte extrazellulär regulierte Signal-Kinase 1/2; pJNK= phosphorylisierte Januskinase; pp38= phosphorylisiertes Protein des Mitogen aktivierten Proteinkinase Signalwegs; PMA= Phorbol-12-Myristat-13-Azetat; pSTAT= engl.: „signal transducers and activators of transcription", phosphorylisiertes Signaltransduktionsprotein der Familie der Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription; * $p<0.05$, signifikant (Kruskal-Wallis-Test)

3.3 Analyse von Phosphorylierungsmustern bei den primären-B-Vorläufer-ALL-Zellen

Zur Darstellung von Aktivitäts- und Phosphorylierungsmustern sowie zur Korrelation dieser mit dem Therapieansprechen wurden die primären B-Vorläufer-ALL-Zellen, aus dem bereits in der Einleitung vorgestellten NOD/SCID-Maus-Xenotransplantationsmodell, anhand von prognostischen Faktoren in Subgruppen geteilt.

Ein Kategorisierungsmerkmal für die Subgruppenbildung war das Geschlecht der Patienten. In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivität der Signaltransduktionswege der Zellen aus dem Xenotransplantationsmodell von sechs männlichen Patienten gemessen und den Werten von sechs Patientinnen gegenübergestellt. Beim Vergleich der basalen MFI-Werte konnten bei den männlichen Patienten, bei allen untersuchten Phosphoepitopen, höhere Werte festgestellt werden. Statistisch signifikante Unterschiede waren bei JNK, STAT1, STAT3, STAT5 und STAT6 zu beobachten. Diese Unterschiede wurden in Abbildung 10 durch Boxplots dargestellt.

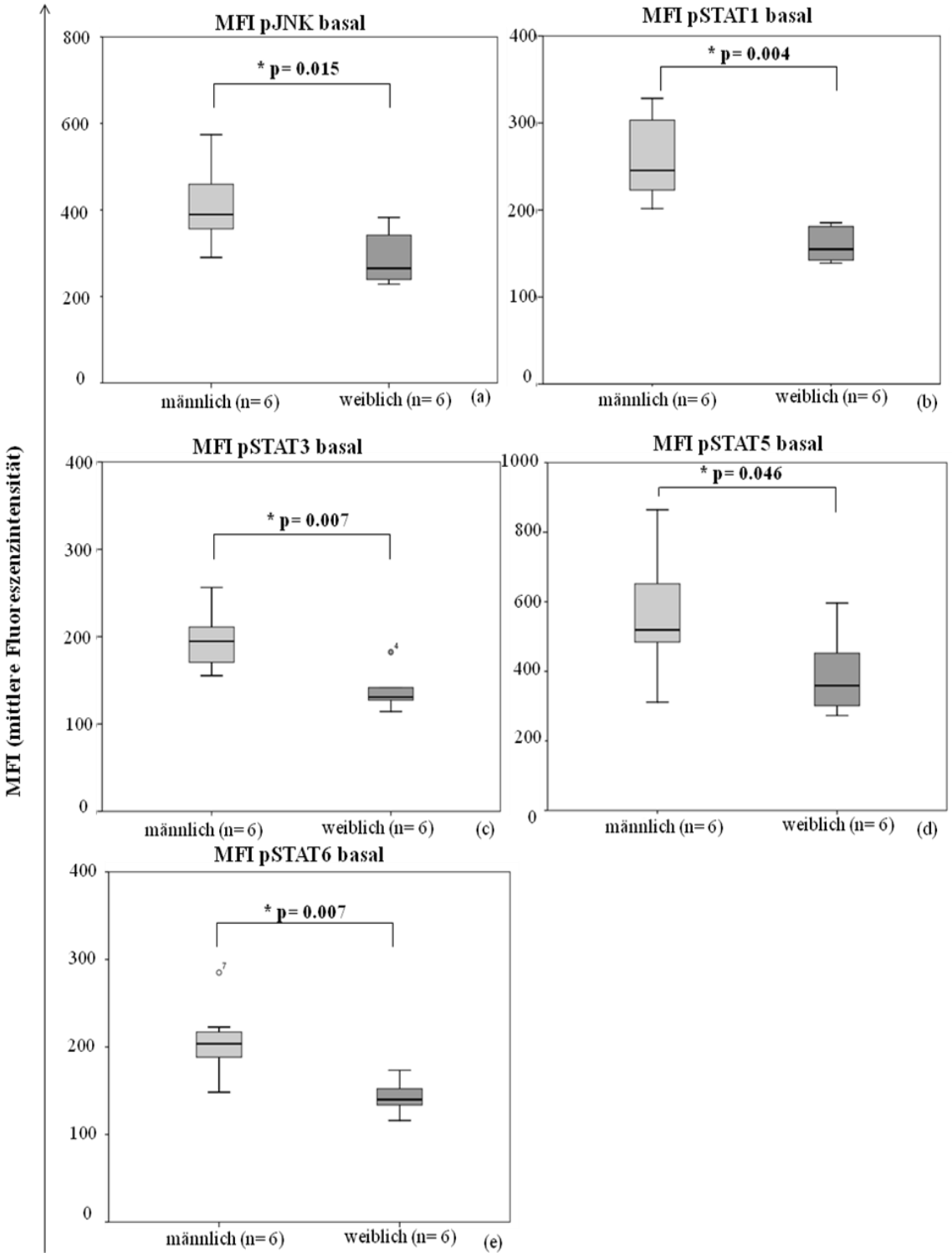


Abbildung 10: Subgruppenanalyse der basalen Phosphorylierung der Signaltransduktionsproteine anhand des Geschlechts

Die basalen Werte der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI-Werte) der primären Leukämiezellen aus dem NOD/SCID-Maus-Xenotransplantationsmodell von sechs männlichen Patienten (hellgrauer Balken) wurde den Werten von sechs weiblichen Patientinnen (dunkelgrauer Balken) gegenübergestellt. Signifikante Unterschiede zwischen den zwei Subguppen wurden mit dem U-Test mit $p<0.05$ bestimmt.

Abkürzungen: MFI= mittlere Fluoreszenzintensität; n= untersuchte Fallzahl; pJNK= phosphorylisierte Januskinase; pSTAT= engl.: „signal transducers and activators of transcription", phosphorylisiertes Signaltransduktionsprotein der Familie der Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription; * $p<0.05$, signifikant (U-Test)

Als weiteres Kriterium zur Subgruppenbildung wurde die Leukozytenzahl zum Diagnosezeitpunkt herangezogen. Eine Hyperleukozytose mit mehr als 50000 Zellen/ µl Blut zum Zeitpunkt der Diagnose ließ sich bei vier Patienten messen. Die Zellen dieser Patienten zeigten beim Vergleich der basalen MFI-Werten keine statistisch signifikanten Unterschiede, jedoch eine tendenziell stärkere basale Phosphorylierung von ERK (Abbildung 11).

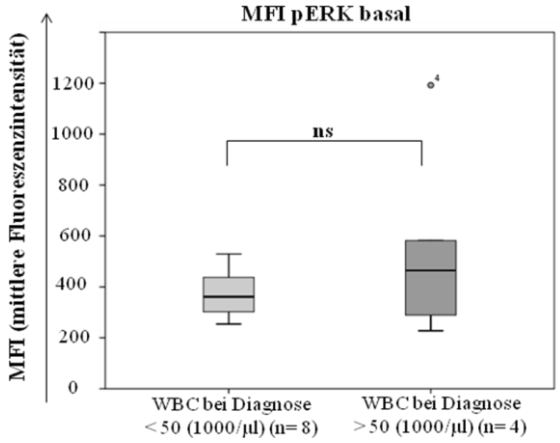


Abbildung 11: Subgruppenanalyse der basalen Phosphorylierung von ERK anhand der Anzahl der Leukozyten zum Diagnosezeitpunkt
Die primären Leukämiezellen aus dem NOD/SCID-Maus-Xenotransplantationsmodell wurden anhand der gemessenen Leukozytenzahl zum Diagnosezeitpunkt von unter (hellgrauer Balken) oder über (dunkelgrauer Balken) 500000/µl in zwei Subgruppen eingeteilt. Die basalen MFI-Werte von pERK beider Gruppen sind hier dargestellt.
Abkürzungen: MFI= mittlere Fluoreszenzintensität; n= untersuchte Fallzahl; ns= nicht signifikant; pERK= phosphorylisierte extrazellulär regulierte Signal-Kinase 1/2; WBC= engl.: „white blood cell count“, Anzahl der Leukozytenzahl

Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal war das Eintreten eines Rezidivs. Ein Patient verstarb während der Therapie und wurde bei dieser Einteilung nicht mit untersucht. Die Fallzahl lag damit bei elf. Es wurde bei den primären Leukämiezellen der Patienten mit einem Rezidiv eine stärkere basale Phosphorylierung bei allen Phosphoepitopen festgestellt. Statistisch signifikant waren die Unterschiede bei ERK und p38 (Abbildung 12).

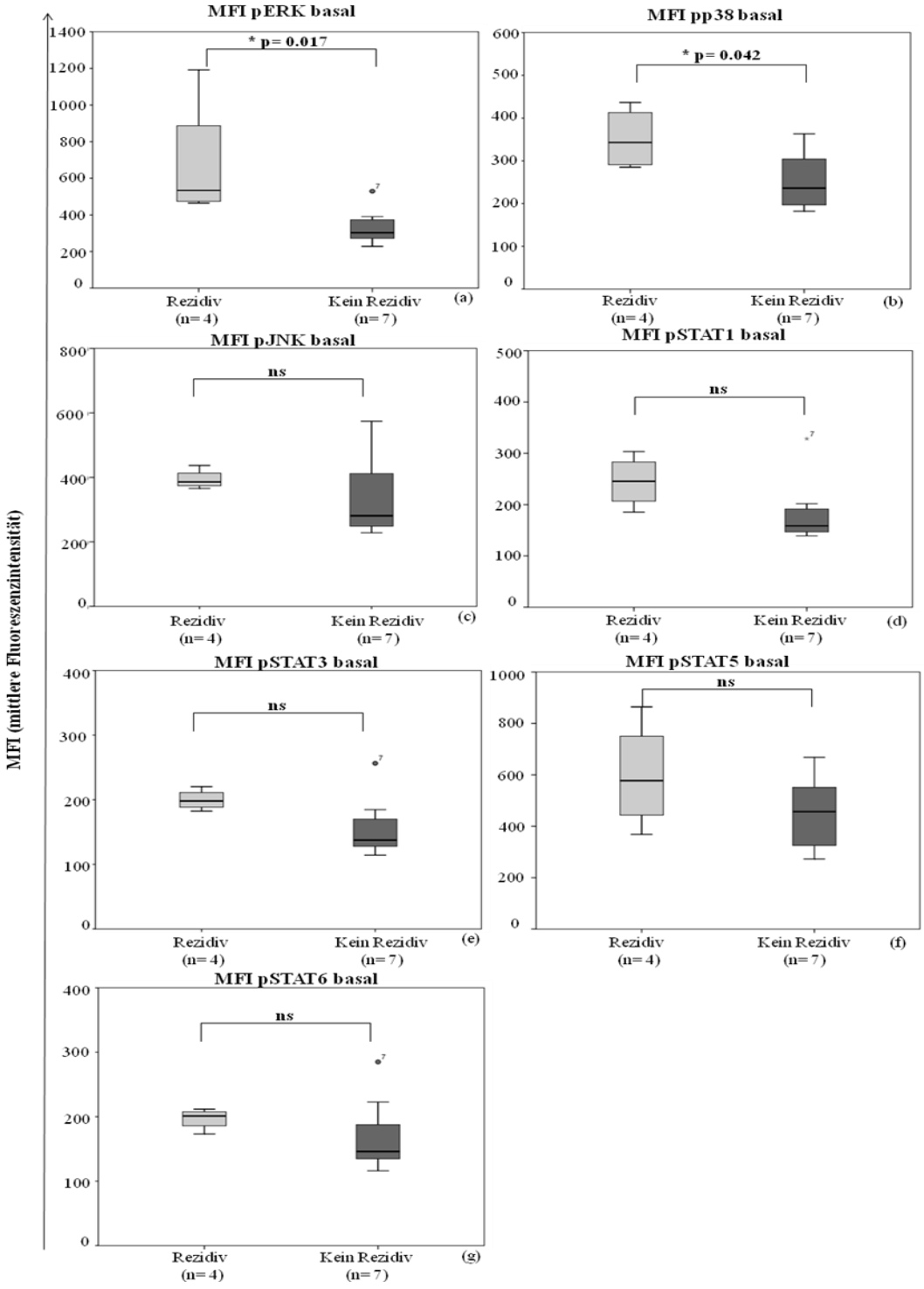


Abbildung 12: Subgruppenanalyse der basalen Phosphorylierung der Signaltransduktionsproteine anhand des Auftretens eines Rezidivs bei den Patienten

Die Einteilung der Subgruppen der primären Leukämiezellen aus dem NOD/SCID-Maus-Xenotransplantationsmodell erfolgte anhand des Auftretens eines Rezidivs bei den Patienten (hellgrauer Balken) und ein Rezidivfreies Überleben (dunkelgrauer Balken). Mit dem U-Test konnte ein signifikanter Unterschied (* $p < 0,05$) bei pERK und pp38 nachgewiesen werden.

Abkürzungen: MFI= mittlere Fluoreszenzintensität; n= untersuchte Fallzahl; ns= nicht signifikant; pERK= phosphorylisierte extrazellulär regulierte Signal-Kinase 1/2; pJNK= phosphorylisierte Januskinase; pp38= phosphorylisiertes Protein des Mitogen aktivierten Proteinkinase Signalwegs; pSTAT= engl.: „signal transducers and activators of transcription", phosphorylisiertes Signaltransduktionsprotein der Familie der Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription; * $p<0.05$, signifikant (U-Test)

Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose wurde als weiterer prognostischer Faktor zur Subgruppenbildung herangezogen und zeigte wie die Subgruppenbildung anhand des Nachweises des TEL/AML Fusionsgens keine unterschiedliche basale Phosphorylierung der Signaltransduktionsproteine. Jedoch war es möglich, die genannten beiden Subgruppen nach der Stimulation anhand der fold change Werte voneinander zu unterscheiden.

Eine stärkere Phosphorylierung von pERK nach der Stimulation mit PMA und IL-7 konnte bei den Zellen der Patienten ohne das TEL/AML Fusionsgen gemessen werden. Zum Vergleich wurde die basale Phosphorylierung von ERK bei den Subgruppen dargestellt und zeigte eine zwar nicht signifikante, aber höhere Aktivität bei den Zellen der Patienten mit dem TEL/AML Fusionsgen (Abbildung 13).

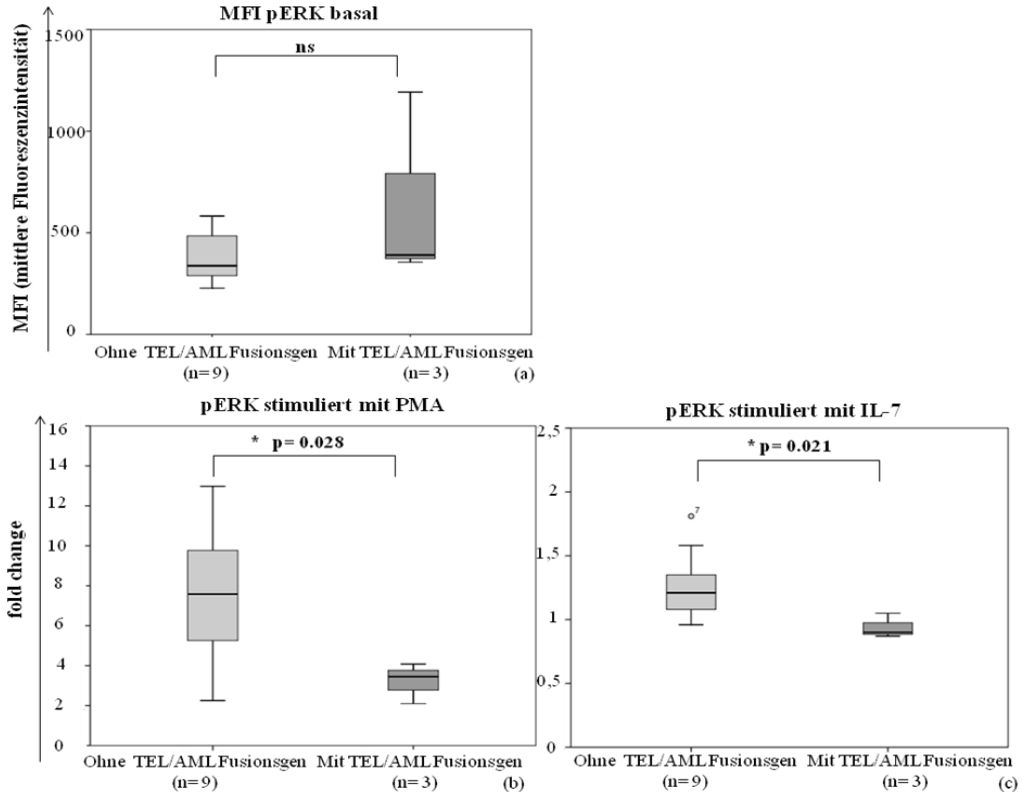


Abbildung 13: Subgruppenanalyse der Phosphorylierung von pERK basal und nach der Stimulation anhand der Expression des Fusionsgens TEL/AML

Die primären Leukämiezellen aus dem NOD/SCID-Maus-Xenotransplantationsmodell wurden anhand der Expression des TEL/AML Fusionsgens in Subgruppen geteilt (dunkelgrauer Balken= Expression TEL/AML und hellgrauer Balken= kein Nachweis von TEL/AML). Nach der Stimulation mit PMA (b) und IL-7 (c) konnten zwischen diesen beiden Subgruppen mit dem U-Test signifikante Unterschiede in der Phosphorylierung von ERK anhand der fold change Werte gemessen werden. Zum Vergleich wurde die basale Phosphorylierung von ERK mittels der MFI-Werte dargestellt (a).

Abkürzungen: fold change Werte (fold change= $MFI_{stimuliert}/MFI_{unstimuliert}$); IL= Interleukin; MFI= mittlere Fluoreszenzintensität; n= untersuchte Fallzahl; ns= nicht signifikant; pERK= phosphorylisierte extrazellulär regulierte Signal-Kinase 1/2; PMA= Phorbol-12-Myristat-13-Azetat; * $p<0.05$, signifikant (U-Test)

Bei den Zellen der Patienten, denen hinsichtlich ihres Alters eine bessere Prognose zugeschrieben wurde (älter als ein Jahr und jünger als neun Jahre), ließ sich nach der Stimulation mit IL-7 bei p38 eine signifikant gesteigerte Phosphorylierung messen. Bereits basal wurde bei den Zellen der Patienten, die zum Diagnosezeitpunkt zwischen einem und neun Jahren alt waren, eine stärkere Aktivität beobachtet

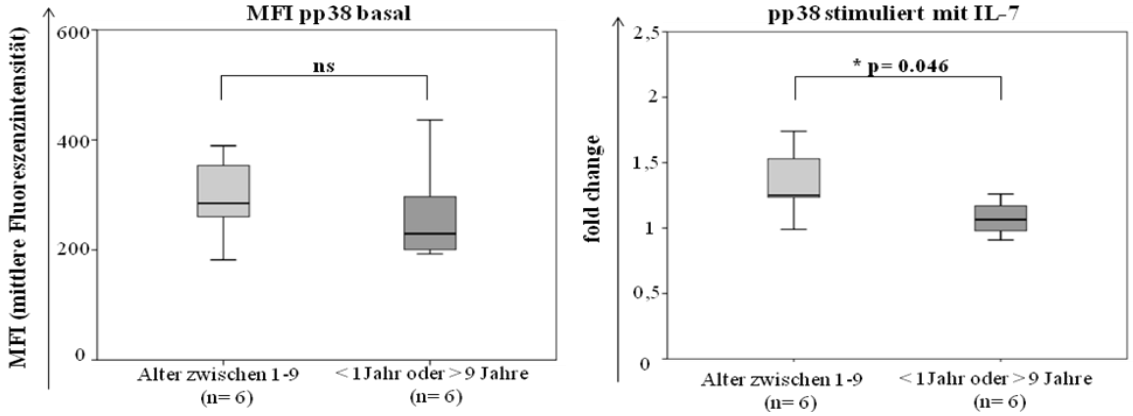


Abbildung 14: Subgruppenanalyse der Phosphorylierung von p38 basal und nach der Stimulation anhand des Erkrankungsalter

Eine bessere Prognose wird Patienten mit einem Erkrankungsalters zwischen einem und neun Jahren zugeschrieben (hellgrauer Balken). Die primären Leukämiezellen aus dem NOD/SCID-Maus-Xenotransplantationsmodell wurden anhand dieser Altersgrenzen in zwei Subgruppen (dunkelgrauer Balken= jünger als ein Jahr oder älter als zehn) eingeteilt und die Phosphorylierung der untersuchten Signaltransduktionsproteine basal und nach der Stimulation gemessen. Mit dem U-Test konnte zwischen den Subgruppen bei der Phosphorylierung von p38 nach der Stimulation mit IL-7 ein statistisch signifikanter Unterschied anhand der fold change Werte dargestellt werden (b). Zum Vergleich wurde die basale Phosphorylierung von p38 mittels der MFI-Werte aufgezeigt (a).

Abkürzungen: fold change Werte (fold change= $MFI_{stimuliert}/MFI_{unstimuliert}$); IL= Interleukin; MFI= mittlere Fluoreszenzintensität; n= untersuchte Fallzahl; ns= nicht signifikant; pp38= phosphorylisiertes Protein des Mitogen aktivierten Proteinkinase Signalwegs;* $p<0.05$, signifikant (U-Test)

Bei den primären Leukämiezellen der Patienten mit einer Hyperleukozytose zum Diagnosezeitpunkt zeigte sich nach der Stimulation mit PMA eine stärkere Phosphorylierung von JNK, als bei den übrigen Patienten. Basal hingegen zeigte sich kein Unterschied bei den MFI-Werten.

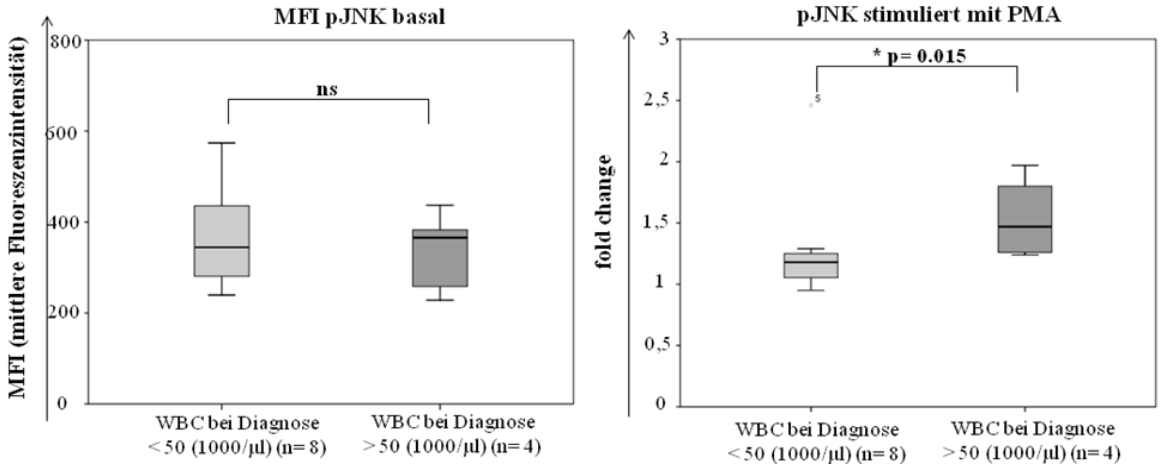


Abbildung 15: Subgruppenanalyse der Phosphorylierung von JNK basal und nach der Stimulation anhand der Leukozytenanzahl zum Diagnosezeitpunkt
Die primären Leukämiezellen aus dem NOD/SCID-Maus-Xenotransplantationsmodell wurden anhand der Leukozytenzahl zum Diagnosezeitpunkt in zwei Subgruppen eingeteilt. Die erste Subgruppe hatte zum Diagnosezeitpunkt mehr als 500000/µl Leukozyten (dunkelgrauer Balken) und wurde der zweiten Gruppe, mit weniger (hellgrauer Balken) gegenübergestellt. Die Phosphorylierung von JNK auf die Stimulation mit PMA bot eine signifikante Unterscheidungsmöglichkeit der beiden Gruppen anhand der fold change Werte (b). Zum Vergleich wurde die basale Phosphorylierung von JNK mittels der MFI-Werte dargestellt (a).
Abkürzungen: MFI= mittlere Fluoreszenzintensität; ns= nicht signifikant; n= untersuchte Fallzahl; pJNK= phosphorylisierte Januskinase; PMA= Phorbol-12-Myristat-13-Azetat; WBC= engl.: „white blood cell count“, Anzahl der Leukozytenzahl; * $p<0.05$, signifikant (U-Test)

In weiteren Versuchen unserer Forschungsgruppe konnte eine unterschiedliche Dauer nach der Transplantation der primären Leukämiezellen bis zur Entwicklung der Leukämie in der Maus beobachtet werden. Die erste Gruppe beinhaltete fünf samples, die innerhalb von zehn Wochen nach der Transplantation der primären Leukämiezellen erkrankten (TTL^{short}, engl.: „time to leukemia short“). Die zweite Gruppe bestand aus acht samples, die erst nach zehn Wochen erkrankten (TTL^{long}, engl.: „time to leukemia long“).
Es war kein statistisch signifikanter Unterschied bei den basalen oder stimulierten Werten zwischen den Proben der TTL^{short} und TTL^{long} Gruppe zu beobachten.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde mit der Durchflusszytometrie der basale und stimulierte phosphorylisierte Zustand (Brown et al., 2015) (Ilangumaran et al., 2003) (Krutzik and Nolan, 2003) (Krutzik et al., 2005) (Krutzik and Nolan, 2006) (Perez and Nolan, 2002) von ausgewählten MAPK- und STAT-Signaltransduktionsproteinen als Regulatoren der Apoptose, Zellproliferation und -differenzierung (Bromberg et al., 1996) (Cressman et al., 1996) (Fukada et al., 1996) (Haccard et al., 1993) (Kaplan et al., 1996a) (Kaplan et al., 1996b) (Mui et al., 1995b) (O'Shea et al., 2015) (Pages et al., 1993) (Santabarbara-Ruiz et al., 2015) (Takeda et al., 1997) (Takeda et al., 1999) (Thierfelder et al., 1996) untersucht. Die Bestätigung der Sensitivität dieser, als Phosphoflow bezeichneten Methode erfolgte mit peripheren Lymphozyten von gesunden Kontrollprobanden.

B- und T-Lymphozyten entwickeln sich aus einer pluripotenten Stammzelle im Knochenmark (Abramson et al., 1977). Die Bedeutung der Signaltransduktionsproteine an der Aufrechterhaltung von Stammzellen konnte anhand von Zellen ohne JAK2 von Akada gezeigt werden (Akada et al., 2014). In den Zellen ohne JAK2 ließ sich eine gesteigerte Aktivität von p38, eine vermehrte Apoptose sowie Defekte in der Signalübermittlung von STAT5 und ERK messen (Akada et al., 2014). Durch die anschließende Reifung und Differenzierung der Stammzellen können die B- und T-Lymphozyten nicht nur anhand der Expression von Oberflächenmarkern, sondern auch durch ihre Wirkung im spezifischen humoralen und zellulären Immunsystem unterschieden werden. Entsprechend unseren Erwartungen ließen sich Unterschiede in der Aktivität der Signaltransduktionswege zwischen den B- und T-Lymphozyten bei allen untersuchten Signaltransduktionsproteinen, mit einer Ausnahme bei STAT5, darstellen. Die höheren basalen Werte wurden, ausgenommen bei STAT1, bei den B-Lymphozyten gemessen. Bei den B- und T-Lymphozyten zeigte sich insgesamt ein sehr heterogenes Bild der basalen Phosphorylierung der untersuchten Signaltransduktionsproteine.

Die Reproduzierbarkeit des Versuchsablaufes konnte durch die dreifache Messung von ausgewählten B- und T-Vorläufer-Leukämiezelllinien zu verschiedenen Zeitpunkten, mit kaum voneinander abweichenden Werten, bestätigt werden. Der Mittelwert aus diesen drei Messungen wurde zur Gegenüberstellung der aktivierten Signaltransduktionswege bei den B- und T-Vorläufer-Leukämiezelllinien herangezogen. Van der Sligte zeigte 2015 eine stärkere Phosphorylierung von JNK bei den B-ALL-Zellen im Vergleich zu den T-ALL-Zellen (van der Sligte et al., 2015) und auch Adamaki stellte bei den Zellen der B-ALL

eine stärkere Phosphorylierung von STAT3 im Vergleich zu Zellen einer T-ALL fest (Adamaki et al., 2015). Beides konnte bei den in dieser Arbeit untersuchten B-und T-Vorläufer-Leukämiezelllinien nicht bestätigt werden. Jedoch können primäre Leukämiezellen, wie bei van der Sligte (van der Sligte et al., 2015) und Adamaki (Adamaki et al., 2015), nicht mit Vorläufer-Leukämiezelllinien verglichen werden. Bei allen untersuchten Signaltransduktionsproteine zeigte sich bei den untersuchten T-Vorläufer-Leukämiezelllinien eine höhere basale Aktivität der Signaltransduktionswege als bei den B-Vorläufer-Leukämiezelllinien. Die Diagnose einere T-ALL wurde im Vergleich zu einer B-ALL vermehrt bei älteren und männlichen Patienten mit einer erhöhten Leukozytenzahl und einer vermehrten extramedulläre Organbeteiligung gestellt, was alles mit einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht werden konnte (Chiaretti et al., 2013) (Hunger and Mullighan, 2015) (Nguyen et al., 2008) (Pullen et al., 1999). Die von Pullen (Pullen et al., 1999) beschriebene erhöhte Leukozytenzahl wird durch die fehlregulierte Zellzykluskontrolle (Chin et al., 1996) erreicht und kann die gesteigerte Aktivität der Signaltransduktionsproteine bei den T-Vorläufer-Leukämiezelllinien erklären.
Neben der Messung der basalen Aktivität der Signaltransduktionswege konnten mit Hilfe der Durchflusszytometrie unterschiedliche Reaktionen auf die Stimulation mit Wachstumsfaktoren dargestellt (Montag and Lotze, 2006) und die Bedeutung der Signaltransduktionswege in der Übermittlung von Wachstumsfaktoren verifiziert werden (Kaplan et al., 1996a) (Shimoda et al., 1996). Fleisher stellte bereits 1999 in Monozyten und Lymphozyten mit der Durchflusszytometrie eine gesteigerte Aktivität von STAT1 nach der Stimulation mit Interferon-gamma fest (Fleisher et al., 1999).

Nach der Stimulation ließ sich bei den B- und T-Lymphozyten ein homogenes Aktivierungsmuster der MAPK-Kinasen darstellen. Eine signifikant stärkere Phosphorylierung von p38 zeigte sich bei den T-Lymphozyten nach der Stimulation mit PMA. Die T-Lymphozyten reagierten im Vergleich zu den B-Lymphozyten auf die verschiedenen Stimulationen bei allen STAT-Proteinen mit einer stärkeren Phosphorylierung. Die Stimulation mit IL-6 zeigte eine signifikant stärkere Phosphorylierung von STAT1 und STAT3 bei den T-Lymphozyten und bestätigte die Ergebnisse von Friederichs (Friederichs et al., 2001). Bei STAT3 konnte außerdem nach der Stimulation mit IL-10 eine signifikant verstärkte Phosphorylierung bei den T-Lymphozyten gemessen werden. In vorangegangenen Studien reagierten reife T-

Lymphozyten im Gegensatz zu reifen B-Lymphozyten auf die Stimulation mit IL-7 mit einer Aktivierung der Zellproliferation (Dadi et al., 1993) (Roifman et al., 1992) (Welch et al., 1989). In der vorliegender Arbeit konnte nach der Stimulation mit IL-7 bei STAT5 eine gesteigerte Phosphorylierung bei den T-Lymphozyten gemessen werden. Mutationen im IL-7-Rezeptor führen zu einer Aktivierung des daran angebundenen STAT5 Signaltransduktionsweg in T-ALL-Zellen (Bandapalli et al., 2014) (Zenatti et al., 2011) (Kontro et al., 2014). Die Stimulation mit IL-7 zeigte in Studien von Barata unterschiedliche Reaktion bei T-Leukämiezellen und reifen T-Lymphozyten (Barata et al., 2001) (Barata et al., 2004). Auch in der vorliegenden Arbeit konnten Unterschiede der aktivierten Signaltransduktionswege zwischen den Vorläufer-Leukämiezellen und den peripheren Lymphozyten festgestellt werden. Um die Unterschiede aufzuzeigen, erfolgte eine Gegenüberstellung der basalen und stimulierten Signaltransduktionsproteine von B-Lymphozyten, B-Vorläufer-Leukämiezelllinien und den primären B-Leukämiezellen aus dem NOD/SCID-Maus-Xenotransplantationsmodell.

Studien belegten, dass konstitutiv aktivierte Signaltransduktionsproteine in menschlichen Tumorzellen durch einen Verlust der normalen Proliferationskontrolle mit fehlender Differenzierung und fehlregulierter Apoptose zur malignen Progression und Transformation beitragen (Bromberg et al., 1999) (Catlett-Falcone et al., 1999) (Mansour et al., 1994) (Niu et al., 1999) (Turkson et al., 1998). Untersuchungen in Patientenproben sowie in *in vivo* und *vitro* Modellsystemen detektierten in leukämischen Zellen eine gesteigerte Aktivität von STAT1, 3 und 5 (Gomes et al., 2014) (Gouilleux-Gruart et al., 1996) (Redell et al., 2011) (Redell et al., 2013) (Tasian et al., 2012) (Weber-Nordt et al., 1996) und zeigte neue potentielle therapeutische Ansätze auf (Maude et al., 2015). Mehrere Studien konnten eine konstitutive STAT-Aktivierung in bis zu 95 % bei Leukämiezellen nachweisen (Birkenkamp et al., 2001) (Chai et al., 1997) (Gouilleux-Gruart et al., 1996) (Hayakawa et al., 1998) (Spiekermann et al., 2002) (Weber-Nordt et al., 1996). In Leukämiezellen wurde in 35-95 % eine gesteigerte Aktivierung des MAPK/ERK Signalwegs beobachtet (D'Angelo et al., 2009) (Gregorj et al., 2007) (Kim et al., 1999) (Milella et al., 2001) (Ricciardi et al., 2005) (Towatari et al., 1997) (van der Sligte et al., 2015).

Den Studien entsprechend ließ sich in unserer Arbeit bis auf p38 bei allen Phosphoepitopen eine stärkere basale Aktivierung, sowohl bei den Leukämiezelllinien, als

auch bei den primären Leukämiezellen, messen. Nach der Stimulation mit verschiedenen Wachstumsfaktoren konnte bei den B-Lymphozyten neben der stimulierenden Wirkung der Wachstumsfaktoren auch eine hemmende Wirkung auf die Phosphorylierung der Signaltransduktionsproteine gemessen werden. Bei den Vorläufer-Leukämiezelllinien und den primären Leukämiezellen aus dem NOD/SCID-Maus-Xenotransplantationsmodell hingegen zeigte sich nur eine geringere oder gar keine Zunahme der Phosphorylierung der Signaltransduktionsproteine auf die verschiedenen Stimulationen. Die bereits basal erhöhte Aktivität der Signaltransduktionsmoleküle und fehlende Stimulierbarkeit bei den Leukämiezellen spiegelte die Wachstumsfaktoren unabhängige Proliferation wider (Almendral et al., 1988) (Chai et al., 1997) (Hanahan and Weinberg, 2011). In gesunden Zellen beobachtete Almendral bereits 1988 ohne Wachstumsfaktoren ein Wachstumsstopp (Almendral et al., 1988). Sehr viele Studien beschäftigten sich bereits mit der basalen Aktivitätssteigerung in Tumorzellen. Redell zeigte eine fehlende Steigerung der Aktivität von bereits basal aktiviertem STAT5 durch die Stimulation mit Wachstumsfaktoren in AML-Zellen (Redell et al., 2013). Onishi stellte bereits 1998 in Zellen mit einer konstitutiv aktiven Form von STAT5 eine Wachstumsfaktoren unabhängige Proliferation fest (Onishi et al., 1998). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass die HTLV-1 Infektion von T-Leukämiezelllinien mit einer IL-2 unabhängigen konstitutiven Aktivierung von STAT3 und 5 einhergeht (Migone et al., 1995) (Takemoto et al., 1997) (Zhang et al., 2015). In v-abl infizierten Zellen wurde eine Aktivierung des JAK/STAT Signalweges (Danial et al., 1998) und in EBV-infizierten Zellen eine Aktivierung von STAT1 und 3 nachgewiesen (Weber-Nordt et al., 1996). An der Pathogenese der T-Prolymphozyten-Leukämie wurde die Mutation des JAK/STAT-Signalweges als onkogener Stimulus nachgewiesen (Kiel et al., 2014). Studien mit Onkogenen, wie beispielsweise dem Ras-Onkogen, lieferten die Bestätigung der Beteiligung der Signaltransduktionsmoleküle an der Tumorbildung und Tumorproliferation (Dent et al., 1992) (Howe et al., 1992) (Knight and Irving, 2014) (Kyriakis et al., 1992) (MacKenzie et al., 1999) (Moodie et al., 1993) (Satoh et al., 1991) (Wood et al., 1992). Das Ras-Onkogen stimuliert die MAPK-Kinasen (Bos et al., 1987) (Leevers and Marshall, 1992) (Moodie et al., 1993) (Stokoe et al., 1994) und wurde in bis zu 30 % aller menschlichen Krebsarten aktiv nachgewiesen (Case et al., 2008) (Farr et al., 1988) (Flotho et al., 1999) (Johnson et al., 2014) (McCubrey et al., 1998) (Paulsson et al., 2008) (Stirewalt et al., 2001) (Xia et al., 1998). Messina zeigte 2016 in ihren Studien eine Aktivierung des RAS/RTK Signalweg in 30 % bei pädiatrischen ALL-Patienten ohne Fusionsgene und assoziierte dies mit einem kürzeren krankheitsfreien Überleben, ohne

jedoch Auswirkungen auf das Langzeit-Überleben zu haben (Messina et al., 2016). Anders bei erwachsenen Patienten mit einer RAS-Mutation, bei denen schlechtere Überlebenschancen beobachtet wurden (Messina et al., 2016). Bei Patienten mit einem Rückfall und Hochrisikopatienten konnte bis zu 40 % diese Mutation dargestellt werden (Driessen et al., 2013) (Irving et al., 2014) und dabei in ALL-Zellen ein höheres Level von ERK nachgewiesen werden (George et al., 2015). Neben dem RAS-Onkogen zeigte sich in *in vitro* Experimenten die Beteiligung von weiteren Onkogenen, wie c-und v-Eyk (Besser et al., 1999) (Zong et al., 1996) oder src an der Tumorentstehung (Cao et al., 1996) (Chaturvedi et al., 1997) (Garcia et al., 1997) (Sinibaldi et al., 2000) (Yu et al., 1995). STAT3 wurde dabei aktiviert in der onkogenen Transformation der Zellen mit v-src (Bromberg et al., 1998b) (Turkson et al., 1998) nachgewiesen. In weiteren Studien konnte STAT3 direkt ein onkogenes Potential zugeschrieben werden (Bromberg et al., 1999). Die Aktivierung von STAT3 im Kolon-Karzinom wurde mit einer ungünstigen Prognose in Verbindung gebracht (Morikawa et al., 2011). Bei Patienten, die an ihrer malignen Erkrankung verstarben konnte im Vergleich zu Patienten, die überlebten ein höheres Transkriptionslevel von STAT1 und 3 gemessen werden (Adamaki et al., 2015). Neben verschiedenen Onkogenen zeigten auch Fusionsproteine, wie beispielsweise das BCR/ABL Fusionsprotein, Einfluss auf die Aktivierung von STAT-Proteinen zu haben (Carlesso et al., 1996) (Chai et al., 1997) (Ilaria and Van Etten, 1996) (Nieborowska-Skorska et al., 1999).

Das TEL/AML Fusionsgen (auch als ETV6/RUNX bekannt), als Beispiel für ein weiteres Fusionsgen, wurde in vorangegangen Studien der ALL als prognostischer Faktor mit einer guten Prognose gewertet (Borkhardt et al., 1997) (Pui et al., 2010) (Shurtleff et al., 1995). Bei pädiatrischen ALL-Patienten ist dieses Fusionsgen mit etwa 25 % das am häufigsten nachgewiesene Fusionsgen (Chiaretti et al., 2013). Neben genetischen Risikofaktoren werden in der aktuellen internationalen Therapieoptimierungsstudie AIEOP-BFM ALL 2009 zu Beginn der Therapie Risikomerkmale wie das Ansprechen auf Prednison, das Erreichen der Remission sowie die Diagnostik der MRD (Flohr et al., 2008) (Pui et al., 2004) (Pui et al., 2015) (Schrappe et al., 2000b) (Silverman and Sallan, 2003) zur Stratifizierung von Risikogruppen herangezogen. Die genannten Stratifizierungsmerkmale leiten sich aus vorangegangenen Studien ab (Gaynon et al., 2010) (Moricke et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurden primäre Leukämiezellen aus dem NOD/SCID-Maus-Xenotransplantationsmodell von zwölf Patienten anhand von Risikomerkmalen aus vorherigen Therapieoptimierungsstudien in Subgruppen aufgeteilt. Diese Merkmale

richteten sich nach klinischen Faktoren, wie dem Alter (zwischen einem und neun Jahren oder jünger und älter) und Leukozytenzahl (unter oder oberhalb 50000/µl) zum Diagnosezeitpunkt, dem Geschlecht sowie zytogenetische Aberrationen, wie das Fusionsgen (Nachman et al., 1997) (Nachman et al, 1998) (Pullen et al., 1999) (Pui et al., 2003a) (Reiter et al., 1994) (Schrappe et al., 2000a) (Teachey and Hunger, 2013) (Nguyen et al., 2008). Ein Patient verstarb während der Therapie, vier weitere erlitten einen Rückfall ihrer Erkrankung. Diese vier Patienten bildeten eine weitere Subgruppe. Alle untersuchten Patienten reagierten mit einem guten Ansprechen auf die Prednison Phase (PGR: engl.: „prednison-good-response“), so dass dieser wichtige Stratifizierungswert (Dordelmann et al, 1999) nicht auf unterschiedliche Aktivierungen der Signaltransduktionswege untersucht werden konnte. Außerdem wurde ein in unserer Arbeitsgruppe erforschter Risikofaktor zur Subgruppenbildung herangezogen. Dieser neue Risikofaktor richtete sich nach der Zeit (TTL: engl.: „time to leukemia“) von der Transplantation der primären Leukämiezellen bis zur Entwicklung der Leukämie (Meyer et al., 2011) im NOD/SCID-Maus-Xenotransplantationsmodell (Baersch et al., 1997) (Borgmann et al., 2000) (Kamel-Reid et al., 1989).

Wir stellten die Hypothese auf, dass sich Zellen von ALL-Patienten mit unterschiedlichen prognostischen Faktoren in der Aktivität der Signaltransduktionsmoleküle nicht nur unterscheiden, sondern mit Unterstützung dieser Unterschiede den Risikogruppen ein spezifisches Aktivierungsmuster zugeschrieben werden kann (Irish et al., 2004). Eine erhöhte Proliferationsrate *in vitro* konnte mit einer schlechteren Prognose assoziiert werden (Kumagai et al., 1996). So vermuteten wir, dass in Zellen von Patienten mit einer vermeintlich schlechteren Prognose insbesondere Signaltransduktionswege aktiviert sind, die eine Beteiligung an der Zellproliferation haben. Bei den Signalwegen, die in der Apoptoseregulierung involviert sind, vermuteten wir hingegen eine gesteigerte Aktivität in der Subgruppe mit einer besseren Prognose. In Studien unserer Arbeitsgruppe konnte die intakte Apoptoseregulierung in Zellen von Patienten mit einer ALL mit einer guten Prognose in Verbindung gebracht werden (Meyer et al., 2006) (Meyer et al., 2011) (Queudeville et al., 2012). Vorangegangene Studien untersuchten die Assoziation zwischen der Apoptoseregulierung und der Prognose der AML (Campos et al., 1993) (Del Poeta et al., 2003) (Ong et al., 2000).

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Signaltransduktionswegen p38 (Lu et al., 2006), JNK (Paiva et al., 2015) (Santabarbara-Ruiz et al., 2015) (Verheij et al., 1996) (Xia et al., 1995)

und STAT1 (Bromberg et al., 1996) (Bromberg et al., 1998a) (Chin et al., 1996) (Kumar et al., 1997) (Sironi and Ouchi, 2004) (Spiekermann et al., 2002) (Xu et al., 1998) ließ sich eine Beteiligung in der Apoptoseregulierung nachweisen. Bei JNK wurde eine erhöhte Aktivität bei den Zellen der männlichen Patienten im Vergleich zu den Zellen der Patientinnen gemessen. JNK konnte jedoch in weiteren Studien ebenfalls mit einer Tumorprogression in Verbindung gebracht werden (Cui et al., 2009) (Gururajan et al., 2005) (Heasley and Han, 2006). Welche Wirkung die Aktivierung von JNK auf Zellen hatte, war in Studien davon abhängig, ob eine persistierende oder eine Aktivierung, zum Beispiel durch Wachstumsfaktoren (Heasley et al., 1996) (Xia et al., 1995) nachzuweisen war. Außerdem ließ sich je nach Tumorstadien eine unterschiedliche Wirkung von aktivierten JNK feststellen (Engelberg, 2004). In Zellen von männlichen Patienten wurde häufiger als bei den weiblichen eine Mutation im RAS-Onkogen festgestellt (Irving et al., 2014). Auch bei STAT1 ließ sich eine stärke Phosphorylierung bei den männlichen Patienten nachweisen. STAT1 wurde in einer Vielzahl von Tumoren aktiviert vorgefunden (Frank et al., 1997) (Gouilleux-Gruart et al., 1996) (Weber-Nordt et al., 1996). Die Bedeutung des apoptoseregulierenden Signalweges konnte in Zellen mit einer homozygoten Deletionen von STAT1 anhand eines schnelleren Tumorwachstums im Vergleich zu Zellen mit einer normalen Expression von STAT1 bestätigt werden (Kaplan et al., 1998). Warum verhindert also eine gesteigerte Aktivierung von STAT1 nicht die Tumorproliferation? Ein Grund ist die simultane Aktivierung von STAT1 und STAT3 (Bromberg et al., 1998b) mit gleichen Bindungsstellen an der DNS und die Balance der zwei gegensätzlichen zellulären Wirkungen (Avalle et al., 2012) (Chin et al., 1996) (Shen et al., 2001) (Turkson et al., 2001). Es war in Zellen, in denen entweder STAT1 oder 3 gehemmt wurden, überwiegend die Funktion des anderen Signalweges nachzuweisen (Grandis et al., 1998). Adamaki stellte in Patienten, die keinen Rückfall erlitten eine kombinierte verminderte Genexpression von STAT1 und 3 fest und beschrieb dies als guten Prognosefaktor (Adamaki et al., 2015). STAT1 wurde nicht nur eine wichtige Rolle im Ausgleich der Wachstumsstimulation von anderen Signalen zugeschrieben (Bromberg et al., 1998a), sondern auch die Bildung von Heterodimeren aus STAT1 und 3 beobachtet (Zhong et al., 1994b), was die Komplexität der Signaltransduktionskaskade widerspiegelt. Entsprechend diesen Ergebnissen konnte neben der bereits erwähnten gesteigerten Aktivität von STAT1 ebenso eine vermehrte Phosphorylierung von STAT3 bei den Zellen der männlichen Patienten nachgewiesen werden. Die Aktivierung von STAT3 wurde mit einer gesteigerten Proliferation der Zellen in Verbindung gebracht (Catlett-Falcone et al.,

1999) (Cressman et al., 1996) (Fukada et al., 1996) (Niu et al., 1999) (Spiekermann et al., 2002) (Zushi et al., 1998). In Zellen ohne STAT3 kam es zum Wachstumsstopp mit einer gesteigerten Apoptose und es ließ sich sogar eine Regression des Tumors nachweisen (Mora et al., 2002) (Niu et al., 1999). Eine niedrige Expression von STAT3 wurde als ein guter prognostischer Faktor gewertet und vor Allem bei Patienten mit guten Überlebenschancen beobachtet (Adamaki et al., 2015). Bewry zeigte in Ihrer Studie 2008, dass der Proteinkinaseinhibitors Imatinib, welcher bei der Therapie der chronischen myeloischen Leukämie beim Vorliegen des BCR/ABL-Fusionsgen eingesetzt wird, mehr Zellen abtötet, wenn STAT3 weniger aktiv oder gehemmt war (Bewry et al., 2008). Eine konstitutive Aktivierung von STAT3 assoziierte Benekli bei AML-Patienten (akute myeloischen Leukämie) hingegen mit einer kürzeren Überlebenszeit (Benekli et al., 2002). Außerdem wurde STAT3 vermehrt in metastasierten Tumoren (Mora et al., 2002) oder bei Patienten mit einer AML und einem myelodysplastischen Syndrom mit einer schlechteren Prognose (Miltiades et al., 2016) aktiv nachgewiesen.

Neben STAT3 wurde in metastasierten Tumoren ebenfalls eine erhöhte Aktivität von ERK gemessen (Mehta et al., 2003) und stand mit einer schlechteren Prognose in pädiatrischen lymphoproliferativen Erkrankungen in Verbindung (D'Angelo et al., 2009). Als mögliche Ursache für die schlechtere Prognose ließ sich in den Zellen mit einer gesteigerten Aktivität von ERK (Gregorj et al., 2007) oder auch bei Patienten mit dem RAS-Onkogen (Driessen et al., 2013) eine erhöhte Leukozytenzahl messen. Eine Mutation im RAS-Onkogen war in über 84 % mit einer konstitutiven Aktivierung mit ERK assoziiert (Irving et al., 2014). In einem Mäuse-Knochenmarkstransplantat konnte ebenfalls eine erhöhte Leukozytenzahl durch eine JAK3-Mutation mit Aktivierung von JAK1/JAK3, STAT5 und ERK nachgewiesen werden (Degryse et al., 2014). Es wurde zwar bei den Zellen der Patienten, die zum Diagnosezeitpunkt eine Leukozytenzahl über 50000/µl hatten, eine gesteigerte Aktivität von ERK gemessen, aber nicht signifikant erhöht im Vergleich zu den Zellen der Patienten mit einer niedrigeren Leukozytenzahl. Messina stellte in Untersuchungen fest, dass bei ALL-Patienten mit einer Mutation im JAK/STAT Signalweg höhere Leukozytenzahlen vorlagen und stellte gleichzeitig eine Assoziation zum männlichen Geschlecht der Patienten her (Messina et al., 2016). Beides konnte mit den vorliegenden Ergebnissen nicht bestätigt werden. Jedoch schloss Messina bei Ihrer Untersuchung alle Patienten mit Fusionsgenen aus und unterschied sich somit von unseren Untersuchungen, bei denen Patienten mit dem TEL/AML Fusionsgen mit eingeschlossen wurden.

Durch Gregorj konnte pERK bereits als unabhängiger Vorhersagewert für das Erreichen der Remission in der ALL bei Erwachsenen nachgewiesen werden (Gregorj et al., 2007). Hogan beschrieb eine gesteigerte Aktivität von MAPK in Patientenzellen mit einem Rückfall (Hogan et al., 2011), wobei bei Patienten mit einem frühen Rückfall signifikant häufiger eine Mutation im RAS-Onkogen festgestellt wurde (Irving et al., 2014). In dieser Arbeit konnte bei den Zellen der Patienten mit einem Rezidiv im Vergleich zu den restlichen Patienten eine erhöhte Aktivität von ERK gemessen werden und spiegelt die wichtige Bedeutung in der Zellzyklusprogression wider. Bhojwani zeigte mit Genexpressionsanalysen, dass bei Patienten mit einem frühen Rückfall Gene exprimiert werden, die an der Proliferation und am Überleben beteiligt sind (Bhojwani et al., 2006). D`Angelo assoziierte neben der Aktivierung von ERK auch eine Aktivierung von JNK mit einer schlechten Prognose (D'Angelo et al., 2009). In unserer Arbeit stellte sich eine gesteigerte Aktivität von p38 in den primären Leukämiezellen der Patienten mit einem Rückfall dar. Bei ALL-Leukämiezellen wurde eine Phosphorylierung von p38 während der Initiierung des Wachstums *in vitro* nachgewiesen und in der gleichen Studie *in vivo* mit einer Proliferation in Verbindung gebracht (Alsadeq et al., 2015). Eine mögliche Erklärung für die Phosphorylierung von p38 in dieser Phase mit schnellen Wachstum ist, dass zwischen den MAPK-Signalwegen eine enge Verbindung untereinander und somit zum an der Proliferation beteiligtem ERK-Signalweg, nachgewiesen wurde (Aguirre-Ghiso et al., 2003). Außerdem werden p38 und JNK oft simultan durch Stress-Signale aktiviert (Derijard et al., 1995) (Hibi et al., 1993) (Lin et al., 1995) (Minden et al., 1994) (Sluss et al., 1994) (Tibbles et al., 1996) (Xia et al., 1995). Auch bei den STAT-Proteinen ließ sich, wenn auch nicht statistisch signifikant, bei den Zellen der Patienten mit einem Rezidiv, eine gesteigerte Aktivität darstellen.

Ein weiterer wichtiger Prognosefaktor für das Überleben der Patienten ist das Ansprechen auf die Prednison Phase (PGR: engl.: „prednison-good-response“) (Dordelmann et al, 1999). Bei Zellen, die resistent auf Prednisolon sind, wurde eine gesteigerte Aktivität der MAPK-Signalwege nachgewiesen (Jones et al., 2015). Da alle Patienten in dieser Arbeit ein gutes Ansprechen auf Prednisolon zeigten, konnte dies nicht untersucht werden. Verschiedene Reaktionen auf die Chemotherapie untersuchte Irish und stellte fest, dass trotz basal sehr ähnlicher Aktivitätszustände unterschiedliche Werte auf die Stimulationen nachzuweisen waren (Irish et al., 2004). Redell beobachtete in ihren Studien, dass die konstitutive Phosphorylierung von STAT in verschiedenen Zellen der AML sehr

unterschiedlich ausfiel und keine Assoziation zum Überleben hergestellt werden konnte (Redell et al., 2013). Eine schlechte Prognose wurde mit einer vermehrten basalen Aktivierung von STAT3 und 5, sowie starker Reaktion von STAT1 auf die Stimulation assoziiert (Irish et al., 2004). Redell korrelierte eine Reaktion auf die Stimulation mit IL-6 und dem Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (engl.: „Granulocyte-Colony Stimulating Factor“= G-CSF) in der pädiatrischen ALL mit einer guten Prognose (Redell et al., 2013). Es wird spekuliert, dass Zellen, die sensibel auf die Stimulation reagieren auch besser auf eine Chemotherapie ansprechen (Redell et al., 2013).

Nach der Stimulation konnten in dieser Arbeit zwischen den Subgruppen bei den untersuchten STAT-Proteinen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Bei den MAPK-Kinasen ließen sich folgende unterschiedliche Aktivitäten zwischen den Subgruppen nachweisen.

Bei den Zellen der Patienten mit dem TEL/AML (ETV6/RUNX) Fusionsgen, die mit einer besseren Prognose assoziiert werden konnten, zeigte sich im Vergleich zu den Zellen der Patienten ohne das Fusionsgen eine schwächere Phosphorylierung von ERK nach der Stimulation mit PMA und IL-7. Nach der Stimulation ließen sich nur noch zwei weitere signifikante Unterschiede feststellen. Einerseits reagierten die Zellen aus dem Xenotransplantationsmodell der Patienten mit einer guten Prognose hinsichtlich des Alters (zwischen einem und neun Jahren) mit einer stärkeren Phosphorylierung von p38 nach der Stimulation mit IL-7. Andererseits zeigten die Zellen der ALL-Patienten mit einer Leukozytenzahl über 50000/µl, die mit einer schlechteren Prognose verbunden waren, eine stärkere Aktivierung von JNK nach der Stimulation mit PMA. Die bereits basale konstitutive Aktivierung der meisten Signaltransduktionsproteine konnte, wie zuvor in anderen Studien gezeigt (Nielsen et al., 1997), durch das Hinzugeben von Stimulatoren nicht weiter gesteigert werden. Als ein Erklärungsansatz für die fehlende Reaktion auf die Stimulation kann die autokrine und parakrine Produktion von Zytokinen und damit verbundene Unabhängigkeit der Tumorzellen von exogenen Wachstumsfaktoren für die Proliferation genannt werden (Chai et al., 1997) (Li and Shaw, 2002) (Schrader and Crapper, 1983) (Schuringa et al., 2000) (Tosato et al., 1990). In Zellen aus einer IL-3 unabhängigen pro-B-Zelllinie mit einer Mutation bei STAT5 ließ sich ein IL-3 unabhängiges Wachstums messen (Bandapalli et al., 2014). In Zelllinien mit einer JAK3-Mutation wurde eine gesteigerte Phosphorylierung von JAK1, STAT1 und 5 mit einem

Zytokin-unabhängigen Wachstum bis hin zur *in vivo* Entwicklung einer Leukämie dieser Zelllinien beobachtet (Degryse et al., 2014). Neben einer erhöhten Proliferationsrate wurde ebenso eine Dysregulation der Apoptose in der Tumorentstehung und Progression beschrieben (Del Poeta et al., 2003) (Hanahan and Weinberg, 2011).

Anhand des in unserer Forschungsgruppe neu etablierten prognostischen Faktor anhand der Zeit von der Transplantation der primären Leukämiezellen bis zur Entwicklung der Leukämie in der Maus (TTL, engl.: „time to leukemia“) konnten zwei Gruppen gebildet werden. Bei der ersten Gruppe, mit fünf samples, konnte innerhalb von zehn Wochen die Erkrankung nachgewiesen werden (TTL^{short}= engl.: „time to leukemia short“). Die zweite Gruppe bestand aus acht samples, die erst nach zehn Wochen erkrankten (TTL^{long}= engl.: „time to leukemia long“). In Genexpressionsanalysen wurde ein besonders schlechtes Outcome bei Patienten mit einer kürzeren Zeit bis zum Rezidiv festgestellt und mit einer gesteigerten Zellzyklusprogression in den Zellen in Verbindung gebracht (Bhojwani et al., 2006). Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Proben der TTL^{short} und TTL^{long} Gruppen bei der basalen sowie der stimulierten Aktivität der Signaltransduktionsproteine dargestellt werden und wurde anhand von STAT5 auch in weiteren Untersuchungen bestätigt (Hasan et al., 2015). Es ließ sich keine Ursache für die schnellere Anwachszeit und schlechtere Prognose anhand der Aktivität der hier untersuchten Signaltransduktionsproteine nachweisen. Dabei lieferten weitere Untersuchungen des Signaltransduktionsproteins mTOR viel versprechende Ergebnisse und eine Assoziation zur TTL-Zeit (Meyer et al., 2011). In Zellen der TTL^{short} Gruppe ließ sich in Genexpressionsanalysen mTOR hochreguliert nachweisen und bot somit eine mögliche gezielte Therapie durch die Hemmung dieses Signaltransduktionsproteins, wie zum Beispiel durch Rapamycin (Meyer et al., 2011) (Hasan et al., 2015). Die Aktivierung von mTOR wurde in der Zellproliferation beobachtet (Brown et al., 2003) (Soliman, 2013) und eine Verbindung zum raf/MEK/ERK Signalweg beschrieben (Rolfe et al., 2005). In der TTL^{long} Gruppe konnte eine intakte Funktion des Apoptosom anhand einer Cytochrom c abhängigen Aktivierung von Caspase 3 (CRAC-positiv) gezeigt werden, was mit einem guten Ansprechen auf die Therapie und guter Prognose in Verbindung gebracht werden konnte (Queudeville et al., 2012). Bei Patienten der TTL^{short} Gruppe konnte ein höheres Risiko für einen Rückfall nachgewiesen werden (Hasan et al., 2015).

Den dargestellten unterschiedlichen Reaktionen zwischen den anhand von prognostischen Faktoren gebildeten Subgruppen konnte in dieser Arbeit kein widererkennbares Muster zugeschrieben werden. Eine Erklärung ist die Assoziation der prognostischen Faktoren untereinander. So ließen sich zum Beispiel bei Patienten mit dem TEL/AML Fusionsgen weitere klinische Faktoren nachweisen, die mit einer guten Prognose einhergehen, wie zum Beispiel die Assoziation mit dem entsprechenden Alter und einer niedrigen Leukozytenzahl zum Diagnosezeitpunkt (Borkhardt et al., 1997) (Chiaretti et al., 2013) (Schrappe et al., 2000a) (Whitehead et al., 2001). Beim männlichen Geschlecht wurde eine höhere Leukozytenzahl (Messina et al., 2016), älteres Erkrankungsalter (Pui et al., 1999) und häufiger eine T-ALL-Erkrankung (Bandapalli et al., 2014) beobachtet, so dass das männliche Geschlecht nicht per se mit einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht werden kann (Pui et al., 2003b) (Schrappe et al., 2000a) (Silverman et al., 2001). Als ein weiterer Grund für das Fehlen von widererkennbaren Phosphorylierungsmuster der Signaltransduktionsmoleküle ist, dass die Tumorentstehung und -progression ein mehrstufiger komplexer Prozess ist, worin die Regulation der Signaltransduktionsmoleküle nur einen kleinen Schritt darstellt (Hanahan and Weinberg, 2000) (Hanahan and Weinberg, 2011) (Renan, 1993). So ist der MAPK-Signaltransduktionsweg mit 66 aktivierten Peptiden und 60 verschiedene Proteine verbunden (van der Sligte et al., 2015) und es wurde neben einer gegenseitigen Aktivierung (Chung et al., 1997) (David et al., 1995) (Gollob et al., 1999) (Pircher et al., 1997) (Pircher et al., 1999) (Turkson et al., 1999) (Zhang et al., 1995) auch eine hemmende Beziehung (Jain et al., 1998) (Sengupta et al., 1998) zwischen den MAPK- und STAT-Proteinen beschrieben.

Zusammenfassend konnte mit dieser Arbeit die Sensitivität der Methode der Phosphoflow zur Messung von aktivierten Signaltransduktionswegen bestätigt werden. Bei den primären Leukämiezellen und Vorläufer-Leukämiezelllinien ließ sich eine gesteigerte basale Aktivität der Signaltransduktionsproteine und fehlende Stimulierbarkeit im Vergleich zu den Lymphozyten nachweisen.
Es konnten zwischen den, anhand von prognostischen Faktoren gebildeten Subgruppen Unterschiede in der basalen und stimulierten Aktivität von einzelnen Signaltransduktionswegen gemessen werden, aber die Darstellung von wiedererkennbaren Aktivierungs- und Phosphorylierungsmustern zur Risikostratifizierung gelang nicht.

5 Zusammenfassung

Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) ist als Erkrankung des blutbildenden Systems die häufigste maligne Erkrankung im Kindes- und Jugendalter. Durch Therapieoptimierungsstudien konnte die Heilungsrate der pädiatrischen Leukämie auf über 80 % gesteigert werden.

In den letzten Jahren wurde in verschiedenen Studien die bedeutende Rolle der aktivierten Signaltransduktionswege als Regulationsmechanismus von zellulären Prozessen, wie der Proliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose durch die zunehmende Kenntnis der Tumorentstehung auf molekularer Zellebene bestätigt. Die Aktivität der Signaltransduktionsmoleküle der MAPK-Familie (Mitogen-aktivierte Protein-Kinase) mit der extrazellulär regulierten Signal-Kinase (ERK1/2), p38 und c-Jun-NH2-Terminal-Kinase (JNK) sowie die STAT-Proteine (Signaltransduktoren und -aktivatoren der Transkription) STAT1, 3, 5 und 6 wurden in dieser Arbeit mittels der Durchflusszytometrie vor und nach der Stimulation mit Wachstumsfaktoren (PMA, Anisomycin, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10 und INF-α) untersucht.

Die Sensitivität, der als Phosphoflow bezeichneten Methode, wurde in Versuchen mit peripheren Lymphozyten von Kontrollprobanden bestätigt. Die geringe Variabilität der Methode konnte in Versuchen mit B- und T-Vorläufer-Leukämiezelllinien bestätigt werden. Es zeigten sich einerseits zwischen den B- und T-Lymphozyten sowie andererseits zwischen den B- und T-Vorläufer-Leukämiezelllinien Unterschiede in der Aktivität der Signaltransduktionswege.

Im Vergleich von B-Lymphozyten, B-Vorläufer-Leukämiezelllinien und primären Leukämiezellen aus dem NOD/SCID-Maus-Xenotransplantationsmodell (engl.: „Non-Obese Diabetic“, Nicht-fettleibiger-diabetischer-Typ/engl.: „severe combined immunodeficiency”, schwere kombinierte Immundefizienz) zeigte sich als ein charakteristisches Merkmal von Tumorzellen eine gesteigerte basale Aktivität der Signaltransduktionswege. Die Unabhängigkeit der Leukämiezellen von Wachstumsfaktoren spiegelte sich in einer deutlich schwächeren Reaktion auf die Stimulation im Vergleich zu den peripheren Lymphozyten wider.

Im Weiteren richtete sich unser Interesse auf die Hypothese, dass verschiedene Aktivierungs- und Phosphorylierungsmuster mit dem Therapieansprechen korreliert werden können. Zur Darstellung von wiedererkennbaren Aktivierungsmustern wurden die Zellen der zwölf untersuchten primären BCP-ALL-Xenograftproben anhand von

bekannten prognostischen Faktoren in jeweils zwei Subgruppen geteilt. Entsprechend unserer Vermutung, dass sich eine gesteigerte Aktivität der Signaltransduktionswege bei den Zellen der Patienten mit einer schlechteren Prognose messen lassen, konnten die höheren basalen mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI-Werte) bei den Zellen der männlichen Patienten, wie auch bei den Zellen der Patienten, die einen Rückfall erlitten, gemessen werden. Nach der Stimulation konnten weitere Differenzierungsmöglichkeiten der Subgruppen dargestellt werden. So ließ sich in den primären Leukämiezellen der Patienten, die das TEL/AML Fusionsgen exprimierten, eine schwächere Phosphorylierung von ERK nach der Stimulation mit PMA oder IL-7 nachweisen. Nach der Stimulation mit IL-7 konnte eine geringere Phosphorylierung von p38 bei der, anhand des Alters, als Risikogruppe definierten Gruppe (jünger als ein Jahr oder älter als neun Jahre) nachgewiesen werden. Die Zellen der Patienten, bei denen bei der Diagnose mehr als 50000/ µl Leukozyten gemessen wurden, reagierten auf die Stimulation mit PMA mit einer stärkeren Phosphorylierung von JNK, als die der Patienten, deren Leukozytenwert unter 50000/ µl Leukozyten lag.

In unserer Forschungsgruppe wurde mittels des verwendeten Xenotransplantationsmodells ein neuer prognostischer Faktor etabliert und in der vorliegenden Arbeit zur Differenzierung von Subgruppen herangezogen. Dieser Faktor richtete sich nach der unterschiedlichen Dauer (TTL-Zeit, engl.: „time to leukemia“) von der Transplantation der primären Leukämiezellen bis zur Entwicklung der Leukämie in der Maus. Zwischen den Subgruppen anhand der TTL-Zeit zeigten sich keine Unterschiede bei der basalen und stimulierten Phosphorylierung der Signaltransduktionsproteine.

Trotz einzelner Unterscheidungsmöglichkeiten konnte in dieser Arbeit den prognostischen Faktoren anhand der Aktivität der Signaltransduktionsproteine kein wiedererkennbares Phosphorylierungsmuster zugeschrieben werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Abramson, S., Miller, R.G., Phillips, R.A., 1977. The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems. The Journal of experimental medicine 145, 1567-1579.

2. Aguirre-Ghiso, J.A., Estrada, Y., Liu, D., Ossowski, L., 2003. ERK(MAPK) activity as a determinant of tumor growth and dormancy; regulation by p38(SAPK). Cancer research 63, 1684-1695.

3. Akada, H., Akada, S., Hutchison, R.E., Sakamoto, K., Wagner, K.U., Mohi, G., 2014. Critical role of Jak2 in the maintenance and function of adult hematopoietic stem cells. Stem cells 32, 1878-1889.

4. Akira, S., Nishio, Y., Inoue, M., Wang, X.J., Wei, S., Matsusaka, T., Yoshida, K., Sudo, T., Naruto, M., Kishimoto, T., 1994. Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. Cell 77, 63-71.

5. Almendral, J.M., Sommer, D., Macdonald-Bravo, H., Burckhardt, J., Perera, J., Bravo, R., 1988. Complexity of the early genetic response to growth factors in mouse fibroblasts. Molecular and cellular biology 8, 2140-2148.

6. Alsadeq, A., Strube, S., Krause, S., Carlet, M., Jeremias, I., Vokuhl, C., Loges, S., Aguirre-Ghiso, J.A., Trauzold, A., Cario, G., Stanulla, M., Schrappe, M., Schewe, D.M., 2015. Effects of p38alpha/beta inhibition on acute lymphoblastic leukemia proliferation and survival in vivo. Leukemia 29, 2307-2316.

7. Andersson, E.I., Rajala, H.L., Eldfors, S., Ellonen, P., Olson, T., Jerez, A., Clemente, M.J., Kallioniemi, O., Porkka, K., Heckman, C., Loughran, T.P., Jr., Maciejewski, J.P., Mustjoki, S., 2013. Novel somatic mutations in large granular lymphocytic leukemia affecting the STAT-pathway and T-cell activation. Blood cancer journal 3, e168.

8. Avalle, L., Pensa, S., Regis, G., Novelli, F., Poli, V., 2012. STAT1 and STAT3 in tumorigenesis: A matter of balance. Jak-Stat 1, 65-72.

9. Bacon, C.M., McVicar, D.W., Ortaldo, J.R., Rees, R.C., O'Shea, J.J., Johnston, J.A., 1995. Interleukin 12 (IL-12) induces tyrosine phosphorylation of JAK2 and TYK2: differential use of Janus family tyrosine kinases by IL-2 and IL-12. The Journal of experimental medicine 181, 399-404.

10. Baersch, G., Mollers, T., Hotte, A., Dockhorn-Dworniczak, B., Rube, C., Ritter, J., Jurgens, H., Vormoor, J., 1997. Good engraftment of B-cell precursor ALL in NOD-SCID mice. Klinische Padiatrie 209, 178-185.

11. Bandapalli, O.R., Schuessele, S., Kunz, J.B., Rausch, T., Stutz, A.M., Tal, N., Geron, I., Gershman, N., Izraeli, S., Eilers, J., Vaezipour, N., Kirschner-Schwabe, R., Hof, J., von Stackelberg, A., Schrappe, M., Stanulla, M., Zimmermann, M., Koehler, R., Avigad, S., Handgretinger, R., Frismantas, V., Bourquin, J.P., Bornhauser, B., Korbel, J.O., Muckenthaler, M.U., Kulozik, A.E., 2014. The activating STAT5B N642H mutation is a common abnormality in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia and confers a higher risk of relapse. Haematologica 99, e188-192.

12. Barata, J.T., Cardoso, A.A., Nadler, L.M., Boussiotis, V.A., 2001. Interleukin-7 promotes survival and cell cycle progression of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells by down-regulating the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(kip1). Blood 98, 1524-1531.

13. Barata, J.T., Boussiotis, V.A., Yunes, J.A., Ferrando, A.A., Moreau, L.A., Veiga, J.P., Sallan, S.E., Look, A.T., Nadler, L.M., Cardoso, A.A., 2004. IL-7-dependent human leukemia T-cell line as a valuable tool for drug discovery in T-ALL. Blood 103, 1891-1900.

14. Bavaria, M.N., Jin, S., Ray, R.M., Johnson, L.R., 2014. The mechanism by which MEK/ERK regulates JNK and p38 activity in polyamine depleted IEC-6 cells during apoptosis. Apoptosis : an international journal on programmed cell death 19, 467-479.

15. Benekli, M., Xia, Z., Donohue, K.A., Ford, L.A., Pixley, L.A., Baer, M.R., Baumann, H., Wetzler, M., 2002. Constitutive activity of signal transducer and activator of transcription 3 protein in acute myeloid leukemia blasts is associated with short disease-free survival. Blood 99, 252-257.

16. Benekli, M., Baumann, H., Wetzler, M., 2009. Targeting signal transducer and activator of transcription signaling pathway in leukemias. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 27, 4422-4432

17. Besser, D., Bromberg, J.F., Darnell, J.E., Jr., Hanafusa, H., 1999. A single amino acid substitution in the v-Eyk intracellular domain results in activation of Stat3 and enhances cellular transformation. Molecular and cellular biology 19, 1401-1409.

18. Bewry, N.N., Nair, R.R., Emmons, M.F., Boulware, D., Pinilla-Ibarz, J., Hazlehurst, L.A., 2008. Stat3 contributes to resistance toward BCR-ABL inhibitors in a bone marrow microenvironment model of drug resistance. Molecular cancer therapeutics 7, 3169-3175.

19. Bhojwani, D., Kang, H., Moskowitz, N.P., Min, D.J., Lee, H., Potter, J.W., Davidson, G., Willman, C.L., Borowitz, M.J., Belitskaya-Levy, I., Hunger, S.P., Raetz, E.A., Carroll, W.L., 2006. Biologic pathways associated with relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. Blood 108, 711-717.

20. Birkenkamp, K.U., Geugien, M., Lemmink, H.H., Kruijer, W., Vellenga, E., 2001. Regulation of constitutive STAT5 phosphorylation in acute myeloid leukemia blasts. Leukemia 15, 1923-1931.

21. Borgmann, A., Baldy, C., von Stackelberg, A., Beyermann, B., Fichtner, I., Nurnberg, P., Henze, G., 2000. Childhood all blasts retain phenotypic and genotypic characteristics upon long-term serial passage in NOD/SCID mice. Pediatric hematology and oncology 17, 635-650.

22. Borkhardt, A., Cazzaniga, G., Viehmann, S., Valsecchi, M.G., Ludwig, W.D., Burci, L., Mangioni, S., Schrappe, M., Riehm, H., Lampert, F., Basso, G., Masera, G., Harbott, J., Biondi, A., 1997. Incidence and clinical relevance of TEL/AML1 fusion genes in children with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the German and Italian multicenter therapy trials. Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica and the Berlin-Frankfurt-Munster Study Group. Blood 90, 571-577.

23. Bos, J.L., Verlaan-de Vries, M., van der Eb, A.J., Janssen, J.W., Delwel, R., Lowenberg, B., Colly, L.P., 1987. Mutations in N-ras predominate in acute myeloid leukemia. Blood 69, 1237-1241.

24. Bromberg, J.F., Horvath, C.M., Wen, Z., Schreiber, R.D., Darnell, J.E., Jr., 1996. Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93, 7673-7678.

25. Bromberg, J.F., Fan, Z., Brown, C., Mendelsohn, J., Darnell, J.E., Jr., 1998a. Epidermal growth factor-induced growth inhibition requires Stat1 activation. Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research 9, 505-512.

26. Bromberg, J.F., Horvath, C.M., Besser, D., Lathem, W.W., Darnell, J.E., Jr., 1998b. Stat3 activation is required for cellular transformation by v-src. Molecular and cellular biology 18, 2553-2558.

27. Bromberg, J.F., Wrzeszczynska, M.H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R.G., Albanese, C., Darnell, J.E., Jr., 1999. Stat3 as an oncogene. Cell 98, 295-303.

28. Brooks, A.J., Dai, W., O'Mara, M.L., Abankwa, D., Chhabra, Y., Pelekanos, R.A., Gardon, O., Tunny, K.A., Blucher, K.M., Morton, C.J., Parker, M.W., Sierecki, E., Gambin, Y., Gomez, G.A., Alexandrov, K., Wilson, I.A., Doxastakis, M., Mark, A.E., Waters, M.J., 2014. Mechanism of activation of protein kinase JAK2 by the growth hormone receptor. Science 344, 1249783.

29. Brown, V.I., Fang, J., Alcorn, K., Barr, R., Kim, J.M., Wasserman, R., Grupp, S.A., 2003. Rapamycin is active against B-precursor leukemia in vitro and in vivo, an effect that is modulated by IL-7-mediated signaling. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100, 15113-15118.

30. Brown, R., Yang, S., Weatherburn, C., Gibson, J., Ho, P.J., Suen, H., Hart, D., Joshua, D., 2015. Phospho-flow detection of constitutive and cytokine-induced pSTAT3/5, pAKT and pERK expression highlights novel prognostic biomarkers for patients with multiple myeloma. Leukemia 29, 483-490.

31. Campos, L., Rouault, J.P., Sabido, O., Oriol, P., Roubi, N., Vasselon, C., Archimbaud, E., Magaud, J.P., Guyotat, D., 1993. High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. Blood 81, 3091-3096.

32. Cao, X., Tay, A., Guy, G.R., Tan, Y.H., 1996. Activation and association of Stat3 with Src in v-Src-transformed cell lines. Molecular and cellular biology 16, 1595-1603.

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

34. Case, M., Matheson, E., Minto, L., Hassan, R., Harrison, C.J., Bown, N., Bailey, S., Vormoor, J., Hall, A.G., Irving, J.A., 2008. Mutation of genes affecting the RAS pathway is common in childhood acute lymphoblastic leukemia. Cancer research 68, 6803-6809.

35. Catlett-Falcone, R., Landowski, T.H., Oshiro, M.M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernandez-Luna, J.L., Nunez, G., Dalton, W.S., Jove, R., 1999. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. Immunity 10, 105-115.

36. Chai, S.K., Nichols, G.L., Rothman, P., 1997. Constitutive activation of JAKs and STATs in BCR-Abl-expressing cell lines and peripheral blood cells derived from leukemic patients. Journal of immunology 159, 4720-4728.

37. Chaturvedi, P., Sharma, S., Reddy, E.P., 1997. Abrogation of interleukin-3 dependence of myeloid cells by the v-src oncogene requires SH2 and SH3 domains which specify activation of STATs. Molecular and cellular biology 17, 3295-3304.

38. Chen, X., Vinkemeier, U., Zhao, Y., Jeruzalmi, D., Darnell, J.E., Jr., Kuriyan, J., 1998. Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. Cell 93, 827-839.

39. Chen, N., Lu, K., Li, P., Lv, X., Wang, X., 2014. Overexpression of IL-9 induced by STAT6 activation promotes the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. International journal of clinical and experimental pathology 7, 2319-2323.

40. Chiaretti, S., Vitale, A., Cazzaniga, G., Orlando, S.M., Silvestri, D., Fazi, P., Valsecchi, M.G., Elia, L., Testi, A.M., Mancini, F., Conter, V., te Kronnie, G., Ferrara, F., Di Raimondo, F., Tedeschi, A., Fioritoni, G., Fabbiano, F., Meloni, G., Specchia, G., Pizzolo, G., Mandelli, F., Guarini, A., Basso, G., Biondi, A., Foa, R., 2013. Clinico-biological features of 5202 patients with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the Italian AIEOP and GIMEMA protocols and stratified in age cohorts. Haematologica 98, 1702-1710.

41. Chin, Y.E., Kitagawa, M., Su, W.C., You, Z.H., Iwamoto, Y., Fu, X.Y., 1996. Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1. Science 272, 719-722.

42. Chow, S., Patel, H., Hedley, D.W., 2001. Measurement of MAP kinase activation by flow cytometry using phospho-specific antibodies to MEK and ERK: potential for pharmacodynamic monitoring of signal transduction inhibitors. Cytometry 46, 72-78.

43. Chung, J., Uchida, E., Grammer, T.C., Blenis, J., 1997. STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation. Molecular and cellular biology 17, 6508-6516.

44. Conter, V., Bartram, C.R., Valsecchi, M.G., Schrauder, A., Panzer-Grumayer, R., Moricke, A., Arico, M., Zimmermann, M., Mann, G., De Rossi, G., Stanulla, M., Locatelli, F., Basso, G., Niggli, F., Barisone, E., Henze, G., Ludwig, W.D., Haas, O.A., Cazzaniga, G., Koehler, R., Silvestri, D., Bradtke, J., Parasole, R., Beier, R., van Dongen, J.J., Biondi, A., Schrappe, M., 2010. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. Blood 115, 3206-3214.

45. Cooper, S.L., Brown, P.A., 2015. Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. Pediatric clinics of North America 62, 61-73.

46. Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Schindler, C., Zhong, Z., Wen, Z., Darnell, J.E., Jr., Mui, A.L., Miyajima, A., Quelle, F.W., Ihle, J.N., et al., 1995. Distribution of the mammalian Stat gene family in mouse chromosomes. Genomics 29, 225-228.

47. Cressman, D.E., Greenbaum, L.E., DeAngelis, R.A., Ciliberto, G., Furth, E.E., Poli, V., Taub, R., 1996. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. Science 274, 1379-1383.

48. Cui, J., Wang, Q., Wang, J., Lv, M., Zhu, N., Li, Y., Feng, J., Shen, B., Zhang, J., 2009. Basal c-Jun NH2-terminal protein kinase activity is essential for survival and proliferation of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. Molecular cancer therapeutics 8, 3214-3222.

49. D'Angelo, V., Crisci, S., Casale, F., Addeo, R., Giuliano, M., Pota, E., Finsinger, P., Baldi, A., Rondelli, R., Abbruzzese, A., Caraglia, M., Indolfi, P., 2009. High Erk-1 activation and Gadd45a expression as prognostic markers in high risk pediatric haemolymphoproliferative diseases. Journal of experimental & clinical cancer research : CR 28, 39.

50. Dadi, H.K., Ke, S., Roifman, C.M., 1993. Interleukin 7 receptor mediates the activation of phosphatidylinositol-3 kinase in human B-cell precursors. Biochemical and biophysical research communications 192, 459-464.

51. Danial, N.N., Losman, J.A., Lu, T., Yip, N., Krishnan, K., Krolewski, J., Goff, S.P., Wang, J.Y., Rothman, P.B., 1998. Direct interaction of Jak1 and v-Abl is required for v-Abl-induced activation of STATs and proliferation. Molecular and cellular biology 18, 6795-6804.

52. Darnell, J.E., Jr., Kerr, I.M., Stark, G.R., 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. Science 264, 1415-1421.

53. Darnell, J.E., Jr., 1997. STATs and gene regulation. Science 277, 1630-1635.

54. David, M., Petricoin, E., 3rd, Benjamin, C., Pine, R., Weber, M.J., Larner, A.C., 1995. Requirement for MAP kinase (ERK2) activity in interferon alpha-and interferon beta-stimulated gene expression through STAT proteins. Science 269, 1721-1723.

55. Degryse, S., de Bock, C.E., Cox, L., Demeyer, S., Gielen, O., Mentens, N., Jacobs, K., Geerdens, E., Gianfelici, V., Hulselmans, G., Fiers, M., Aerts, S., Meijerink, J.P., Tousseyn, T., Cools, J., 2014. JAK3 mutants transform hematopoietic cells through JAK1 activation, causing T-cell acute lymphoblastic leukemia in a mouse model. Blood 124, 3092-3100.

56. Del Poeta, G., Venditti, A., Del Principe, M.I., Maurillo, L., Buccisano, F., Tamburini, A., Cox, M.C., Franchi, A., Bruno, A., Mazzone, C., Panetta, P., Suppo, G., Masi, M., Amadori, S., 2003. Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML). Blood 101, 2125-2131.

57. Dent, P., Haser, W., Haystead, T.A., Vincent, L.A., Roberts, T.M., Sturgill, T.W., 1992. Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH 3T3 cells and in vitro. Science 257, 1404-1407.

58. Derijard, B., Raingeaud, J., Barrett, T., Wu, I.H., Han, J., Ulevitch, R.J., Davis, R.J., 1995. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. Science 267, 682-685.

59. Diaz-Flores, E., Goldschmidt, H., Depeille, P., Ng, V., Akutagawa, J., Krisman, K., Crone, M., Burgess, M.R., Williams, O., Houseman, B., Shokat, K., Sampath, D., Bollag, G., Roose, J.P., Braun, B.S., Shannon, K., 2013. PLC-gamma and PI3K link cytokines to ERK activation in hematopoietic cells with normal and oncogenic Kras. Science signaling 6, ra105.

60. Dordelmann, M., Reiter, A., Borkhardt, A., Ludwig, W.D., Gotz, N., Viehmann, S., Gadner, H., Riehm, H., Schrappe, M., 1999. Prednisone response is the strongest predictor of treatment outcome in infant acute lymphoblastic leukemia. Blood 94, 1209-1217.

61. Driessen, E.M., van Roon, E.H., Spijkers-Hagelstein, J.A., Schneider, P., de Lorenzo, P., Valsecchi, M.G., Pieters, R., Stam, R.W., 2013. Frequencies and prognostic impact of RAS mutations in MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemia in infants. Haematologica 98, 937-944.

62. Dumon, S., Santos, S.C., Debierre-Grockiego, F., Gouilleux-Gruart, V., Cocault, L., Boucheron, C., Mollat, P., Gisselbrecht, S., Gouilleux, F., 1999. IL-3 dependent regulation of Bcl-xL gene expression by STAT5 in a bone marrow derived cell line. Oncogene 18, 4191-4199.

63. Dupuis, S., Jouanguy, E., Al-Hajjar, S., Fieschi, C., Al-Mohsen, I.Z., Al-Jumaah, S., Yang, K., Chapgier, A., Eidenschenk, C., Eid, P., Al Ghonaium, A., Tufenkeji, H., Frayha, H., Al-Gazlan, S., Al-Rayes, H., Schreiber, R.D., Gresser, I., Casanova, J.L., 2003. Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. Nature genetics 33, 388-391.

64. Durbin, J.E., Hackenmiller, R., Simon, M.C., Levy, D.E., 1996. Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. Cell 84, 443-450.

65. Einsiedel, H.G., von Stackelberg, A., Hartmann, R., Fengler, R., Schrappe, M., Janka-Schaub, G., Mann, G., Hahlen, K., Gobel, U., Klingebiel, T., Ludwig, W.D., Henze, G., 2005. Long-term outcome in children with relapsed ALL by risk-stratified salvage therapy: results of trial acute lymphoblastic leukemia-relapse study of the Berlin-Frankfurt-Munster Group 87. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 23, 7942-7950.

66. Engelberg, D., 2004. Stress-activated protein kinases-tumor suppressors or tumor initiators? Seminars in cancer biology 14, 271-282.

67. Farr, C.J., Saiki, R.K., Erlich, H.A., McCormick, F., Marshall, C.J., 1988. Analysis of RAS gene mutations in acute myeloid leukemia by polymerase chain reaction and oligonucleotide probes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 85, 1629-1633.

68. Fleisher, T.A., Dorman, S.E., Anderson, J.A., Vail, M., Brown, M.R., Holland, S.M., 1999. Detection of intracellular phosphorylated STAT-1 by flow cytometry. Clinical immunology 90, 425-430.

69. Flohr, T., Schrauder, A., Cazzaniga, G., Panzer-Grumayer, R., van der Velden, V., Fischer, S., Stanulla, M., Basso, G., Niggli, F.K., Schafer, B.W., Sutton, R., Koehler, R., Zimmermann, M., Valsecchi, M.G., Gadner, H., Masera, G., Schrappe, M., van Dongen, J.J., Biondi, A., Bartram, C.R., International, B.F.M.S.G., 2008. Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 22, 771-782.

70. Flotho, C., Valcamonica, S., Mach-Pascual, S., Schmahl, G., Corral, L., Ritterbach, J., Hasle, H., Arico, M., Biondi, A., Niemeyer, C.M., 1999. RAS mutations and

clonality analysis in children with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML). Leukemia 13, 32-37.

71. Frank, D.A., Mahajan, S., Ritz, J., 1997. B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia contain signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 and STAT3 constitutively phosphorylated on serine residues. The Journal of clinical investigation 100, 3140-3148.

72. Friederichs, K., Schmitz, J., Weissenbach, M., Heinrich, P.C., Schaper, F., 2001. Interleukin-6-induced proliferation of pre-B cells mediated by receptor complexes lacking the SHP2/SOCS3 recruitment sites revisited. European journal of biochemistry /FEBS 268, 6401-6407.

73. Fu, X.Y., Kessler, D.S., Veals, S.A., Levy, D.E., Darnell, J.E., Jr., 1990. ISGF3, the transcriptional activator induced by interferon alpha, consists of multiple interacting polypeptide chains. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87, 8555-8559.

74. Fu, X.Y., Schindler, C., Improta, T., Aebersold, R., Darnell, J.E., Jr., 1992. The proteins of ISGF-3, the interferon alpha-induced transcriptional activator, define a gene family involved in signal transduction. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89, 7840-7843.

75. Fu, X.Y., Zhang, J.J., 1993. Transcription factor p91 interacts with the epidermal growth factor receptor and mediates activation of the c-fos gene promoter. Cell 74, 1135-1145.

76. Fukada, T., Hibi, M., Yamanaka, Y., Takahashi-Tezuka, M., Fujitani, Y., Yamaguchi, T., Nakajima, K., Hirano, T., 1996. Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. Immunity 5, 449-460.

77. Garcia, R., Yu, C.L., Hudnall, A., Catlett, R., Nelson, K.L., Smithgall, T., Fujita, D.J., Ethier, S.P., Jove, R., 1997. Constitutive activation of Stat3 in fibroblasts transformed by diverse oncoproteins and in breast carcinoma cells. Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research 8, 1267-1276.

78. Garcia, R., Bowman, T.L., Niu, G., Yu, H., Minton, S., Muro-Cacho, C.A., Cox, C.E., Falcone, R., Fairclough, R., Parsons, S., Laudano, A., Gazit, A., Levitzki, A., Kraker, A., Jove, R., 2001. Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. Oncogene 20, 2499-2513

79. Gaynon, P.S., Desai, A.A., Bostrom, B.C., Hutchinson, R.J., Lange, B.J., Nachman, J.B., Reaman, G.H., Sather, H.N., Steinherz, P.G., Trigg, M.E., Tubergen, D.G., Uckun, F.M., 1997. Early response to therapy and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia: a review. Cancer 80, 1717-1726.

80. Gaynon, P.S., Qu, R.P., Chappell, R.J., Willoughby, M.L., Tubergen, D.G., Steinherz, P.G., Trigg, M.E., 1998. Survival after relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: impact of site and time to first relapse--the Children's Cancer Group Experience. Cancer 82, 1387-1395.

81. Gaynon, P.S., Angiolillo, A.L., Carroll, W.L., Nachman, J.B., Trigg, M.E., Sather, H.N., Hunger, S.P., Devidas, M., Children's Oncology, G., 2010. Long-term results

of the children's cancer group studies for childhood acute lymphoblastic leukemia 1983-2002: a Children's Oncology Group Report. Leukemia 24, 285-297.

82. George, A.A., Paz, H., Fei, F., Kirzner, J., Kim, Y.M., Heisterkamp, N., Abdel-Azim, H., 2015. Phosphoflow-Based Evaluation of Mek Inhibitors as Small-Molecule Therapeutics for B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. PloS one 10, e0137917.

83. Gollob, J.A., Schnipper, C.P., Murphy, E.A., Ritz, J., Frank, D.A., 1999. The functional synergy between IL-12 and IL-2 involves p38 mitogen-activated protein kinase and is associated with the augmentation of STAT serine phosphorylation. Journal of immunology 162, 4472-4481.

84. Gomes, A.M., Soares, M.V., Ribeiro, P., Caldas, J., Povoa, V., Martins, L.R., Melao, A., Serra-Caetano, A., de Sousa, A.B., Lacerda, J.F., Barata, J.T., 2014. Adult B-cell acute lymphoblastic leukemia cells display decreased PTEN activity and constitutive hyperactivation of PI3K/Akt pathway despite high PTEN protein levels. Haematologica 99, 1062-1068.

85. Gouilleux, F., Wakao, H., Mundt, M., Groner, B., 1994. Prolactin induces phosphorylation of Tyr694 of Stat5 (MGF), a prerequisite for DNA binding and induction of transcription. The EMBO journal 13, 4361-4369.

86. Gouilleux-Gruart, V., Gouilleux, F., Desaint, C., Claisse, J.F., Capiod, J.C., Delobel, J., Weber-Nordt, R., Dusanter-Fourt, I., Dreyfus, F., Groner, B., Prin, L., 1996. STAT-related transcription factors are constitutively activated in peripheral blood cells from acute leukemia patients. Blood 87, 1692-1697.

87. Grandis, J.R., Drenning, S.D., Chakraborty, A., Zhou, M.Y., Zeng, Q., Pitt, A.S., Tweardy, D.J., 1998. Requirement of Stat3 but not Stat1 activation for epidermal growth factor receptor-mediated cell growth In vitro. The Journal of clinical investigation 102, 1385-1392.

88. Grandis, J.R., Drenning, S.D., Zeng, Q., Watkins, S.C., Melhem, M.F., Endo, S., Johnson, D.E., Huang, L., He, Y., Kim, J.D., 2000. Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97, 4227-4232

89. Gregorj, C., Ricciardi, M.R., Petrucci, M.T., Scerpa, M.C., De Cave, F., Fazi, P., Vignetti, M., Vitale, A., Mancini, M., Cimino, G., Palmieri, S., Di Raimondo, F., Specchia, G., Fabbiano, F., Cantore, N., Mosna, F., Camera, A., Luppi, M., Annino, L., Miraglia, E., Fioritoni, G., Ronco, F., Meloni, G., Mandelli, F., Andreeff, M., Milella, M., Foa, R., Tafuri, A., Party, G.A.L.W., 2007. ERK1/2 phosphorylation is an independent predictor of complete remission in newly diagnosed adult acute lymphoblastic leukemia. Blood 109, 5473-5476.

90. Gururajan, M., Chui, R., Karuppannan, A.K., Ke, J., Jennings, C.D., Bondada, S., 2005. c-Jun N-terminal kinase (JNK) is required for survival and proliferation of B-lymphoma cells. Blood 106, 1382-1391.

91. Haccard, O., Sarcevic, B., Lewellyn, A., Hartley, R., Roy, L., Izumi, T., Erikson, E., Maller, J.L., 1993. Induction of metaphase arrest in cleaving Xenopus embryos by MAP kinase. Science 262, 1262-1265.

92. Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. Cell 100, 57-70.

93. Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 144, 646-674.

94. Hanratty, W.P., Dearolf, C.R., 1993. The Drosophila Tumorous-lethal hematopoietic oncogene is a dominant mutation in the hopscotch locus. Molecular & general genetics : MGG 238, 33-37.

95. Harrison, D.A., Binari, R., Nahreini, T.S., Gilman, M., Perrimon, N., 1995. Activation of a Drosophila Janus kinase (JAK) causes hematopoietic neoplasia and developmental defects. The EMBO journal 14, 2857-2865.

96. Hasan, M.N., Queudeville, M., Trentin, L., Eckhoff, S.M., Bronzini, I., Palmi, C., Barth, T., Cazzaniga, G., te Kronnie, G., Debatin, K.M., Meyer, L.H., 2015. Targeting of hyperactivated mTOR signaling in high-risk acute lymphoblastic leukemia in a pre-clinical model. Oncotarget 6, 1382-1395.

97. Hayakawa, F., Towatari, M., Iida, H., Wakao, H., Kiyoi, H., Naoe, T., Saito, H., 1998. Differential constitutive activation between STAT-related proteins and MAP kinase in primary acute myelogenous leukaemia. British journal of haematology 101, 521-528.

98. Heasley, L.E., Han, S.Y., 2006. JNK regulation of oncogenesis. Molecules and cells 21, 167-173.

99. Heasley, L.E., Storey, B., Fanger, G.R., Butterfield, L., Zamarripa, J., Blumberg, D., Maue, R.A., 1996. GTPase-deficient G alpha 16 and G alpha q induce PC12 cell differentiation and persistent activation of cJun NH2-terminal kinases. Molecular and cellular biology 16, 648-656.

100. Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A., Karin, M., 1993. Identification of an oncoprotein-and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. Genes & development 7, 2135-2148.

101. Hogan, L.E., Meyer, J.A., Yang, J., Wang, J., Wong, N., Yang, W., Condos, G., Hunger, S.P., Raetz, E., Saffery, R., Relling, M.V., Bhojwani, D., Morrison, D.J., Carroll, W.L., 2011. Integrated genomic analysis of relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia reveals therapeutic strategies. Blood 118, 5218-5226.

102. Hou, J., Schindler, U., Henzel, W.J., Ho, T.C., Brasseur, M., McKnight, S.L., 1994. An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat. Science 265, 1701-1706.

103. Hou, X.S., Melnick, M.B., Perrimon, N., 1996. Marelle acts downstream of the Drosophila HOP/JAK kinase and encodes a protein similar to the mammalian STATs. Cell 84, 411-419.

104. Howe, L.R., Leevers, S.J., Gomez, N., Nakielny, S., Cohen, P., Marshall, C.J., 1992. Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. Cell 71, 335-342.

105. Huang, R., Faratian, D., Sims, A.H., Wilson, D., Thomas, J.S., Harrison, D.J., Langdon, S.P., 2014. Increased STAT1 signaling in endocrine-resistant breast cancer. PloS one 9, e94226.

106. Huang, C.H., Chen, Y.J., Chao, T.Y., Liu, W.H., Changchien, J.J., Hu, W.P., Chang, L.S., 2016. The Association Between p38 MAPK-Mediated TNF-alpha/TNFR2 up-Regulation and 2-(4-Aminophenyl)-7-Methoxybenzothiazole-Induced Apoptosis in Human Leukemia U937 Cells. Journal of cellular physiology 231, 130-141.

107. Hunger, S.P., Lu, X., Devidas, M., Camitta, B.M., Gaynon, P.S., Winick, N.J., Reaman, G.H., Carroll, W.L., 2012. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 30, 1663-1669.

108. Hunger, S.P., Mullighan, C.G., 2015. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. The New England journal of medicine 373, 1541-1552.

109. Iida, M., Towatari, M., Nakao, A., Iida, H., Kiyoi, H., Nakano, Y., Tanimoto, M., Saito, H., Naoe, T., 1999. Lack of constitutive activation of MAP kinase pathway in human acute myeloid leukemia cells with N-Ras mutation. Leukemia 13, 585-589.

110. Ilangumaran, S., Finan, D., Rottapel, R., 2003. Flow cytometric analysis of cytokine receptor signal transduction. Journal of immunological methods 278, 221-234.

111. Ilaria, R.L., Jr., Van Etten, R.A., 1996. P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. The Journal of biological chemistry 271, 31704-31710.

112. Imada, K., Bloom, E.T., Nakajima, H., Horvath-Arcidiacono, J.A., Udy, G.B., Davey, H.W., Leonard, W.J., 1998. Stat5b is essential for natural killer cell-mediated proliferation and cytolytic activity. The Journal of experimental medicine 188, 2067-2074.

113. Irish, J.M., Hovland, R., Krutzik, P.O., Perez, O.D., Bruserud, O., Gjertsen, B.T., Nolan, G.P., 2004. Single cell profiling of potentiated phospho-protein networks in cancer cells. Cell 118, 217-228.

114. Irving, J., Matheson, E., Minto, L., Blair, H., Case, M., Halsey, C., Swidenbank, I., Ponthan, F., Kirschner-Schwabe, R., Groeneveld-Krentz, S., Hof, J., Allan, J., Harrison, C., Vormoor, J., von Stackelberg, A., Eckert, C., 2014. Ras pathway mutations are prevalent in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia and confer sensitivity to MEK inhibition. Blood 124, 3420-3430.

115. James, C., Ugo, V., Le Couedic, J.P., Staerk, J., Delhommeau, F., Lacout, C., Garcon, L., Raslova, H., Berger, R., Bennaceur-Griscelli, A., Villeval, J.L., Constantinescu, S.N., Casadevall, N., Vainchenker, W., 2005. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. Nature 434, 1144-1148.

116. Jain, N., Zhang, T., Fong, S.L., Lim, C.P., Cao, X., 1998. Repression of Stat3 activity by activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK). Oncogene 17, 3157-3167.

117. Jeong, E.G., Kim, M.S., Nam, H.K., Min, C.K., Lee, S., Chung, Y.J., Yoo, N.J., Lee, S.H., 2008. Somatic mutations of JAK1 and JAK3 in acute leukemias and solid cancers. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 14, 3716-3721.

118. Johnson, D.B., Smalley, K.S., Sosman, J.A., 2014. Molecular pathways: targeting NRAS in melanoma and acute myelogenous leukemia. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 20, 4186-4192.

119. Johnston, J.A., Bacon, C.M., Finbloom, D.S., Rees, R.C., Kaplan, D., Shibuya, K., Ortaldo, J.R., Gupta, S., Chen, Y.Q., Giri, J.D., et al., 1995. Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus kinases by interleukins 2 and 15. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92, 8705-8709.

120. Jones, C.L., Gearheart, C.M., Fosmire, S., Delgado-Martin, C., Evensen, N.A., Bride, K., Waanders, A.J., Pais, F., Wang, J., Bhatla, T., Bitterman, D.S., de Rijk, S.R., Bourgeois, W., Dandekar, S., Park, E., Burleson, T.M., Madhusoodhan, P.P., Teachey, D.T., Raetz, E.A., Hermiston, M.L., Muschen, M., Loh, M.L., Hunger, S.P., Zhang, J., Garabedian, M.J., Porter, C.C., Carroll, W.L., 2015. MAPK signaling cascades mediate distinct glucocorticoid resistance mechanisms in pediatric leukemia. Blood 126, 2202-2212.

121. Kaatsch, P., 2010. Epidemiology of childhood cancer. Cancer treatment reviews 36, 277-285.

122. Kamel-Reid, S., Letarte, M., Sirard, C., Doedens, M., Grunberger, T., Fulop, G., Freedman, M.H., Phillips, R.A., Dick, J.E., 1989. A model of human acute lymphoblastic leukemia in immune-deficient SCID mice. Science 246, 1597-1600.

123. Kaplan, M.H., Schindler, U., Smiley, S.T., Grusby, M.J., 1996a. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. Immunity 4, 313-319.

124. Kaplan, M.H., Sun, Y.L., Hoey, T., Grusby, M.J., 1996b. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. Nature 382, 174-177.

125. Kaplan, D.H., Shankaran, V., Dighe, A.S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L.J., Schreiber, R.D., 1998. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95, 7556-7561.

126. Kilian, S., http://www.bfm-international.org/Common%20guidelines%20for%20diagnostic%20approaches%20to%20leukemias.pdf (19.08.2015).

127. Kim, S.C., Hahn, J.S., Min, Y.H., Yoo, N.C., Ko, Y.W., Lee, W.J., 1999. Constitutive activation of extracellular signal-regulated kinase in human acute leukemias: combined role of activation of MEK, hyperexpression of extracellular signal-regulated kinase, and downregulation of a phosphatase, PAC1. Blood 93, 3893-3899.

128. Knight, T., Irving, J.A., 2014. Ras/Raf/MEK/ERK Pathway Activation in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia and Its Therapeutic Targeting. Frontiers in oncology 4, 160.

129. Kontro, M., Kuusanmaki, H., Eldfors, S., Burmeister, T., Andersson, E.I., Bruserud, O., Brummendorf, T.H., Edgren, H., Gjertsen, B.T., Itala-Remes, M., Lagstrom, S., Lohi, O., Lundan, T., Marti, J.M., Majumder, M.M., Parsons, A., Pemovska, T., Rajala, H., Vettenranta, K., Kallioniemi, O., Mustjoki, S., Porkka, K., Heckman, C.A., 2014. Novel activating STAT5B mutations as putative drivers of T-cell acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 28, 1738-1742.

130. Koskela, H.L., Eldfors, S., Ellonen, P., van Adrichem, A.J., Kuusanmaki, H., Andersson, E.I., Lagstrom, S., Clemente, M.J., Olson, T., Jalkanen, S.E., Majumder, M.M., Almusa, H., Edgren, H., Lepisto, M., Mattila, P., Guinta, K., Koistinen, P., Kuittinen, T., Penttinen, K., Parsons, A., Knowles, J., Saarela, J., Wennerberg, K., Kallioniemi, O., Porkka, K., Loughran, T.P., Jr., Heckman, C.A., Maciejewski, J.P., Mustjoki, S., 2012. Somatic STAT3 mutations in large granular lymphocytic leukemia. The New England journal of medicine 366, 1905-1913.

131. Krutzik, P.O., Nolan, G.P., 2003. Intracellular phospho-protein staining techniques for flow cytometry: monitoring single cell signaling events. Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology 55, 61-70.

132. Krutzik, P.O., Hale, M.B., Nolan, G.P., 2005. Characterization of the murine immunological signaling network with phosphospecific flow cytometry. Journal of immunology 175, 2366-2373.

133. Krutzik, P.O., Nolan, G.P., 2006. Fluorescent cell barcoding in flow cytometry allows high-throughput drug screening and signaling profiling. Nature methods 3, 361-368.

134. Kumagai, M., Manabe, A., Pui, C.H., Behm, F.G., Raimondi, S.C., Hancock, M.L., Mahmoud, H., Crist, W.M., Campana, D., 1996. Stroma-supported culture in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia cells predicts treatment outcome. The Journal of clinical investigation 97, 755-760.

135. Kumar, A., Commane, M., Flickinger, T.W., Horvath, C.M., Stark, G.R., 1997. Defective TNF-alpha-induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases. Science 278, 1630-1632.

136. Kyriakis, J.M., App, H., Zhang, X.F., Banerjee, P., Brautigan, D.L., Rapp, U.R., Avruch, J., 1992. Raf-1 activates MAP kinase-kinase. Nature 358, 417-421.

137. Larner, A.C., Jonak, G., Cheng, Y.S., Korant, B., Knight, E., Darnell, J.E., Jr., 1984. Transcriptional induction of two genes in human cells by beta interferon. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 81, 6733-6737.

138. Larner, A.C., Chaudhuri, A., Darnell, J.E., Jr., 1986. Transcriptional induction by interferon. New protein(s) determine the extent and length of the induction. The Journal of biological chemistry 261, 453-459.

139. Lawson, S.E., Harrison, G., Richards, S., Oakhill, A., Stevens, R., Eden, O.B., Darbyshire, P.J., 2000. The UK experience in treating relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia: a report on the medical research council UKALLR1 study. British journal of haematology 108, 531-543.

140. Lee, S.Y., Kang, S.U., Kim, K.I., Kang, S., Shin, Y.S., Chang, J.W., Yang, S.S., Lee, K., Lee, J.S., Moon, E., Kim, C.H., 2014. Nonthermal plasma induces apoptosis in ATC cells: involvement of JNK and p38 MAPK-dependent ROS. Yonsei medical journal 55, 1640-1647.

141. Leevers, S.J., Marshall, C.J., 1992. Activation of extracellular signal-regulated kinase, ERK2, by p21ras oncoprotein. The EMBO journal 11, 569-574.

142. Levy, D.E., Kessler, D.S., Pine, R., Reich, N., Darnell, J.E., Jr., 1988. Interferon-induced nuclear factors that bind a shared promoter element correlate with positive and negative transcriptional control. Genes & development 2, 383-393.

143. Levy, D.E., Kessler, D.S., Pine, R., Darnell, J.E., Jr., 1989. Cytoplasmic activation of ISGF3, the positive regulator of interferon-alpha-stimulated transcription, reconstituted in vitro. Genes & development 3, 1362-1371.

144. Li, L., Shaw, P.E., 2002. Autocrine-mediated activation of STAT3 correlates with cell proliferation in breast carcinoma lines. The Journal of biological chemistry 277, 17397-17405.

145. Lin, A., Minden, A., Martinetto, H., Claret, F.X., Lange-Carter, C., Mercurio, F., Johnson, G.L., Karin, M., 1995. Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-Mpk2. Science 268, 286-290.

146. Liongue, C., O'Sullivan, L.A., Trengove, M.C., Ward, A.C., 2012. Evolution of JAK-STAT pathway components: mechanisms and role in immune system development. PloS one 7, e32777.

147. Liongue, C., Taznin, T., Ward, A.C., 2016. Signaling via the CytoR/JAK/STAT/SOCS pathway: Emergence during evolution. Molecular immunology 71, 166-175.

148. Locatelli, F., Schrappe, M., Bernardo, M.E., Rutella, S., 2012. How I treat relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 120, 2807-2816.

149. Lu, J., Quearry, B., Harada, H., 2006. p38-MAP kinase activation followed by BIM induction is essential for glucocorticoid-induced apoptosis in lymphoblastic leukemia cells. FEBS letters 580, 3539-3544.

150. Luo, H., Hanratty, W.P., Dearolf, C.R., 1995. An amino acid substitution in the Drosophila hopTum-l Jak kinase causes leukemia-like hematopoietic defects. The EMBO journal 14, 1412-1420.

151. MacKenzie, K.L., Dolnikov, A., Millington, M., Shounan, Y., Symonds, G., 1999. Mutant N-ras induces myeloproliferative disorders and apoptosis in bone marrow repopulated mice. Blood 93, 2043-2056.

152. Magkou, C., Giannopoulou, I., Theohari, I., Fytou, A., Rafailidis, P., Nomikos, A., Papadimitriou, C., Nakopoulou, L., 2012. Prognostic significance of phosphorylated STAT-1 expression in premenopausal and postmenopausal patients with invasive breast cancer. Histopathology 60, 1125-1132.

153. Mansour, S.J., Matten, W.T., Hermann, A.S., Candia, J.M., Rong, S., Fukasawa, K., Vande Woude, G.F., Ahn, N.G., 1994. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. Science 265, 966-970.

154. Maude, S.L., Dolai, S., Delgado-Martin, C., Vincent, T., Robbins, A., Selvanathan, A., Ryan, T., Hall, J., Wood, A.C., Tasian, S.K., Hunger, S.P., Loh, M.L., Mullighan, C.G., Wood, B.L., Hermiston, M.L., Grupp, S.A., Lock, R.B., Teachey, D.T., 2015. Efficacy of JAK/STAT pathway inhibition in murine xenograft models of early T-cell precursor (ETP) acute lymphoblastic leukemia. Blood 125, 1759-1767.

155. McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Hoyle, P.E., Blalock, W.L., Weinstein-Oppenheimer, C., Franklin, R.A., Cherwinski, H., Bosch, E., McMahon, M., 1998. Differential abilities of activated Raf oncoproteins to abrogate cytokine dependency, prevent apoptosis and induce autocrine growth factor synthesis in human hematopoietic cells. Leukemia 12, 1903-1929.

156. Mehta, P.B., Jenkins, B.L., McCarthy, L., Thilak, L., Robson, C.N., Neal, D.E., Leung, H.Y., 2003. MEK5 overexpression is associated with metastatic prostate cancer, and stimulates proliferation, MMP-9 expression and invasion. Oncogene 22, 1381-1389.

157. Meng, X.W., Chandra, J., Loegering, D., Van Becelaere, K., Kottke, T.J., Gore, S.D., Karp, J.E., Sebolt-Leopold, J., Kaufmann, S.H., 2003. Central role of Fas-associated death domain protein in apoptosis induction by the mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor CI-1040 (PD184352) in acute lymphocytic leukemia cells in vitro. The Journal of biological chemistry 278, 47326-47339.

158. Meraz, M.A., White, J.M., Sheehan, K.C., Bach, E.A., Rodig, S.J., Dighe, A.S., Kaplan, D.H., Riley, J.K., Greenlund, A.C., Campbell, D., Carver-Moore, K., DuBois, R.N., Clark, R., Aguet, M., Schreiber, R.D., 1996. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. Cell 84, 431-442.

159. Messina, M., Chiaretti, S., Wang, J., Fedullo, A.L., Peragine, N., Gianfelici, V., Piciocchi, A., Brugnoletti, F., Di Giacomo, F., Pauselli, S., Holmes, A.B., Puzzolo, M.C., Ceglie, G., Apicella, V., Mancini, M., Te Kronnie, G., Testi, A.M., Vitale, A., Vignetti, M., Guarini, A., Rabadan, R., Foa, R., 2016. Prognostic and therapeutic role of targetable lesions in B-lineage acute lymphoblastic leukemia without recurrent fusion genes. Oncotarget.

160. Meyer, L.H., Karawajew, L., Schrappe, M., Ludwig, W.D., Debatin, K.M., Stahnke, K., 2006. Cytochrome c-related caspase-3 activation determines treatment response and relapse in childhood precursor B-cell ALL. Blood 107, 4524-4531.

161. Meyer, L.H., Eckhoff, S.M., Queudeville, M., Kraus, J.M., Giordan, M., Stursberg, J., Zangrando, A., Vendramini, E., Moricke, A., Zimmermann, M., Schrauder, A., Lahr, G., Holzmann, K., Schrappe, M., Basso, G., Stahnke, K., Kestler, H.A., Te Kronnie, G., Debatin, K.M., 2011. Early relapse in ALL is identified by time to leukemia in NOD/SCID mice and is characterized by a gene signature involving survival pathways. Cancer cell 19, 206-217.

162. Migone, T.S., Lin, J.X., Cereseto, A., Mulloy, J.C., O'Shea, J.J., Franchini, G., Leonard, W.J., 1995. Constitutively activated Jak-STAT pathway in T cells transformed with HTLV-I. Science 269, 79-81.

163. Milella, M., Kornblau, S.M., Estrov, Z., Carter, B.Z., Lapillonne, H., Harris, D., Konopleva, M., Zhao, S., Estey, E., Andreeff, M., 2001. Therapeutic targeting of the MEK/MAPK signal transduction module in acute myeloid leukemia. The Journal of clinical investigation 108, 851-859.

164. Miltiades, P., Lamprianidou, E., Vassilakopoulos, T.P., Papageorgiou, S.G., Galanopoulos, A.G., Kontos, C.K., Adamopoulos, P.G., Nakou, E., Vakalopoulou, S., Garypidou, V., Papaioannou, M., Hatjiharissi, E., Papadaki, H.A., Spanoudakis, E., Pappa, V., Scorilas, A., Tsatalas, C., Kotsianidis, I., Hellenic, M.D.S.S.G., 2016. The Stat3/5 Signaling Biosignature in Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Predicts Response and Outcome in Myelodysplastic Syndrome Patients Treated with Azacitidine. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 22, 1958-1968.

165. Minden, A., Lin, A., Smeal, T., Derijard, B., Cobb, M., Davis, R., Karin, M., 1994. c-Jun N-terminal phosphorylation correlates with activation of the JNK subgroup but not the ERK subgroup of mitogen-activated protein kinases. Molecular and cellular biology 14, 6683-6688.

166. Monnien, F., Zaki, H., Borg, C., Mougin, C., Bosset, J.F., Mercier, M., Arbez-Gindre, F., Kantelip, B., 2010. Prognostic value of phosphorylated STAT3 in advanced rectal cancer: a study from 104 French patients included in the EORTC 22921 trial. Journal of clinical pathology 63, 873-878.

167. Montag, D.T., Lotze, M.T., 2006. Successful simultaneous measurement of cell membrane and cytokine induced phosphorylation pathways [CIPP] in human peripheral blood mononuclear cells. Journal of immunological methods 313, 48-60.

168. Moodie, S.A., Willumsen, B.M., Weber, M.J., Wolfman, A., 1993. Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. Science 260, 1658-1661.

169. Mora, L.B., Buettner, R., Seigne, J., Diaz, J., Ahmad, N., Garcia, R., Bowman, T., Falcone, R., Fairclough, R., Cantor, A., Muro-Cacho, C., Livingston, S., Karras, J., Pow-Sang, J., Jove, R., 2002. Constitutive activation of Stat3 in human prostate tumors and cell lines: direct inhibition of Stat3 signaling induces apoptosis of prostate cancer cells. Cancer research 62, 6659-6666.

170. Moricke, A., Reiter, A., Zimmermann, M., Gadner, H., Stanulla, M., Dordelmann, M., Loning, L., Beier, R., Ludwig, W.D., Ratei, R., Harbott, J., Boos, J., Mann, G., Niggli, F., Feldges, A., Henze, G., Welte, K., Beck, J.D., Klingebiel, T., Niemeyer, C., Zintl, F., Bode, U., Urban, C., Wehinger, H., Niethammer, D., Riehm, H., Schrappe, M., German-Austrian-Swiss, A.L.L.B.F.M.S.G., 2008. Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. Blood 111, 4477-4489.

171. Moricke, A., Zimmermann, M., Reiter, A., Henze, G., Schrauder, A., Gadner, H., Ludwig, W.D., Ritter, J., Harbott, J., Mann, G., Klingebiel, T., Zintl, F., Niemeyer, C., Kremens, B., Niggli, F., Niethammer, D., Welte, K., Stanulla, M., Odenwald, E., Riehm, H., Schrappe, M., 2010. Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. Leukemia 24, 265-284.

172. Morikawa, T., Baba, Y., Yamauchi, M., Kuchiba, A., Nosho, K., Shima, K., Tanaka, N., Huttenhower, C., Frank, D.A., Fuchs, C.S., Ogino, S., 2011. STAT3 expression, molecular features, inflammation patterns, and prognosis in a database of 724 colorectal cancers. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 17, 1452-1462.

173. Mui, A.L., Wakao, H., Harada, N., O'Farrell, A.M., Miyajima, A., 1995a. Interleukin-3, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interleukin-5 transduce signals through two forms of STAT5. Journal of leukocyte biology 57, 799-803.

174. Mui, A.L., Wakao, H., O'Farrell, A.M., Harada, N., Miyajima, A., 1995b. Interleukin-3, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-5 transduce signals through two STAT5 homologs. The EMBO journal 14, 1166-1175.

175. Nachman, J., Sather, H.N., Gaynon, P.S., Lukens, J.N., Wolff, L., Trigg, M.E., 1997. Augmented Berlin-Frankfurt-Munster therapy abrogates the adverse prognostic significance of slow early response to induction chemotherapy for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia and unfavorable presenting features: a report from the Children's Cancer Group. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 15, 2222-2230.

176. Nachman, J.B., Sather, H.N., Sensel, M.G., Trigg, M.E., Cherlow, J.M., Lukens, J.N., Wolff, L., Uckun, F.M., Gaynon, P.S., 1998. Augmented post-induction therapy for children with high-risk acute lymphoblastic leukemia and a slow response to initial therapy. The New England journal of medicine 338, 1663-1671.

177. Nairismagi, M.L., Tan, J., Lim, J.Q., Nagarajan, S., Ng, C.C., Rajasegaran, V., Huang, D., Lim, W.K., Laurensia, Y., Wijaya, G.C., Li, Z.M., Cutcutache, I., Pang, W.L., Thangaraju, S., Ha, J., Khoo, L.P., Chin, S.T., Dey, S., Poore, G., Tan, L.H., Koh, H.K.,

Sabai, K., Rao, H.L., Chuah, K.L., Ho, Y.H., Ng, S.B., Chuang, S.S., Zhang, F., Liu, Y.H., Pongpruttipan, T., Ko, Y.H., Cheah, P.L., Karim, N., Chng, W.J., Tang, T., Tao, M., Tay, K., Farid, M., Quek, R., Rozen, S.G., Tan, P., Teh, B.T., Lim, S.T., Tan, S.Y., Ong, C.K., 2016. JAK-STAT and G-protein-coupled receptor signaling pathways are frequently altered in epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma. Leukemia.

178. Narazaki, M., Witthuhn, B.A., Yoshida, K., Silvennoinen, O., Yasukawa, K., Ihle, J.N., Kishimoto, T., Taga, T., 1994. Activation of JAK2 kinase mediated by the interleukin 6 signal transducer gp130. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91, 2285-2289.

179. Nguyen, K., Devidas, M., Cheng, S.C., La, M., Raetz, E.A., Carroll, W.L., Winick, N.J., Hunger, S.P., Gaynon, P.S., Loh, M.L., Children's Oncology, G., 2008. Factors influencing survival after relapse from acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. Leukemia 22, 2142-2150.

180. Nieborowska-Skorska, M., Wasik, M.A., Slupianek, A., Salomoni, P., Kitamura, T., Calabretta, B., Skorski, T., 1999. Signal transducer and activator of transcription (STAT)5 activation by BCR/ABL is dependent on intact Src homology (SH)3 and SH2 domains of BCR/ABL and is required for leukemogenesis. The Journal of experimental medicine 189, 1229-1242.

181. Nielsen, M., Kaltoft, K., Nordahl, M., Ropke, C., Geisler, C., Mustelin, T., Dobson, P., Svejgaard, A., Odum, N., 1997. Constitutive activation of a slowly migrating isoform of Stat3 in mycosis fungoides: tyrphostin AG490 inhibits Stat3 activation and growth of mycosis fungoides tumor cell lines. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94, 6764-6769.

182. Niu, G., Heller, R., Catlett-Falcone, R., Coppola, D., Jaroszeski, M., Dalton, W., Jove, R., Yu, H., 1999. Gene therapy with dominant-negative Stat3 suppresses growth of the murine melanoma B16 tumor in vivo. Cancer research 59, 5059-5063.

183. Nosaka, T., Kawashima, T., Misawa, K., Ikuta, K., Mui, A.L., Kitamura, T., 1999. STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells. The EMBO journal 18, 4754-4765.

184. Ong, Y.L., McMullin, M.F., Bailie, K.E., Lappin, T.R., Jones, F.G., Irvine, A.E., 2000. High bax expression is a good prognostic indicator in acute myeloid leukaemia. British journal of haematology 111, 182-189.

185. Onishi, M., Nosaka, T., Misawa, K., Mui, A.L., Gorman, D., McMahon, M., Miyajima, A., Kitamura, T., 1998. Identification and characterization of a constitutively active STAT5 mutant that promotes cell proliferation. Molecular and cellular biology 18, 3871-3879.

186. O'Shea, J.J., Schwartz, D.M., Villarino, A.V., Gadina, M., McInnes, I.B., Laurence, A., 2015. The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. Annual review of medicine 66, 311-328.

187. Pages, G., Lenormand, P., L'Allemain, G., Chambard, J.C., Meloche, S., Pouyssegur, J., 1993. Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90, 8319-8323.

188. Paiva, C., Godbersen, J.C., Soderquist, R.S., Rowland, T., Kilmarx, S., Spurgeon, S.E., Brown, J.R., Srinivasa, S.P., Danilov, A.V., 2015. Cyclin-Dependent

Kinase Inhibitor P1446A Induces Apoptosis in a JNK/p38 MAPK-Dependent Manner in Chronic Lymphocytic Leukemia B-Cells. PloS one 10, e0143685.

189. Paulsson, K., Horvat, A., Strombeck, B., Nilsson, F., Heldrup, J., Behrendtz, M., Forestier, E., Andersson, A., Fioretos, T., Johansson, B., 2008. Mutations of FLT3, NRAS, KRAS, and PTPN11 are frequent and possibly mutually exclusive in high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. Genes, chromosomes & cancer 47, 26-33.

190. Pectasides, E., Egloff, A.M., Sasaki, C., Kountourakis, P., Burtness, B., Fountzilas, G., Dafni, U., Zaramboukas, T., Rampias, T., Rimm, D., Grandis, J., Psyrri, A., 2010. Nuclear localization of signal transducer and activator of transcription 3 in head and neck squamous cell carcinoma is associated with a better prognosis. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 16, 2427-2434.

191. Perez, O.D., Nolan, G.P., 2002. Simultaneous measurement of multiple active kinase states using polychromatic flow cytometry. Nature biotechnology 20, 155-162.

192. Pircher, T.J., Flores-Morales, A., Mui, A.L., Saltiel, A.R., Norstedt, G., Gustafsson, J.A., Haldosen, L.A., 1997. Mitogen-activated protein kinase kinase inhibition decreases growth hormone stimulated transcription mediated by STAT5. Molecular and cellular endocrinology 133, 169-176.

193. Pircher, T.J., Petersen, H., Gustafsson, J.A., Haldosen, L.A., 1999. Extracellular signal-regulated kinase (ERK) interacts with signal transducer and activator of transcription (STAT) 5a. Molecular endocrinology 13, 555-565.

194. Pui, C.H., Boyett, J.M., Relling, M.V., Harrison, P.L., Rivera, G.K., Behm, F.G., Sandlund, J.T., Ribeiro, R.C., Rubnitz, J.E., Gajjar, A., Evans, W.E., 1999. Sex differences in prognosis for children with acute lymphoblastic leukemia. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 17, 818-824.

195. Pui, C.H., Chessells, J.M., Camitta, B., Baruchel, A., Biondi, A., Boyett, J.M., Carroll, A., Eden, O.B., Evans, W.E., Gadner, H., Harbott, J., Harms, D.O., Harrison, C.J., Harrison, P.L., Heerema, N., Janka-Schaub, G., Kamps, W., Masera, G., Pullen, J., Raimondi, S.C., Richards, S., Riehm, H., Sallan, S., Sather, H., Shuster, J., Silverman, L.B., Valsecchi, M.G., Vilmer, E., Zhou, Y., Gaynon, P.S., Schrappe, M., 2003a. Clinical heterogeneity in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 rearrangements. Leukemia 17, 700-706.

196. Pui, C.H., Sandlund, J.T., Pei, D., Rivera, G.K., Howard, S.C., Ribeiro, R.C., Rubnitz, J.E., Razzouk, B.I., Hudson, M.M., Cheng, C., Raimondi, S.C., Behm, F.G., Downing, J.R., Relling, M.V., Evans, W.E., 2003b. Results of therapy for acute lymphoblastic leukemia in black and white children. JAMA : the journal of the American Medical Association 290, 2001-2007.

197. Pui, C.H., Relling, M.V., Downing, J.R., 2004. Acute lymphoblastic leukemia. The New England journal of medicine 350, 1535-1548.

198. Pui, C.H., Evans, W.E., 2006. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. The New England journal of medicine 354, 166-178.

199. Pui, C.H., Pei, D., Sandlund, J.T., Ribeiro, R.C., Rubnitz, J.E., Raimondi, S.C., Onciu, M., Campana, D., Kun, L.E., Jeha, S., Cheng, C., Howard, S.C., Metzger, M.L., Bhojwani, D., Downing, J.R., Evans, W.E., Relling, M.V., 2010. Long-term results of St

Jude Total Therapy Studies 11, 12, 13A, 13B, and 14 for childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 24, 371-382.

200. Pui, C.H., Pei, D., Coustan-Smith, E., Jeha, S., Cheng, C., Bowman, W.P., Sandlund, J.T., Ribeiro, R.C., Rubnitz, J.E., Inaba, H., Bhojwani, D., Gruber, T.A., Leung, W.H., Downing, J.R., Evans, W.E., Relling, M.V., Campana, D., 2015. Clinical utility of sequential minimal residual disease measurements in the context of risk-based therapy in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a prospective study. The Lancet. Oncology 16, 465-474.

201. Pullen, J., Shuster, J.J., Link, M., Borowitz, M., Amylon, M., Carroll, A.J., Land, V., Look, A.T., McIntyre, B., Camitta, B., 1999. Significance of commonly used prognostic factors differs for children with T cell acute lymphocytic leukemia (ALL), as compared to those with B-precursor ALL. A Pediatric Oncology Group (POG) study. Leukemia 13, 1696-1707.

202. Quelle, F.W., Sato, N., Witthuhn, B.A., Inhorn, R.C., Eder, M., Miyajima, A., Griffin, J.D., Ihle, J.N., 1994. JAK2 associates with the beta c chain of the receptor for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and its activation requires the membrane-proximal region. Molecular and cellular biology 14, 4335-4341.

203. Quelle, F.W., Shimoda, K., Thierfelder, W., Fischer, C., Kim, A., Ruben, S.M., Cleveland, J.L., Pierce, J.H., Keegan, A.D., Nelms, K., et al., 1995. Cloning of murine Stat6 and human Stat6, Stat proteins that are tyrosine phosphorylated in responses to IL-4 and IL-3 but are not required for mitogenesis. Molecular and cellular biology 15, 3336-3343.

204. Queudeville, M., Seyfried, F., Eckhoff, S.M., Trentin, L., Ulrich, S., Schirmer, M., Debatin, K.M., Meyer, L.H., 2012. Rapid engraftment of human ALL in NOD/SCID mice involves deficient apoptosis signaling. Cell death & disease 3, e364.

205. Rampal, R., Al-Shahrour, F., Abdel-Wahab, O., Patel, J.P., Brunel, J.P., Mermel, C.H., Bass, A.J., Pretz, J., Ahn, J., Hricik, T., Kilpivaara, O., Wadleigh, M., Busque, L., Gilliland, D.G., Golub, T.R., Ebert, B.L., Levine, R.L., 2014. Integrated genomic analysis illustrates the central role of JAK-STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasm pathogenesis. Blood 123, e123-133.

206. Rajala, H.L., Eldfors, S., Kuusanmaki, H., van Adrichem, A.J., Olson, T., Lagstrom, S., Andersson, E.I., Jerez, A., Clemente, M.J., Yan, Y., Zhang, D., Awwad, A., Ellonen, P., Kallioniemi, O., Wennerberg, K., Porkka, K., Maciejewski, J.P., Loughran, T.P., Jr., Heckman, C., Mustjoki, S., 2013. Discovery of somatic STAT5b mutations in large granular lymphocytic leukemia. Blood 121, 4541-4550.

207. Redell, M.S., Ruiz, M.J., Alonzo, T.A., Gerbing, R.B., Tweardy, D.J., 2011. Stat3 signaling in acute myeloid leukemia: ligand-dependent and -independent activation and induction of apoptosis by a novel small-molecule Stat3 inhibitor. Blood 117, 5701-5709.

208. Redell, M.S., Ruiz, M.J., Gerbing, R.B., Alonzo, T.A., Lange, B.J., Tweardy, D.J., Meshinchi, S., Children's Oncology, G., 2013. FACS analysis of Stat3/5 signaling reveals sensitivity to G-CSF and IL-6 as a significant prognostic factor in pediatric AML: a Children's Oncology Group report. Blood 121, 1083-1093.

209. Reiter, A., Schrappe, M., Ludwig, W.D., Hiddemann, W., Sauter, S., Henze, G., Zimmermann, M., Lampert, F., Havers, W., Niethammer, D., et al., 1994.

Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM 86. Blood 84, 3122-3133.

210. Renan, M.J., 1993. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. Molecular carcinogenesis 7, 139-146.

211. Ricciardi, M.R., McQueen, T., Chism, D., Milella, M., Estey, E., Kaldjian, E., Sebolt-Leopold, J., Konopleva, M., Andreeff, M., 2005. Quantitative single cell determination of ERK phosphorylation and regulation in relapsed and refractory primary acute myeloid leukemia. Leukemia 19, 1543-1549.

212. Riebe, C., Pries, R., Schroeder, K.N., Wollenberg, B., 2011. Phosphorylation of STAT3 in head and neck cancer requires p38 MAPKinase, whereas phosphorylation of STAT1 occurs via a different signaling pathway. Anticancer research 31, 3819-3825

213. Roifman, C.M., Wang, G.X., Freedman, M., Pan, Z.Q., 1992. IL-7 receptor mediates tyrosine phosphorylation but does not activate the phosphatidylinositol-phospholipase C-gamma 1 pathway. Journal of immunology 148, 1136-1142.

214. Rolfe, M., McLeod, L.E., Pratt, P.F., Proud, C.G., 2005. Activation of protein synthesis in cardiomyocytes by the hypertrophic agent phenylephrine requires the activation of ERK and involves phosphorylation of tuberous sclerosis complex 2 (TSC2). The Biochemical journal 388, 973-984.

215. Rothman, P., Kreider, B., Azam, M., Levy, D., Wegenka, U., Eilers, A., Decker, T., Horn, F., Kashleva, H., Ihle, J., et al., 1994. Cytokines and growth factors signal through tyrosine phosphorylation of a family of related transcription factors. Immunity 1, 457-468.

216. Santabarbara-Ruiz, P., Lopez-Santillan, M., Martinez-Rodriguez, I., Binagui-Casas, A., Perez, L., Milan, M., Corominas, M., Serras, F., 2015. ROS-Induced JNK and p38 Signaling Is Required for Unpaired Cytokine Activation during Drosophila Regeneration. PLoS genetics 11, e1005595.

217. Sartor, C.I., Dziubinski, M.L., Yu, C.L., Jove, R., Ethier, S.P., 1997. Role of epidermal growth factor receptor and STAT-3 activation in autonomous proliferation of SUM-102PT human breast cancer cells. Cancer research 57, 978-987.

218. Satoh, T., Nakafuku, M., Miyajima, A., Kaziro, Y., 1991. Involvement of ras p21 protein in signal-transduction pathways from interleukin 2, interleukin 3, and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, but not from interleukin 4. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88, 3314-3318.

219. Schindler, C., Fu, X.Y., Improta, T., Aebersold, R., Darnell, J.E., Jr., 1992a. Proteins of transcription factor ISGF-3: one gene encodes the 91-and 84-kDa ISGF-3 proteins that are activated by interferon alpha. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89, 7836-7839.

220. Schindler, C., Shuai, K., Prezioso, V.R., Darnell, J.E., Jr., 1992b. Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor. Science 257, 809-813.

221. Schrader, J.W., Crapper, R.M., 1983. Autogenous production of a hemopoietic growth factor, persisting-cell-stimulating factor, as a mechanism for transformation of bone marrow-derived cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 80, 6892-6896..

222. Schrappe, M., Reiter, A., Ludwig, W.D., Harbott, J., Zimmermann, M., Hiddemann, W., Niemeyer, C., Henze, G., Feldges, A., Zintl, F., Kornhuber, B., Ritter, J., Welte, K., Gadner, H., Riehm, H., 2000a. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. Blood 95, 3310-3322.

223. Schrappe, M., Reiter, A., Zimmermann, M., Harbott, J., Ludwig, W.D., Henze, G., Gadner, H., Odenwald, E., Riehm, H., 2000b. Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. Berlin-Frankfurt-Munster. Leukemia 14, 2205-2222.

224. Schuringa, J.J., Wierenga, A.T., Kruijer, W., Vellenga, E., 2000. Constitutive Stat3, Tyr705, and Ser727 phosphorylation in acute myeloid leukemia cells caused by the autocrine secretion of interleukin-6. Blood 95, 3765-3770.

225. Sengupta, T.K., Talbot, E.S., Scherle, P.A., Ivashkiv, L.B., 1998. Rapid inhibition of interleukin-6 signaling and Stat3 activation mediated by mitogen-activated protein kinases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95, 11107-11112.

226. Sexl, V., Piekorz, R., Moriggl, R., Rohrer, J., Brown, M.P., Bunting, K.D., Rothammer, K., Roussel, M.F., Ihle, J.N., 2000. Stat5a/b contribute to interleukin 7-induced B-cell precursor expansion, but abl-and bcr/abl-induced transformation are independent of stat5. Blood 96, 2277-2283.

227. Shen, Y., Devgan, G., Darnell, J.E., Jr., Bromberg, J.F., 2001. Constitutively activated Stat3 protects fibroblasts from serum withdrawal and UV-induced apoptosis and antagonizes the proapoptotic effects of activated Stat1. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98, 1543-1548.

228. Shimoda, K., van Deursen, J., Sangster, M.Y., Sarawar, S.R., Carson, R.T., Tripp, R.A., Chu, C., Quelle, F.W., Nosaka, T., Vignali, D.A., Doherty, P.C., Grosveld, G., Paul, W.E., Ihle, J.N., 1996. Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. Nature 380, 630-633.

229. Shuai, K., Schindler, C., Prezioso, V.R., Darnell, J.E., Jr., 1992. Activation of transcription by IFN-gamma: tyrosine phosphorylation of a 91-kD DNA binding protein. Science 258, 1808-1812.

230. Shuai, K., Stark, G.R., Kerr, I.M., Darnell, J.E., Jr., 1993. A single phosphotyrosine residue of Stat91 required for gene activation by interferon-gamma. Science 261, 1744-1746.

231. Shuai, K., Horvath, C.M., Huang, L.H., Qureshi, S.A., Cowburn, D., Darnell, J.E., Jr., 1994. Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. Cell 76, 821-828.

232. Shukla, S., Shishodia, G., Mahata, S., Hedau, S., Pandey, A., Bhambhani, S., Batra, S., Basir, S.F., Das, B.C., Bharti, A.C., 2010. Aberrant expression and constitutive activation of STAT3 in cervical carcinogenesis: implications in high-risk human papillomavirus infection. Molecular cancer 9, 282

233. Shurtleff, S.A., Buijs, A., Behm, F.G., Rubnitz, J.E., Raimondi, S.C., Hancock, M.L., Chan, G.C., Pui, C.H., Grosveld, G., Downing, J.R., 1995. TEL/AML1 fusion

resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. Leukemia 9, 1985-1989.

234. Silvennoinen, O., Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Cleveland, J.L., Yi, T., Ihle, J.N., 1993. Structure of the murine Jak2 protein-tyrosine kinase and its role in interleukin 3 signal transduction. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90, 8429-8433.

235. Silverman, L.B., Gelber, R.D., Dalton, V.K., Asselin, B.L., Barr, R.D., Clavell, L.A., Hurwitz, C.A., Moghrabi, A., Samson, Y., Schorin, M.A., Arkin, S., Declerck, L., Cohen, H.J., Sallan, S.E., 2001. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. Blood 97, 1211-1218.

236. Silverman, L.B., Sallan, S.E., 2003. Newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors and treatment. Current opinion in hematology 10, 290-296.

237. Sinibaldi, D., Wharton, W., Turkson, J., Bowman, T., Pledger, W.J., Jove, R., 2000. Induction of p21WAF1/CIP1 and cyclin D1 expression by the Src oncoprotein in mouse fibroblasts: role of activated STAT3 signaling. Oncogene 19, 5419-5427.

238. Sironi, J.J., Ouchi, T., 2004. STAT1-induced apoptosis is mediated by caspases 2, 3, and 7. The Journal of biological chemistry 279, 4066-4074.

239. Sluss, H.K., Barrett, T., Derijard, B., Davis, R.J., 1994. Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases. Molecular and cellular biology 14, 8376-8384.

240. Soliman, G.A., 2013. The role of mechanistic target of rapamycin (mTOR) complexes signaling in the immune responses. Nutrients 5, 2231-2257.

241. Spiekermann, K., Pau, M., Schwab, R., Schmieja, K., Franzrahe, S., Hiddemann, W., 2002. Constitutive activation of STAT3 and STAT5 is induced by leukemic fusion proteins with protein tyrosine kinase activity and is sufficient for transformation of hematopoietic precursor cells. Experimental hematology 30, 262-271.

242. Stark, G.R., Darnell, J.E., Jr., 2012. The JAK-STAT pathway at twenty. Immunity 36, 503-514.

243. Stary, J., Zimmermann, M., Campbell, M., Castillo, L., Dibar, E., Donska, S., Gonzalez, A., Izraeli, S., Janic, D., Jazbec, J., Konja, J., Kaiserova, E., Kowalczyk, J., Kovacs, G., Li, C.K., Magyarosy, E., Popa, A., Stark, B., Jabali, Y., Trka, J., Hrusak, O., Riehm, H., Masera, G., Schrappe, M., 2014. Intensive chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: results of the randomized intercontinental trial ALL IC-BFM 2002. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 32, 174-184.

244. Stirewalt, D.L., Kopecky, K.J., Meshinchi, S., Appelbaum, F.R., Slovak, M.L., Willman, C.L., Radich, J.P., 2001. FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. Blood 97, 3589-3595.

245. Stokoe, D., Macdonald, S.G., Cadwallader, K., Symons, M., Hancock, J.F., 1994. Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. Science 264, 1463-1467.

246. Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N., Kishimoto, T., Akira, S., 1997. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early

embryonic lethality. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94, 3801-3804.

247. Takeda, K., Clausen, B.E., Kaisho, T., Tsujimura, T., Terada, N., Forster, I., Akira, S., 1999. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. Immunity 10, 39-49.

248. Takemoto, S., Mulloy, J.C., Cereseto, A., Migone, T.S., Patel, B.K., Matsuoka, M., Yamaguchi, K., Takatsuki, K., Kamihira, S., White, J.D., Leonard, W.J., Waldmann, T., Franchini, G., 1997. Proliferation of adult T cell leukemia/lymphoma cells is associated with the constitutive activation of JAK/STAT proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94, 13897-13902.

249. Tallen, G., Ratei, R., Mann, G., Kaspers, G., Niggli, F., Karachunsky, A., Ebell, W., Escherich, G., Schrappe, M., Klingebiel, T., Fengler, R., Henze, G., von Stackelberg, A., 2010. Long-term outcome in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia after time-point and site-of-relapse stratification and intensified short-course multidrug chemotherapy: results of trial ALL-REZ BFM 90. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 28, 2339-2347.

250. Tasian, S.K., Doral, M.Y., Borowitz, M.J., Wood, B.L., Chen, I.M., Harvey, R.C., Gastier-Foster, J.M., Willman, C.L., Hunger, S.P., Mullighan, C.G., Loh, M.L., 2012. Aberrant STAT5 and PI3K/mTOR pathway signaling occurs in human CRLF2-rearranged B-precursor acute lymphoblastic leukemia. Blood 120, 833-842.

251. Teachey, D.T., Hunger, S.P., 2013. Predicting relapse risk in childhood acute lymphoblastic leukaemia. British journal of haematology 162, 606-620.

252. Teglund, S., McKay, C., Schuetz, E., van Deursen, J.M., Stravopodis, D., Wang, D., Brown, M., Bodner, S., Grosveld, G., Ihle, J.N., 1998. Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. Cell 93, 841-850.

253. Thierfelder, W.E., van Deursen, J.M., Yamamoto, K., Tripp, R.A., Sarawar, S.R., Carson, R.T., Sangster, M.Y., Vignali, D.A., Doherty, P.C., Grosveld, G.C., Ihle, J.N., 1996. Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. Nature 382, 171-174.

254. Tian, S.S., Lamb, P., Seidel, H.M., Stein, R.B., Rosen, J., 1994. Rapid activation of the STAT3 transcription factor by granulocyte colony-stimulating factor. Blood 84, 1760-1764.

255. Tibbles, L.A., Ing, Y.L., Kiefer, F., Chan, J., Iscove, N., Woodgett, J.R., Lassam, N.J., 1996. MLK-3 activates the SAPK/JNK and p38/RK pathways via SEK1 and MKK3/6. The EMBO journal 15, 7026-7035.

256. Tosato, G., Tanner, J., Jones, K.D., Revel, M., Pike, S.E., 1990. Identification of interleukin-6 as an autocrine growth factor for Epstein-Barr virus-immortalized B cells. Journal of virology 64, 3033-3041.

257. Towatari, M., Iida, H., Tanimoto, M., Iwata, H., Hamaguchi, M., Saito, H., 1997. Constitutive activation of mitogen-activated protein kinase pathway in acute leukemia cells. Leukemia 11, 479-484.

258. Turkson, J., Bowman, T., Garcia, R., Caldenhoven, E., De Groot, R.P., Jove, R., 1998. Stat3 activation by Src induces specific gene regulation and is required for cell transformation. Molecular and cellular biology 18, 2545-2552.

259. Turkson, J., Bowman, T., Adnane, J., Zhang, Y., Djeu, J.Y., Sekharam, M., Frank, D.A., Holzman, L.B., Wu, J., Sebti, S., Jove, R., 1999. Requirement for Ras/Rac1-mediated p38 and c-Jun N-terminal kinase signaling in Stat3 transcriptional activity induced by the Src oncoprotein. Molecular and cellular biology 19, 7519-7528.

260. Turkson, J., Ryan, D., Kim, J.S., Zhang, Y., Chen, Z., Haura, E., Laudano, A., Sebti, S., Hamilton, A.D., Jove, R., 2001. Phosphotyrosyl peptides block Stat3-mediated DNA binding activity, gene regulation, and cell transformation. The Journal of biological chemistry 276, 45443-45455.

261. van der Sligte, N.E., Scherpen, F.J., Meeuwsen-de Boer, T.G., Lourens, H.J., Ter Elst, A., Diks, S.H., Guryev, V., Peppelenbosch, M.P., van Leeuwen, F.N., de Bont, E.S., 2015. Kinase activity profiling reveals active signal transduction pathways in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a new approach for target discovery. Proteomics 15, 1245-1254.

262. Verheij, M., Bose, R., Lin, X.H., Yao, B., Jarvis, W.D., Grant, S., Birrer, M.J., Szabo, E., Zon, L.I., Kyriakis, J.M., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z., Kolesnick, R.N., 1996. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. Nature 380, 75-79.

263. Ward, A.C., Touw, I., Yoshimura, A., 2000. The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. Blood 95, 19-29.

264. Weber-Nordt, R.M., Egen, C., Wehinger, J., Ludwig, W., Gouilleux-Gruart, V., Mertelsmann, R., Finke, J., 1996. Constitutive activation of STAT proteins in primary lymphoid and myeloid leukemia cells and in Epstein-Barr virus (EBV)-related lymphoma cell lines. Blood 88, 809-816.

265. Welch, P.A., Namen, A.E., Goodwin, R.G., Armitage, R., Cooper, M.D., 1989. Human IL-7: a novel T cell growth factor. Journal of immunology 143, 3562-3567.

266. Whitehead, V.M., Payment, C., Cooley, L., Lauer, S.J., Mahoney, D.H., Shuster, J.J., Vuchich, M.J., Bernstein, M.L., Look, A.T., Pullen, D.J., Camitta, B., 2001. The association of the TEL-AML1 chromosomal translocation with the accumulation of methotrexate polyglutamates in lymphoblasts and with ploidy in childhood B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. Leukemia 15, 1081-1088.

267. Wood, K.W., Sarnecki, C., Roberts, T.M., Blenis, J., 1992. ras mediates nerve growth factor receptor modulation of three signal-transducing protein kinases: MAP kinase, Raf-1, and RSK. Cell 68, 1041-1050.

268. Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J., Greenberg, M.E., 1995. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. Science 270, 1326-1331.

269. Xia, Z., Baer, M.R., Block, A.W., Baumann, H., Wetzler, M., 1998. Expression of signal transducers and activators of transcription proteins in acute myeloid leukemia blasts. Cancer research 58, 3173-3180.

270. Xu, X., Fu, X.Y., Plate, J., Chong, A.S., 1998. IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression. Cancer research 58, 2832-2837.

271. Yamamoto, K., Quelle, F.W., Thierfelder, W.E., Kreider, B.L., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Silvennoinen, O., Ihle, J.N., 1994. Stat4, a novel gamma

interferon activation site-binding protein expressed in early myeloid differentiation. Molecular and cellular biology 14, 4342-4349.

272. Yao, Z., Cui, Y., Watford, W.T., Bream, J.H., Yamaoka, K., Hissong, B.D., Li, D., Durum, S.K., Jiang, Q., Bhandoola, A., Hennighausen, L., O'Shea, J.J., 2006. Stat5a/b are essential for normal lymphoid development and differentiation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103, 1000-1005.

273. You, Z., Xu, D., Ji, J., Guo, W., Zhu, W., He, J., 2012. JAK/STAT signal pathway activation promotes progression and survival of human oesophageal squamous cell carcinoma. Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico 14, 143-149.

274. Yu, C.L., Meyer, D.J., Campbell, G.S., Larner, A.C., Carter-Su, C., Schwartz, J., Jove, R., 1995. Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. Science 269, 81-83.

275. Yu, C.L., Jove, R., Burakoff, S.J., 1997. Constitutive activation of the Janus kinase-STAT pathway in T lymphoma overexpressing the Lck protein tyrosine kinase. Journal of immunology 159, 5206-5210.

276. Zenatti, P.P., Ribeiro, D., Li, W., Zuurbier, L., Silva, M.C., Paganin, M., Tritapoe, J., Hixon, J.A., Silveira, A.B., Cardoso, B.A., Sarmento, L.M., Correia, N., Toribio, M.L., Kobarg, J., Horstmann, M., Pieters, R., Brandalise, S.R., Ferrando, A.A., Meijerink, J.P., Durum, S.K., Yunes, J.A., Barata, J.T., 2011. Oncogenic IL7R gain-of-function mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. Nature genetics 43, 932-939.

277. Zhang, M., Mathews Griner, L.A., Ju, W., Duveau, D.Y., Guha, R., Petrus, M.N., Wen, B., Maeda, M., Shinn, P., Ferrer, M., Conlon, K.D., Bamford, R.N., O'Shea, J.J., Thomas, C.J., Waldmann, T.A., 2015. Selective targeting of JAK/STAT signaling is potentiated by Bcl-xL blockade in IL-2-dependent adult T-cell leukemia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 112, 12480-12485

278. Zhang, X., Blenis, J., Li, H.C., Schindler, C., Chen-Kiang, S., 1995. Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes. Science 267, 1990-1994.

279. Zhong, Z., Wen, Z., Darnell, J.E., Jr., 1994a. Stat3 and Stat4: members of the family of signal transducers and activators of transcription. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91, 4806-4810.

280. Zhong, Z., Wen, Z., Darnell, J.E., Jr., 1994b. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. Science 264, 95-98.

281. Zong, C., Yan, R., August, A., Darnell, J.E., Jr., Hanafusa, H., 1996. Unique signal transduction of Eyk: constitutive stimulation of the JAK-STAT pathway by an oncogenic receptor-type tyrosine kinase. The EMBO journal 15, 4515-4525.

282. Zushi, S., Shinomura, Y., Kiyohara, T., Miyazaki, Y., Kondo, S., Sugimachi, M., Higashimoto, Y., Kanayama, S., Matsuzawa, Y., 1998. STAT3 mediates the survival signal in oncogenic ras-transfected intestinal epithelial cells. International journal of cancer. Journal international du cancer 78, 326-330.

Danksagung

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.