

**Entwicklung bifunktionaler retroviraler Vektoren zur Untersuchung
der Pathogenese myeloischer Systemerkrankungen und zur Evaluierung
therapeutischer Zielstrukturen**

**Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover**

**zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.**

**genehmigte Dissertation
von**

**Dipl.-Biol. Yıldırım Doğan
geboren am 19.09.1979 in Wolfenbüttel**

**Hannover
2008**

Referentin: Prof. Dr. phil. nat. Michaela Scherr

Korreferent: Prof. Dr. Christopher Baum

Tag der Promotion: 10.07.2008

*Diese Arbeit ist meiner Familie und meinen Freunden
gewidmet.*

Zusammenfassung

Hämatologische Tumoren sind durch genetische Aberrationen gekennzeichnet, wobei mehrere genetische Alterationen in leukämischen Zellen gefunden werden. Die Entwicklung bestimmter akuter Leukämien wird als Resultat eines *multi-step* Prozesses postuliert. Dabei werden akute Leukämien durch aberrante Fusionsgene, die Transkriptionsfaktoren einschließen, Verlust von Tumorkontrollmechanismen und aktivierende Mutationen in Genen, die Proliferation oder Überleben für die hämatopoetische Zelle vermitteln, initiiert. Leukämogenese ist ein komplexer Prozess von kooperierenden genetischen Läsionen. Weiterhin sind Transformationsstärken von kooperierenden genetischen Aberrationen nicht ausgiebig untersucht worden. Nach wie vor sind Zellkultursysteme zur schnellen Identifizierung von kooperierenden genetischen Aberrationen nicht vorhanden. Daher wurden bifunktionale retrovirale Vektoren entwickelt für die retroviral-vermittelte Expression von onkogenen Zytokinrezeptoren (*gain-of-function*) und gleichzeitige RNAi-vermittelte Reduktion von Transkriptionsfaktoren (*loss-of-function*) in faktor- (IL-3) abhängigen myeloischen 32D-Zellen. Die onkogenen Zytokinrezeptoren β GMR-I374N-, cKitV558D- oder mplS368C wurden zur Transformation von 32D-Zellen in faktorunabhängiges Wachstum gewählt, um Transformationsstärken durch die Klonierungseffizienzen im *limiting-dilution* Test zu bestimmen. Kooperierende genetische Aberrationen wurden analysiert, indem Transformationsstärken onkogener Zytokinrezeptoren unter RNAi-vermittelter Reduktion von p53, PU.1, LEF-1 oder Bmi-1 in 32D oder p53-defizienten 32D-p53-hypo-Zellen bestimmt wurden. Einzeln eingeführt, transformierten c-KitV558D und mplS368C bis zu 25-fach stärker als β -GMR-I374N. PU.1-*knock down* setzte die Proliferation von 32D-Zellen stark herab. Im Gegensatz dazu reduzierte sich die Transformationsstärke im Vergleich zur Kontroll-shRNA, wenn c-KitV558D oder mplS368C unter PU.1-*knock down* exprimiert wurden, wobei die Transformation mit β -GMR-I374N-shPU.1 fehlschlug. Wenn c-KitV558D-shPU.1 in 32D-p53-hypo transduziert wurde, stieg die Transformationsstärke im Vergleich zu c-KitV558D-Kontroll-shRNA signifikant an. Schlussfolgerung: Das Überleben von 32D-Zellen sowie transformierten 32D-Zellen ist wahrscheinlich von PU.1-vermittelter Blockierung des p53-Proteins abhängig. Das vorgestellte Zellkultursystem ist ein potentielles Werkzeug für die Quantifizierung von kooperierenden genetischen Aberrationen bei der Leukämogenese.

Schlagworte: Akute Leukämie, Zellkultursystem, RNAi.

Abstract

Hematological malignancies are identified by genetic aberrations, whereby several genetic alterations are often seen in leukemia cells. The development of certain acute leukemia is proposed to be a multi-step process. Acute leukemia is initiated by aberrant fusion genes involving transcription factors, loss-of-function of tumor surveillance and activating mutations in genes involved in proliferation and survival of hematopoietic cells. Leukemogenesis seems to be a complex procedure of cooperating genetic lesions. Furthermore, little is known about transformation potentials of cooperating aberrations. However, there are no cell culture assays available for the rapid identification of cooperating aberrations. Bifunctional retroviral vectors were developed for simultaneous expression of oncogenic cytokine receptors (gain-of-function) and shRNAs against transcription factors (loss-of-function) in factor (IL-3) dependent myeloid 32D cells. Oncogenic cytokine receptors β GMR-I374N-, c-KitV558D-, or mplS368C were used to transform 32D cells to factor independent growth for determination of transformation rates based on cloning efficiencies in a limiting dilution assay. Cooperating genetic aberrations were analysed by determination of transformation rates of oncogenic cytokine receptors along with RNAi-mediated reduction of p53, PU.1, LEF-1 or Bmi-1 in 32D or p53-deficient 32D-p53-hypo. c-KitV558D or mplS368C gave up to 25 fold higher transformation rates compared to β GMR-I374N when singly transduced. PU.1 knock down alone drastically reduced 32D proliferation. In contrast, c-KitV558D or mplS368C expression and knock down of PU.1 reduced transformation rates with respect to a control-shRNA and transformation failed with β GMR-I374N-shPU.1. When c-KitV558D-shPU.1 was transduced into 32D-p53-hypo cells, transformation rate was significantly elevated with respect to c-KitV558D-shcontrol expressing cells. Conclusion: The survival of 32D cells and transformed 32D cells is probably dependent on PU.1-mediated blocking of p53. The provided cell culture model is a potential tool for quantification of cooperating genetic aberrations in hematopoietic cells.

Keywords: Acute leukemia, cell culture assay, RNAi.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungen	1
1 Einleitung	1
1.1 Hämatopoese	1
1.1.1 Normale Hämatopoese	1
1.1.2 Leukämien	2
1.2 Regulation der Hämatopoese	3
1.2.1 Regulation der Hämatopoese durch Hämatopoetin Rezeptoren und Rezeptor-Tyrosinkinasen	3
1.2.1.1 Zytokinrezeptor-Formation	4
1.2.1.2 Aufbau der GM-CSF, IL-3 und IL-5 Rezeptorkomplexe	4
1.2.1.3 Funktion des Kit-Rezeptors in hämatopoetischen Zellen	5
1.2.1.4 Funktion des Mpl-Rezeptors	5
1.2.1.5 Überlappende Signalwege der GM-CSF- und Mpl-Rezeptoren	6
1.2.1.6 Aktivierung des Kit-Rezeptors	6
1.2.1.7 Zellulärer Kontext der Kit-Signalwege	6
1.2.1.8 Onkogene Mutationen in Zytokinrezeptoren	6
1.2.1.9 Die β -GMR-I374N Rezeptormutante	6
1.2.1.10 Die konstitutiv aktive juxtamembran Domänen (JMD) Mutante c-KitV558D	7
1.2.1.11 Die konstitutiv aktive mplS368C Rezeptormutante	7
1.2.2 Regulation der Hämatopoese durch Transkriptionsfaktoren	8
1.2.2.1 PU.1 ein hämatopoetischer Transkriptionsfaktor	8
1.2.2.2 Dysregulierung des proto-onkogenen Transkriptionsfaktors PU.1 kann transformieren	8
1.2.2.3 LEF-1	9
1.2.2.4 Bmi-1 in Stammzellerneuerung und Leukämien	9
1.3 Der Tumorsuppressor p53	10
1.3.1 Regulierung von p53	10
1.3.2 p53-vermittelte Apoptose	11
1.3.3 p53-vermittelter Zellzyklusarrest	12
1.3.4 Rolle von p53-Mutationen in Krebszellen	12
1.3.5 p53-Alterationen in Leukämien	12
1.4 Modelle der Genanalyse	13
1.4.1 RNA-Interferenz	13
1.4.2 Mechanismus der RNAi	13
1.4.3 MicroRNAs	14
1.4.4 miRNA-ähnliche shRNAs	15
1.4.5 Gentransfer durch retrovirale Vektoren	15
Ziele	18
2.1.0 Material	19
2.1.1 Chemikalien	19
2.1.2 Gebrauchsmaterialien	19
2.1.3 Stammlösungen für Zellkultur	20
2.1.4 Medien und Lösungen für Bakterienkulturen	20
2.1.5 Reagenzien-Satz und Fertiglösungen	21
2.1.6 Geräte	21
2.1.7 Synthetische Oligonukleotide	22
2.1.8 Primer und Sonden für quantitative <i>real-time</i> PCR	23
2.1.9 Sequenzier-PCR-Primer	24
2.1.10 Plasmide	24
2.1.11 Restriktionsenzyme	25
2.1.12 Bakterienstämme	25
2.1.13 Zelllinien	25
2.1.14 Software	26

2.2.0 Methoden	26
2.2.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	26
2.2.2 Transformation von Bakterien	27
2.2.3 Photometrische Messung der DNA-Konzentration	27
2.2.4 Plasmid-DNA-Minipräparation	27
2.2.5 Plasmid-DNA-Maxipräparation	27
2.2.6 Restriktionsverdau	28
2.2.7 Klonierung von shRNA-kodierenden Oligonukleotiden in das pSuper Plasmid	28
2.2.8 Phosphorylierung und Hybridisierung	29
2.2.9 Ligation	29
2.2.10 Klonierung in retrovirale Plasmide	29
2.2.11 Sequenzier-PCR	30
2.2.12 Kryokonservierung von Zellen	30
2.2.13 Calcium-Phosphat-Transfektion	31
2.2.14 Konzentrierung des Virus	31
2.2.15 Titerbestimmung	32
2.2.16 RNA-Isolierung	32
2.2.17 <i>DNaseI</i> -Verdau	32
2.2.18 cDNA Synthese	33
2.2.19 Quantitative <i>real-time</i> PCR	33
2.2.20 Berechnung der Änderung der PU.1-mRNA relativ zum Referenzgen (GAPDH)	34
2.2.21 Isolation genomischer DNA aus Zellklonen	35
2.2.22 Viruskopienzahl-Bestimmung von retroviral transduzierten Zellklonen durch qRT-PCR	35
2.2.23 Retrovirale Transduktion von 32D-Zellen	36
2.2.24 Isolation von GFP-positiver Zellen mit einem FACS-Gerät und <i>limiting dilution</i> Test	36
3 Ergebnisse	37
3.1 Herstellung von bifunktionalen retroviralen Vektoren	37
3.1.1 Generierung einer <i>unique-restrictionsite</i> in die retroviralen Plasmide R780 und R780-βGMR-I374N	37
3.1.2 Klonierung von shRNA-kodierenden Oligonukleotiden in die <i>SnaBI</i> -Schnittstelle von R780S und R780S-βGMR-I374N	38
3.1.3 Klonierung der cDNAs von c-KitV558D und mplS368S Rezeptorpunktmutanten in die <i>NotI</i> -Schnittstelle der R780S, R780S-shctrl sowie -shPU.1 Plasmide	39
3.2 Herstellung eines p53-defizienten 32D-Zellklons durch lentiviral-vermittelte RNAi	40
3.3 Proliferation von 32D und 32D-p53-hypo Zellen	40
3.3.1 Test auf Faktorabhängigkeit von 32D und 32D-p53-hypo	41
3.4 Funktionelle Evaluation des Transformationspotentials der onkogenen Zytokinrezeptoren β-GMR-I374N, c-KitV558D und mplS368S in 32D-Zellen	42
3.5 Differenzierungspotential von wildtyp 32D, 32D-βGMR-I374N, 32D-c-KitV558D in G-CSF zu Granulozyten	43
3.6 Zellkulturmodell zur Identifizierung sowie Quantifizierung kooperierender Effekte von Onkogenen bei der Transformation hämatopoetischer Zellen	45
3.6.1 Experimenteller Aufbau des Zellkulturassays	45
3.6.2 Plasmid (Virus)-Kopienzahl-Bestimmung in Zellklonen nach Virusintegration	47
3.6.3 Quantifizierung der Transformationsstärke von βGMR-I374N, c-KitV558D und mplS368C untereinander	48
3.6.4 Die alleinige Expression von R780S-shcontrol, -shp53, -shPU.1, -shLEF.1, -shBmi-1 in 32D-Zellen bzw. 32D-hypo-p53 wirkt nicht transformierend	49
3.6.5 Evaluation der Transformationsstärke von β-GMR-I374N unter RNAi-vermittelter Reduktion von p53, PU.1, LEF-1 oder Bmi-1 in 32D-Zellen	52
3.6.6 Evaluation der Transformationsstärke von βGMR-I374N unter RNAi-vermittelter Reduktion von PU.1, LEF-1 oder Bmi-1 in 32D-p53-hypo-Zellen	53
3.6.7 Evaluation der Transformationsstärke von c-KitV558D unter RNAi-vermittelter Reduktion von p53, PU.1, LEF-1 oder Bmi-1 in 32D-Zellen	54
3.6.8 Evaluation der Transformationsstärke von c-KitV558D unter RNAi-vermittelter Reduktion von PU.1, LEF-1 oder Bmi-1 in 32D-p53-hypo-Zellen	56

3.6.9 Transformationsstärken onkogener Zytokinrezeptoren unter Expression einer PU.1-spezifischen shRNA in 32D-Zellen	57
3.6.10 Transformationsstärken onkogener Zytokinrezeptoren mit einer PU.1- spezifischen shRNA in 32D-p53-hypo-Zellen	60
3.7 Herstellung transformierter polyklonaler 32D-Zellen durch βGMR-I374N und c-KitV558D	64
3.8 Lentiviral vermittelter PU.1-mRNA <i>knock down</i> setzt die Proliferation von 32D und 32D-cKitV559A stark herunter und führt 32D-βGMR-I374N –exprimierende Zellen zum Zelltod.	64
3.9 Proliferation von 32D sowie 32D-c-KitV558D-shetrl und 32D-c-KitV558D-shPU.1-Klone66	66
3.10 Abhängigkeit der MFI von der Viruskopienzahl	69
4 Diskussion	71
4.1 Zellkulturtest zur Identifizierung von kooperierenden genetischen Alterationen bei der Entstehung von Leukämien	71
4.2 Entwicklung bifunktionaler retroviraler Vektoren	72
4.3 Transformation hämatopoetischer Zellen durch onkogene Zytokinrezeptoren	72
4.4 Differenzierungspotential von 32D, 32D- β GMR-I374N, 32D-c-KitV558D in GCSF	73
4.5 Transformationsstärken von c-KitV558D und mplS368C sind ca. 25-fach höher als β -GMR-I374N in 32D-Zellen	73
4.6 β GMR-I374N oder c-KitV558D-Expression unter RNAi-vermittelter p53-, PU.1-, LEF-1-, oder Bmi-1 <i>knock down</i> wirkt sich nicht verstärkend auf die Transformationsstärke in 32D und 32D-p53-hypo-Zellen	74
4.7 Onkogene Zytokinrezeptor-Expression unter RNAi-vermittelter PU.1-Reduktion als Modell für zwei kooperierende genetische Alterationen im Zellkultursystem	74
4.8 Onkogene Zytokinrezeptor-Expression unter RNAi-vermittelter PU.1- und p53-Reduktion als Modell für drei kooperierende genetische Alterationen	75
4.9 Lentiviral-vermittelter PU.1- <i>knock down</i> inhibiert die Proliferation von 32D unter onkogenen Bedingungen	76
4.10 Onkogenes Kit-Signal allein war für die Transformation von 32D ausreichend und geringe PU.1-Reduktion wurde unter c-KitV558D-Expression toleriert	77
4.11 PU.1-Verlust vermittelt in p53-abhängiger Weise den Zelltod in 32D-Zellen	77
Referenzen	79
Lebenslauf	92
Danksagung	94
Erklärung zur Dissertation	96

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
AML	Akute myeloische Leukämie
Amp	Ampicillin
APAF1	<i>Apoptotic protease activating factor</i>
Aqua des.	Destilliertes Wasser
ATM	<i>Ataxia-telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosin Triphosphat
ATR	<i>Ataxia-telangiectasia related</i>
BAP	Bovine alkalische Phosphatase
BCR	Bruchpunktregion
BSA	Bovines Serum Albumin
C.elegans	<i>Chaenorapditis elegans</i>
CDK	Cyklin abhängige Kinase
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CLP	Gemeinsamer lymphatischer Vorläufer
CML	Chronische myeloische Leukämie
CMP	Gemeinsamer myeloischer Vorläufer
CO₂	Kohlendioxid
CPD	Cytoplasmatische Domäne
CPPT	<i>Central poly-purine tract</i>
Ct	Zyklenschwellenwert
Ctrl	Kontrolle
ddNTP	Di-Desoxy-Nukleotid-Triphosphat
DIHR	<i>Dimer interface homology region</i>
DMEM	Dulbecco's modifiziertes <i>Eagle</i> Medium
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
dNTP	Deoxy-Ribonukleotid Triphosphat
DSB	Doppelstrangbruch
dsRNA	Doppelsträngige Ribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	<i>Ethylen diamine tetrasodium acetat</i>
EGFP	Verstärktes grün-fluoreszierendes Protein

Epo	Erythropoetin
ErP	Erythrozyten Vorläufer
F-MLV	<i>Friend-murine leukemia virus</i>
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer
FBS	Fetales Rinderserum
FCS	Fetal Kalbserum
Flk-1	<i>Fms-like tyrosine kinase-1</i>
G-CSF	Granulozyten-Kolonien stimulierender Faktor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3 phosphat-Dehydrogenase
GH	Wachstumshormon
GIST	Gastrointestinal-Stroma-Tumoren
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
GMP	Granulozyten/Monozyten Vorläufer
GMR	Granulozyten/Makrophagen Rezeptor
HBS	<i>Hepes buffered saline</i>
HDM2	<i>Human double minute 2</i>
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HMG	<i>High mobility group</i>
HSZ	Hämatopoetische Stammzelle
IL	Interleukin
IRES	<i>Internal ribosome entry side</i>
ITD	<i>Internal tandem duplication</i>
JAK	Januskinase
JMD	Juxtamembran Domäne
LB	Lysogeny Broth
LEF-1	<i>Lymphoid enhancer-binding protein-1</i>
Lin-	Lineage negative
LT-HSZ	Langzeit-hämatopoetische Stammzelle
LTR	Lange terminale Wiederholungssequenz
M	Makrophage
M-CSF	Makrophagen Kolonien-stimulierender Faktor
MAP	<i>Mitogen activated protein</i>
MDM2	<i>Mouse double minute 2</i>
MDM4	<i>Mouse double minute 4</i>

MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MegE	Megakaryozyten/Erythrozyten
MEP	Megakaryozyten/Erythrozyten Vorläufer
MESV	Murines embryonales Stammzellvirus
MFI	Durchschnittliche Fluoreszenzintensität
Min	Minute
miRNA	<i>Micro RNA</i>
MkP	Megakaryozyten Vorläufer
MMLV	<i>Moloney murines Leukemievirus</i>
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MOMP	Mitochondrienausmembran-Permeabilisierung
Mpl	Murine myeloproliferative Leukämie
MPP	Multipotenter Vorläufer
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MuLV	Murines Leukemievirus
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OD	Optische Dichte
PACT	<i>Protein activator of the interferon-induced protein kinase</i>
PBMZ	Periphere Blut-Mononukleäre Zellen
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PcG	<i>Poly comb group</i>
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigene</i>
PCR	Polymerasenkettenreaktion
PDGFR	<i>Platelet derived growth factor receptor</i>
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PKR	Proteinkinase R
PLL	Poly-L-Lysin
PNK	Polynukleotidkinase
pRb	Retinoblastom
Pre-miRNA	Prekursoren miRNA
Pri-miRNA	Primäre miRNA
PTGS	Post-transkriptionale Genausschaltung
qRT-PCR	Quantitative <i>real-time</i> PCR
R	Rezeptor

RFP	Rot-fluoreszierendes Protein
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RRE	<i>Rev-response element</i>
RT	Raumtemperatur
SCF	Stammzellfaktor
SCN	<i>Severe combined neutropenia</i>
Sek	Sekunde
SFFV	<i>Spleen focus-forming virus</i>
SH2	Src-Homologie 2
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
S.O.C	Super-optimales <i>broth</i> mit Glucose
ST-HSZ	Kurzzeit hämatopoetische Stammzelle
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBE	Tris-Bor-EDTA
TCR	T-Zellrezeptor
Tpo	Thrombopoetin
TRBP	<i>The human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein</i>
U	<i>Unit</i>
UpM	Umdrehung per Minute
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
VSV-G	Vesikuläres-Stomatitis-Virus-Glykoprotein
WEHICM	WEHI konditioniertes Medium
WPRE	<i>Wood chuck hepatitis post-transcriptional response element</i>

1 Einleitung

1.1 Hämatopoese

1.1.1 Normale Hämatopoese

Die pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) besitzen das Potential alle reifen Blutzellen zu bilden und sich im Knochenmark selbst zu erneuern und so zu erhalten. Es werden gegenwärtig zwei Klassen von HSZs voneinander unterschieden, die *long-term* HSZs (LT-HSZ) von den *short-term* HSZs (ST-HSZ). Die LT-HSZs zeichnen sich durch eine Selbsterneuerung über die gesamte Lebenszeit des Organismus aus und bilden durch asymmetrische Zellteilung die ST-HSZs. Die ST-HSZs bleiben ca. 8 Wochen durch Selbsterneuerung erhalten und differenzieren sich in multipotente Progenitoren (MPP). Die MPPs können sich zu gemeinsamen lymphatischen Vorläufern (CLP, *common lymphoid progenitor*) und den gemeinsamen myeloischen Vorläufern (CMP, *common myeloid progenitor*) differenzieren (**Abbildung 1**).

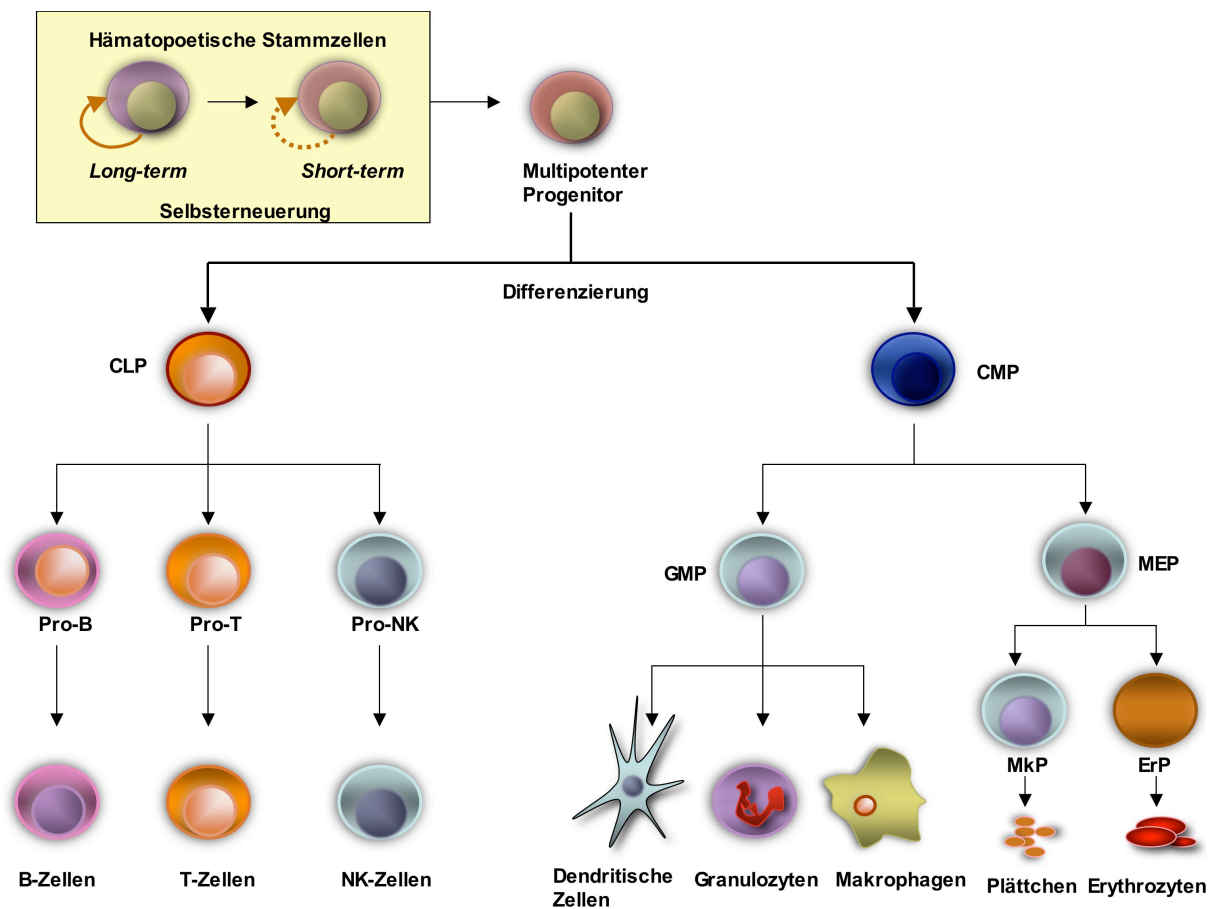


Abbildung 1 Schema der Differenzierung der pluripotenten HSZs zu Vorläuferstufen und den reifen Blutzellen. GMP (Granulozyten/Monozyten Progenitor), MEP (Megakaryozyten/Erythrozyten Progenitor), MkP (Megakaryozyten Progenitor), ErP (Erythrozyten Vorläufer). Verändert nach Weissman IL, 2000¹.

Die CLPs bilden B-, T- sowie NK-Zellen und die CMPs bilden Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, Megakaryozyten, Plättchen und Erythrozyten (**Abbildung 1**)¹.

1.1.2 Leukämien

Leukämien sind klonale Erkrankungen der hämatopoetischen Geweben. Leukämische Zellen unterscheiden sich in Proliferationskapazität und Differenzierungspotential von normalen hämatopoetischen Zellen. In der Klinik werden Leukämien in akute und chronische Formen unterteilt. Ausgehend vom Zelltyp wird die lymphatische von der myeloischen Leukämie unterschieden.

Zytologische Analysen am Genom leukämischer Zellen zeigen Translokationen, Deletionen, Inversionen, Duplikationen oder Insertionen, die sich als Umordnungen in den Chromosomen mikroskopisch erkennen lassen. Dabei mutiert oftmals ein Transkriptionsfaktor zu einem chimären Fusionsgen. In leukämischen Zellen finden sich als Resultat von chromosomalen Umordnungen onkogene Fusionsgene wie t(8;21) aml1-eto, t(15;17) pml-rar α , t(9;22) bcr-abl usw.. Weitere molekularbiologische Untersuchungen an aberranten hämatopoetische Zellen der akuten Leukämie identifizieren genetische Alterationen in Zytokinrezeptor-Genen [wie z.B. *Fms-like-tyrosine kinase-3* (flt-3), c-Kit], in Genen von Signalproteinen (wie ras) und in Transkriptionsfaktoren (wie z.B. C/EBP α , PU.1, LEF-1 usw.). Besonders häufig wurden auch inaktivierte Tumorsuppressorgene [wie z.B. Retinoblastom (Rb) oder p53] gefunden.

In experimentellen *in vitro* Studien mit primären hämatopoetische Zellen bewirkte das Einführen von onkogenen Fusionsgenen wie aml1-eto oder pml-rar α ein Differenzierungsblock und folglich die Bildung von unreifen hämatopoetischen Vorläufern (Blasten). Jedoch zeigten Mausmodelle für die akute Leukämie, dass ein alleiniger Differenzierungsblock nicht für eine leukämische Transformation ausreicht. Durch Koexpression einer aktivierenden Mutante des flt-3 und das aml1-eto konnte jedoch eine akute Leukämie in der Maus induziert werden. Für die Entstehung einer akuten Leukämie wird daher postuliert, dass zusätzlich zu einem Differenzierungsblock durch mutierte Transkriptionsfaktoren auch Proliferationssignale durch konstitutiv aktivierte Zytokinrezeptoren oder in ihren *downstream* Signalproteinen notwendig ist. Wahrscheinlich müssen auch weitere Kontrollmechanismen wie Tumorsuppressoren innerhalb der Zelle inaktiviert werden, damit Mutationen, die onkogene Proliferation erzeugen, selektiert werden und über die normale HSZ dominieren (**Abbildung 2**) (siehe Übersichtsartikel²).

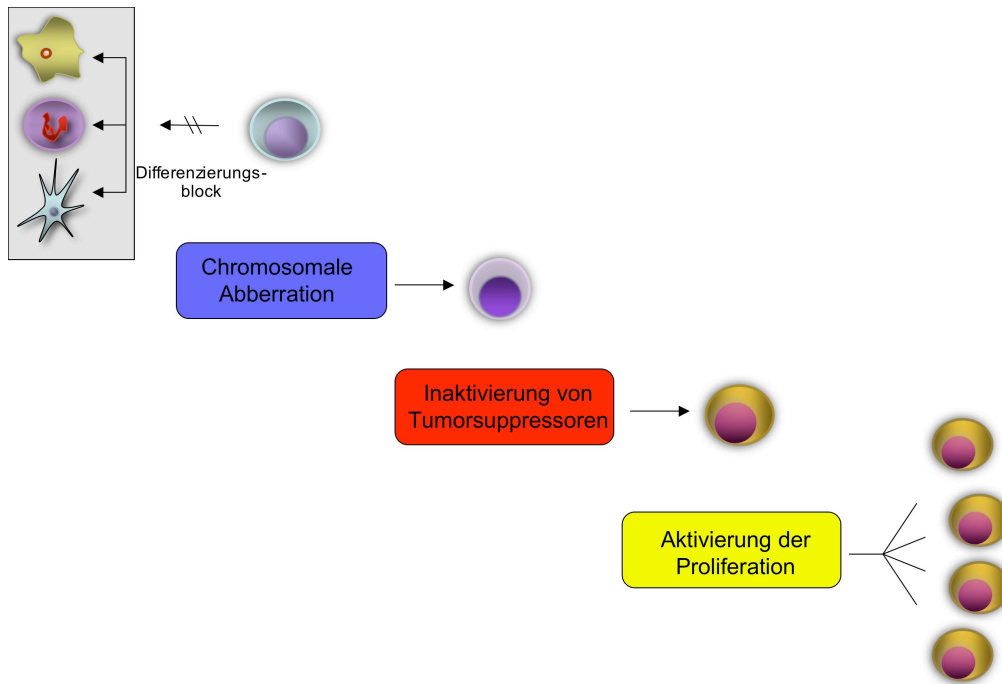


Abbildung 2 Das Modell der schrittweisen Transformation der hämatopoetischen Vorläuferzelle bei der akuten Leukämie. Durch chromosomale Aberration entsteht ein onkogenes Fusionsgen, in dem ein Transkriptionsfaktor involviert ist (bzw. Alterationen in einzelnen Transkriptionsfaktoren), wodurch ein Differenzierungsblock in Vorläuferzellen induziert wird. Durch Inaktivierung von Tumorsuppressoren fehlen Kontrollmechanismen, wodurch Mutationen in der Zelle toleriert werden. Selektion von aktivierenden Mutationen in Proliferation-fördernden Genen führt zur klonalen Expansion der aberranten hämatopoetischen Zelle.

Im Gegensatz zu akuten Leukämien ist die Expression von *bcr-abl*, das Merkmal der chronischen myeloischen Leukämie (CML), in der Maus für das Induzieren einer Leukämie ausreichend. Bei chronischen Leukämien behalten aberrante Zellen in der Anfangsphase der Leukämie ihre Differenzierungskapazität bei und entwickeln in der Endphase (Blastenkrise) eine akute Leukämie.

1.2 Regulation der Hämatopoese

1.2.1 Regulation der Hämatopoese durch Hämatopoetin Rezeptoren und Rezeptor-Tyrosinkinasen

In Differenzierungs- und Proliferationsprozessen der Hämatopoese sind Zytokinrezeptoren beteiligt. Zytokinrezeptoren sind Zellmembran-Glykoproteine, die spezifisch Zytokine binden und dabei intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren. Die Superfamilie der Zytokinrezeptoren unterteilt sich in 3 Klassen. Die in dieser Studie untersuchten Hämatopoetin Rezeptoren

gehören der Klasse I an [z.B. Granulozyten-Kolonie-stimulierender-Faktor (G-CSF), Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor- (GM-CSF), Interleukin-3 (IL-3), IL-5, Thrombopoietin (Tpo), Erythropoetin (Epo) Rezeptoren (R) sowie Wachstumshormon (GH) Rezeptor etc.]. Rezeptor Tyrosinkinasen regulieren weitere spezifische Prozesse in der Hämatopoese [z.B. Kit- und FLT-3 Rezeptoren und *platelet derived growth factor receptor* (PDGFR)]³.

1.2.1.1 Zytokinrezeptor-Formation

Zytokinrezeptoren bilden mit spezifischen Liganden (Zytokine) eine funktionelle Einheit, die Signale in die Zelle weiterleiten. Zytokinrezeptoren mit einer einzigen Untereinheit erfüllen beide Aufgaben des Bindens des Liganden sowie die Signalweiterleitung. Beispiele für solche Rezeptoren sind GH, EPO, G-CSF und TPO. Rezeptoren mit zwei oder mehr Untereinheiten bilden Rezeptorkomplexe. Rezeptoren mit zwei Untereinheiten wie die GM-CSFR, IL-3R und IL-5R besitzen eine Liganden-spezifische α -Untereinheit und eine gemeinsame β -Untereinheit (β_c , β_c) für die Signalweiterleitung⁴. Desweiteren gibt es Rezeptoren, die Mehrketten-Rezeptorkomplexe mit einer gemeinsamen gp130-Untereinheit (z.B. IL-6R) oder mit einer gemeinsamen γ -Kette (z.B. IL-2R) bilden.

Die meisten Zytokinrezeptoren weisen keine enzymatisch-aktiven Aminosäurereste im cytoplasmatischen Teil auf, die mit intrazellulärer Signalweiterleitung gekoppelt sind. Ausnahmen sind Rezeptor Tyrosinkinasen wie Kit- und FLT-3, die Tyrosinkinasen im cytoplasmatischem Teil kodieren.

1.2.1.2 Aufbau der GM-CSF, IL-3 und IL-5 Rezeptorkomplexe

Bei der Maus gibt es eine weitere β -Untereinheit (β_{IL3}), die nur in Verbindung mit der Maus-IL-3 α -Rezeptoruntereinheit (α_{IL3}) aktiv ist⁵. Die spezifischen α -Untereinheiten haben im Gegensatz zu β_c eine schwache Affinität zu GM-CSF bzw. IL-3. Die Affinität ist am höchsten bei der Bildung des Rezeptorkomplexes mit dem Liganden. Einige Studien zeigen, dass durch die Bindung des spezifischen Liganden an den Rezeptorkomplex das postulierte präformierte aber inaktive Heterodimer bzw. Hetero-Oligomer ($\alpha\beta$, $\alpha_2\beta_2$) einer Konformationsänderung unterworfen wird⁶. Die hier untersuchte 32D Zelllinie exprimiert endogen die murinen GM-CSF und IL-3 Rezeptoren (siehe Übersichtsartikel⁷).

1.2.1.3 Funktion des Kit-Rezeptors in hämatopoetischen Zellen

Kit gehört zur Subklasse III der Rezeptor-Tyrosinkinasen an. Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen exprimieren den Oberflächenmarker CD34. Die meisten dieser Zellen exprimieren auch Kit, was darauf hindeutet, dass Kit eine wichtige Rolle in primitiven hämatopoetischen Zellen einnimmt. Zur Anreicherung von HSZs werden *Lineage negative* (Lin-) Sca-1 und c-Kit positive Zellen oder CD34+ Zellen isoliert. *Ex-Vivo* konnten murine und humane HSZs nur bedingt in einem kurzen Zeitrahmen durch SCF in Kombination mit synergistisch wirkenden Zytokinen wie IL-3, Flt-3, Tpo oder IL-11 expandiert werden⁸⁻¹¹. Im Laufe des Differenzierungsprozesses verlieren Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen den Kit Rezeptor, wobei Mastzellen diesen behalten.

White spot locus (W) Mutanten, die sich später als natürlich-vorkommende Allele-c-Kit Mutationen feststellten haben Pigmentierungs- und Fertilitätsstörungen. Mäuse mit homozygoten Kit-Mutationen, die die Kinasedomäne betreffen, sterben pränatal^{12,13}. Im Gegensatz dazu überleben heterozygote Kit-Mutanten mit Pigmentierungs- und Fertilitätsstörungen. Den gleichen Phänotyp zeigen sogenannte *Steel-(Sl)-locus* Mutanten. Diese sind natürliche *loss-of-function* Mutanten für das Stammzellfaktor (SCF) Gen, das den Kit-Liganden kodiert. Heterozygote *Sl*-Mäuse sind geprägt von einer milden Anämie und Defekten in Fellfarbe, komplett-deletierte SCF-Mutanten sterben pränatal¹⁴. Die hier untersuchte 32D-Zelllinie hat keine endogene Kit-Rezeptor-Expression.

1.2.1.4 Funktion des Mpl-Rezeptors

Thrombopoetin (TPO, mpl-Ligand) ist der primäre Wachstumsfaktor für Megakaryozyten (MK). Dosis-abhängig induziert es durch Binden an den mpl-Rezeptor die Proliferation und Reifung von Megakaryozyten (MK)-Vorläufer¹⁵. Das c-mpl wurde durch das murine myeloproliferative Leukämievirus und dessen Onkogen v-mpl entdeckt¹⁶⁻¹⁸. Der Mpl-Rezeptor wird auf Hämangioblasten, Megakaryozyten und Plättchen exprimiert. TPO wirkt synergistisch bei der *ex-vivo* Expansion von HSZs^{19,20}.

TPO und c-Mpl *knock out* Mäuse haben eine starke Thrombozytopenie in der nur 10-20% der funktionellen Plättchen erhalten bleiben²¹. Hämatopoetische Stamm und Vorläuferzellen dieser Mäuse haben eine reduzierte Fähigkeit die Hämatopoese in Mäusen mit Knochenmarksdefekten wiederherzustellen, daraus kann gefolgert werden, dass der TPO-Signalweg für die Megakaryozytopoese wichtig aber nicht zwingend notwendig ist^{22,23} (siehe auch Übersichtsartikel²⁴). Die hier untersuchte 32D Zelllinie besitzt keine endogene Mpl-Rezeptor-Expression.

1.2.1.5 Überlappende Signalwege der GM-CSF- und Mpl-Rezeptoren

Nach Ligand-vermittelter Rezeptorkomplex-Formation (GM-CSFR) bzw. Dimerisierung (Mpl-Rezeptor) ruft die Konformationsänderung die gegenseitige Trans-Phosphorylierung von Rezeptor-ständigen Januskinasen (JAKs) hervor, die daraufhin viele Substrate einschließlich Tyrosinreste im cytoplasmatischen Teil der Rezeptoren phosphorylieren. Diese phosphorylierten Tyrosinreste dienen als Bindungsstellen für Src-Homologie-2 (SH-2) beinhaltende Proteine, an die cytoplasmatische STATs (*signal transducers and activators of transcription*) binden. STATs werden dabei durch JAKs phosphoryliert, wobei sie Dimere bilden und in den Nukleus transferiert werden, um Gen-Transkription zu regulieren. Desweiteren trägt die Rezeptor-vermittelte Aktivierung der MAP-Kinasekaskade zur Proliferation bei (siehe Übersichtsartikel^{7,25}).

1.2.1.6 Aktivierung des Kit-Rezeptors

Die Dimerisierung zweier monomerer Kit-Rezeptoren erfolgt durch die Bindung eines SCF-Homodimers²⁶. Der Dimerisierung folgt die Autophosphorylierung der Rezeptoren, wobei Tyrosinreste ausserhalb der Kinasedomäne phosphoryliert werden. Diese dienen als Andockstellen für intrazelluläre Proteine mit SH2-Domänen oder Phosphotyrosin-Bindungsstellen. Der Rezeptor wird nach Aktivierung internalisiert²⁷. Kit Dimerisierung führt zur Signaltransduktion durch PI3K, Src-Familie Proteinen (SFK), JAKs und STATs sowie zur Aktivierung der MAP-Kinasekaskade²⁸.

1.2.1.7 Zellulärer Kontext der Kit-Signalwege

Kit wurde in verschiedenen Zelltypen detektiert. Die Signalwege wurden in primären Zellen (HSZs, Mastzellen, Vorläufer aus Fetaler Leber) sowie Zelllinien (M07e, FDCP1, TF1, BaF3) analysiert. Kit-Signalkaskade führt Zellkontext-abhängig zur Proliferation, Differenzierung, Migration oder Adhäsion. Die Interaktions-Partner dieser Signalkaskade können vom Zelltyp zu Zelltyp variieren. Dies erhöht den pleiotropen Effekt der Kit-Signalkaskade. Daher sind auch die beobachteten Signalwege nicht auf alle Zelltypen übertragbar.

1.2.1.8 Onkogene Mutationen in Zytokinrezeptoren

1.2.1.9 Die β -GMR-I374N Rezeptormutante

Die humane β -GMR-I374N Rezeptormutante besitzt eine Punktmutation in der extrazellulären Domäne, wobei die Aminosäure 374 von Isoleucin (I) zu Asparagin (N) umgewandelt wurde. Die Expression dieser Mutante in faktorabhängigen Zellen mit

endogener α -GMR Expression führt zu faktorunabhängigen Wachstum²⁹. Andere Studien haben gezeigt, dass die β -GMR-I374N Rezeptormutante nur mit der murinen GMR α (mGMR α) Untereinheit konstitutiv aktiviert wird¹². In der vorliegenden Arbeit wurde die β -GMR-I374N-Rezeptormutante in der 32D-Zelllinie untersucht, die endogen auch die mGMR α Untereinheit exprimiert.

1.2.1.10 Die konstitutiv aktive juxtamembran Domänen (JMD) Mutante c-KitV558D

Der Kit-Rezeptor ist von großem Interesse in der Tumorbilogie, da konstitutiv aktive *gain-of-function* Kit-Mutationen sowohl in soliden Tumoren als auch Leukämien gefunden worden sind. *Gain-of-function* Mutanten wurden in humanen³⁰ und Nager Mastzelllinien³¹, in Proben von Mastozytose-Patienten³²⁻³⁴, AML-Patienten³⁵⁻³⁷ sowie in Gastrointestinal-Stroma-Tumoren (GIST) gefunden³⁸. Diese Mutationen wurden überwiegend in der JMD oder Kinasedomäne gefunden. Die Substitution A816V (oder A816Y) oder D814V in der Maus verleiht Zytokin-abhängigen hämatopoetischen Zelllinien Faktor-unabhängiges Wachstum sowie Tumorigenität und bewirkt die Differenzierung primärer HSZs zu Mastzellen^{39,40}. In der vorliegenden Arbeit wurde die Maus JMD Mutante V558D⁴¹ in Faktor-abhängigen 32D-Zellen untersucht. Die V558D ist eine Deletionsmutante der Aminosäure-Position 558, die die in GIST gefundene humane V559A Substitution-Mutante repräsentieren soll⁴².

1.2.1.11 Die konstitutiv aktive mplS368C Rezeptormutante

Das c-Mpl bildet durch Ligandenbindung ein signalfähiges Homodimer, wie sie bei Epo und GH-Rezeptoren gefunden wird. Eine Mutation in der extrazellulären Domäne des Epo-Rezeptors führt zur Homodimerisierung durch Disulfidbindung, wobei der Rezeptor konstitutiv aktiv bleibt. Das signalfähige GH-Rezeptor-Homodimer wird zusätzlich zu dem Liganden auch durch Aminosäure-Interaktion zwischen den GH-Rezeptoren in der *dimer interface homology region* (DIHR) stabilisiert. Studien zeigten, dass die Epo-Mutation in derselben Region liegt⁴³. Alexander et al. substituierten in dieser konservierten Region (DIHR) des c-Mpl die Position 368 zu einem Cystein⁴³. Retroviraler Transfer von mplS368C in faktorabhängige FDC-P1 oder Ba/F3 verlieh diesen Zellen autonomes Wachstum. Desweiteren bildeten Mäuse transplantiert mit mplS368C transformierten FDC-P1 oder Ba/F3 Zellen Tumoren⁴⁴. Diese Mpl-Mutante wurde auch in der vorliegenden Arbeit verwendet.

1.2.2 Regulation der Hämatopoese durch Transkriptionsfaktoren

1.2.2.1 PU.1 ein hämatopoetischer Transkriptionsfaktor

Der zur ets-Familie angehörende Transkriptionsfaktor PU.1 wird im Proto-Onkogen Lokus Sfp1-1 kodiert. PU.1 wird ausschließlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert, wie in B-Zellen, Makrophagen, Mastzellen, Neutrophile und frühe Erythroblasten⁴⁵⁻⁴⁷. Homozygote PU.1-Inaktivierung in der Maus führt zu embryonaler Letalität⁴⁸. McKercher et al. erzeugten durch Antibiotikazugabe PU.1-Null-Mäuse, die nach 2 Wochen nach Geburt an Sepsis starben⁴⁹. Diesen Mäusen fehlten Makrophagen und die Granulozyten waren nur in sehr geringen Mengen zu detektieren. Die B-Zellentwicklung war in diesen Mäusen auch gestört⁴⁹. Fetale Leber Zellen abgeleitet von PU.1^{-/-} Mäusen waren in HSZ-Anzahl 10-fach reduziert. CMPs und GMPs (Granulozyten/Monozyten Vorläufer) waren nicht detektierbar, wobei MEPs erhöht waren⁵⁰. Die B-Zell-Reifung war intakt, wobei die T-Zellentwicklung gestört war. CMPs bzw. GMPs, die aus PU.1^{f/f} (^{f/f} floxed auf beiden Allelen, erst nach Cre-Rekombinase Aktivität wird das PU.1-Gen ausgeschnitten) Mäusen isoliert wurden, wurden durch retroviral-vermittelte Cre-Rekombinase Expression zu PU.1^{-/-} CMPs bzw. GMPs umgewandelt. Diese bildeten nach Zytokinstimulation MegE und Myeloblasten bzw. nur Myeloblasten Kolonien. Das gleiche Verfahren, angewendet auf isolierte CLPs von PU.1^{f/f} Mäusen führte zu PU.1^{-/-} CMPs, die weiterhin auf IL-7 Stimulation zu B-Zellen differenzierten⁵⁰. PU.1 Null hämatopoetische Zellen bilden keine Kolonien mit M-CSF, G-CSF und GM-CSF⁵¹. Von PU.1^{-/-} Mäusen abgeleitete hämatopoetische Zelllinien hatten eine stark minimierte Rezeptorexpression für G-CSF und GM-CSF, wobei M-CSFR nicht exprimiert wurde⁵². Der in myeloischen Zellen exprimierte GM-CSF α Rezeptor beinhaltet im Promotor ein Bindungsmotiv für PU.1⁵³.

1.2.2.2 Dysregulierung des proto-onkogenen Transkriptionsfaktors PU.1 kann transformieren

In Menschen konnten PU.1 *loss-of-function* Mutationen in der akuten myeloischen Leukämie (AML) gefunden werden⁵⁴. Rosenbauer et al. zeigten, dass eine Reduktion der PU.1-Konzentrationen auf 20% in der Maus zu Leukämien führt⁵⁵. Cook et al. fanden an gamma-Strahlen ausgesetzten Mäusen myeloische Leukämien, die PU.1 Mutationen oder Deletionen aufwiesen⁵⁶. Weiterhin entwickelten sich in PML-RAR α Transgenen mit PU.1^{+/-}-*knock out* gekreuzten Mausstämmen, nach einer langen Latenzzeit eine akute promyelozytische Leukämie⁵⁷. Diese Studien zeigen, dass eine physiologische PU.1 Expression für die normale Funktion der Hämatopoese notwendig ist.

1.2.2.3 LEF-1

Lymphoid enhancer-binding protein (LEF-1) gehört der *high-mobility group* (HMG) Protein Familie an, das 5'CCTTTGAACT Nukleotidsequenzen erkennt⁵⁸. LEF-1 wird in lymphoiden Zellen exprimiert und ist an vielen Stellen während der Organogenese der sich entwickelnden Maus entdeckt worden^{58,59}. LEF-1 hat zwar alleine keine transkriptionale Aktivität aber zusammen mit weiteren DNA-Bindeproteinen stimuliert es den T-Zell-Rezeptor α (TCR α) Enhancer⁵⁸. LEF-1 erzeugt eine scharfe Biegung der DNA^{60,61} und beinhaltet eine Kontext-abhängige Aktivierungsdomäne, die nur im spezifischen Kontext zu anderen Transkriptionfaktoren funktioniert⁶⁰. Interaktionen von LEF-1⁶²⁻⁶⁴ mit β -catenin, ALY⁶⁵ und Pendulin wurden berichtet⁶⁶. LEF-1^{-/-} Mäuse weisen Defekte in der Pro-B-Zell-Differenzierung und -Überleben auf⁶⁷. LEF-1 ist ein wichtiger Faktor für die T-Zell-Entwicklung^{68,69}. Eine Verknüpfung von LEF-1 zu Leukämien wurde festgestellt als ELA2-Mutationen mit verstärkten LEF-1-Bindungsmotiven in SCN (*severe congenital neutropenia*) und FPD/AML (*familial platelet disorder with Aml*) gefunden wurden⁷⁰. In zwei SCN Patienten waren die LEF-1-Expressionen reduziert. LEF-1-Überexpression in diesen Zellen stellte das Differenzierungspotenzial der Granulozyten wieder her⁷¹.

1.2.2.4 Bmi-1 in Stammzellerneuerung und Leukämien

Das *Polycomb group* Gen (PcG) *bmi-1* (*B-cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1*) ist im Erhalt des HSZ-Pools involviert^{72,73}. *Bmi-1*^{-/-} *knock out* Mäusen fehlen spezifische hämatopoetische Zelllinien⁷⁴. In *Bmi-1*^{-/-} HSZs sind die Tumorsuppressoren p16^{Ink4a} und p19^{Arf} sowie das p53-induzierte Gen Wig1 (Wig1 reguliert den Apoptose Inhibitor AI-6 herunter) hochreguliert, wodurch vermutlich die Apoptose und Seneszenz gefördert wird^{72,75}. Lessard und Sauvageau beobachteten, dass nach Einführen der AML-induzierenden Gene *Hoxa9* und *Meis1a* in *Bmi-1*^{-/-} HSZs, die normale HSZ-Kinetik wieder hergestellt wird⁷³. *Bmi-1* ist daher wahrscheinlich wichtig für die Akkumulation von leukämischen Zellen.

1.3 Der Tumorsuppressor p53

Wegen der enormen Menge an Publikationen über p53 (>45000 Stand Apr. 2008) werden hier nur grundlegende Mechanismen erläutert.

Das überwiegend im Nukleus lokalisierte Phosphoprotein p53 ist ein Tumorsuppressor und wird im Trp53-Genlocus kodiert. Die Hauptrolle von p53 ist die Protektion der Zelle gegen maligne Transformationen, die durch chemische Agenzien, UV oder radioaktive Strahlung verursachte DNA-Schäden sowie Onkogenaktivierung induziert werden. Die Wirkungsweise von p53 wird durch Regulation des Zellzyklus und Apoptose vermittelt. Das p53 Protein ist ein Sequenz-spezifisches DNA-Bindeprotein, dass auf verschiedene Stresssignale post-translational stabilisiert wird und dann als Transkriptionsfaktor die Expression von spezifischen Genen induziert⁷⁶ (**Abbildung 4**). Bei der Analyse von humanen nicht-hämatologischen Tumoren wurde Trp53 in ca. 50% der Fälle mutiert oder deletiert aufgefunden^{77,78}. Zwei weitere p53-ähnliche Proteine das p63 und p73 wurden mit sehr ähnlichen Funktionen gefunden⁷⁹.

1.3.1 Regulierung von p53

Das p53 wird durch MDM2 (*Mouse double minute*, oder HDM2) streng reguliert. Das MDM2 bindet an die Transaktivierungs Domäne (TAD) von p53 und blockiert das Binden von Kofaktoren. Weiterhin ubiquitiniert MDM2 mit seiner E3-Ligase Lysinreste in der cytoplasmatischen Domäne (CPD) von p53, dadurch wird p53 der Ubiquitin-abhängigen Degradation unterworfen^{80,81} (**Abbildung 3**).

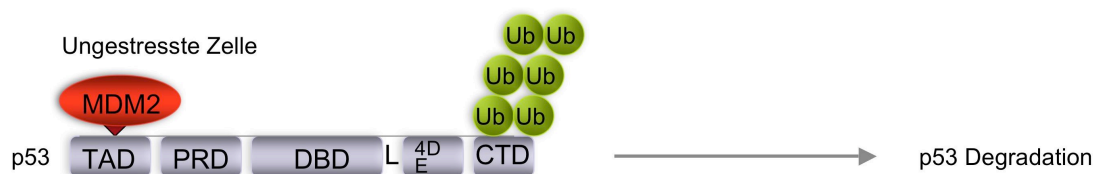


Abbildung 3 Regulierung von p53 in normalen, ungestressten Zellen (Verändert nach Toledo F. and Wahl GM⁸²).

Neben MDM2 kontrollieren auch MDM4 und Arf die Stabilität von p53. Arf wirkt dabei als Tumorsuppressor und inhibiert das MDM2, was zur p53-Stabilität führt⁸³ (**Abbildung 4**). Arf-Expression wird durch myc und E1A induziert, die wiederum von mitogenen Signalen aktiviert werden⁸⁴.

1.3.2 p53-vermittelte Apoptose

Stabilisiertes p53 akkumuliert im Nukleus und Cytoplasma und reguliert auf diese Weise sowohl die Expression von pro-apoptotischen Proteinen (z.B. Bax, Noxa, PUMA etc.) als auch die Aktivität anti-apoptotischer Proteine durch Bindung an p53 (z.B. BCL-2 und BCL-xL) (**Abbildung 4**). Beide Wege führen zur Mitochondrien Aussen-Membran Permeabilisierung (MOMP). Nach MOMP wird Cytochrom c aus mitochondrialem Interstitium freigesetzt. Cytochrom c bewirkt dann APAF1 (*apoptotic protease activating factor 1*) Oligomerisierung, welches die Caspase-Kaskade aktiviert und schließlich zur Chromatin Kondensation, Plasmamembran Asymetrie sowie Aufblähung der Zelle und letztendes zum Zelltod führt⁸⁵.

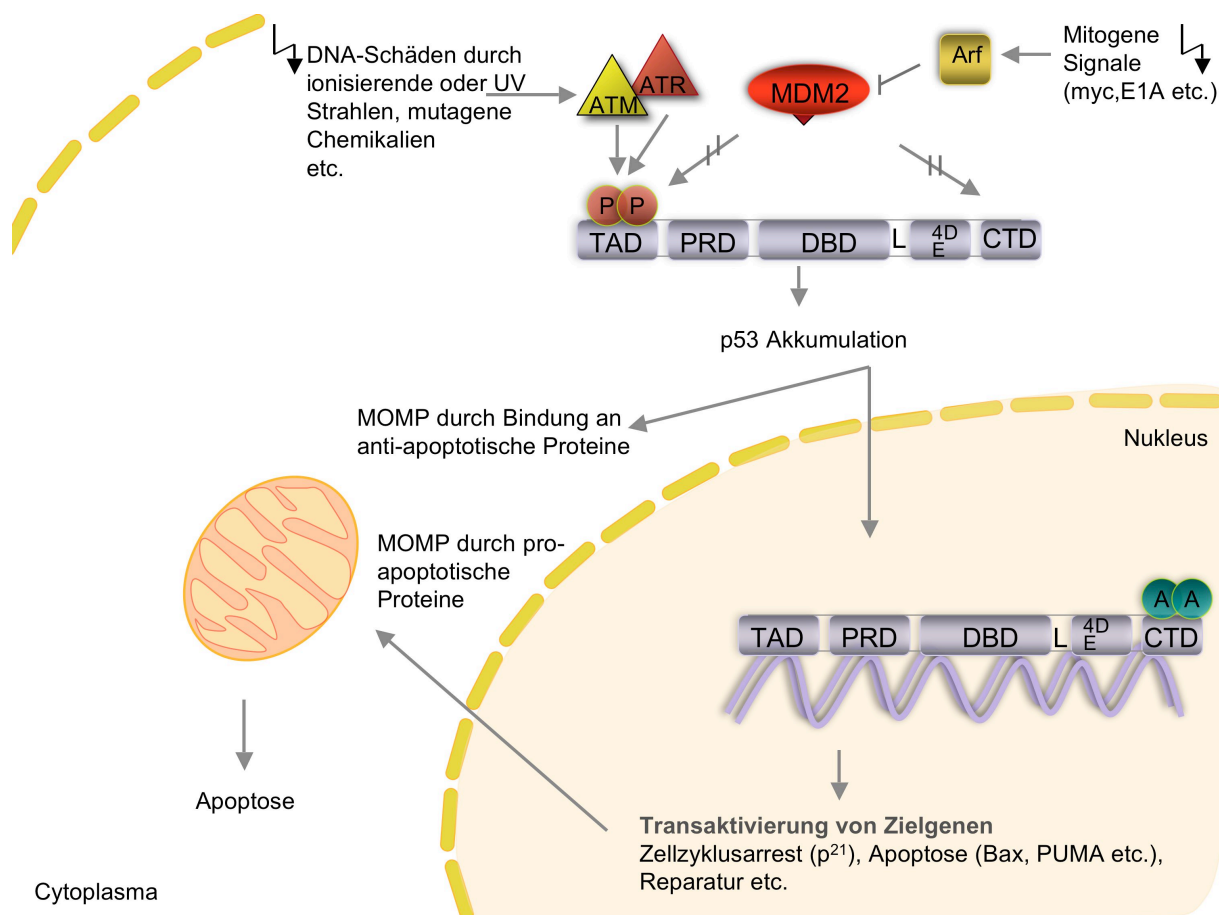


Abbildung 4 Vereinfachtes Schema der Wirkungsweise von p53 nach Stabilisierung und Akkumulation bei zellulärem Stress. ATM= Ataxia-telangiectasia mutated, ATR= Ataxia-telangiectasia related, A= Azetylierung, MOMP= Mitochondrien Aussen-Membran Permeabilisierung, P= Phosphorylierung, TAD= Transaktivierungs Domäne, PRD= Prolinreiche Domäne, DBD= DNA-Bindedomäne, L= Nukleus Lokalisierungs Signal, 4D= Tetramerisierungsdomäne, E= Nukleus Export Signal, CTD= C-terminale regulierende Domäne. Verändert nach Toledo F. und Wahl GM⁸², Sherr CJ⁸³, Chipuk et al.⁸⁵

1.3.3 p53-vermittelter Zellzyklusarrest

Durch DNA-Schäden werden die Proteine ATM (*Ataxia-telangiectasia mutated*) oder ATR (*Ataxia-telangiectasia related*) aktiviert, das p53 spezifisch phosphoryliert und so die Ubiquitierung durch MDM2 verhindert⁸⁶ (**Abbildung 3 und 4**). p53 wird stabilisiert und stimuliert die Expression des G1 CDK (*cyclin dependend kinase*) Zellzyklusinhibitors p21^{Cip1/Waf1} (p21)⁸⁷⁻⁸⁹. p21 induziert Zellzyklusarrest und Inhibierung von CDKs mit unter durch die Inhibierung der DNA-Replikationsmaschinerie durch Binden und Blockieren von PCNA (*proliferating cell nuclear antigene*)^{90,91}. Bei reparablen DNA-Schäden, z.B. durch schwache UV-Strahlung wird p21 Ubiquitin-abhängig degradiert, wodurch die PCNA aktiv bleibt und die DNA-Reparatur gefördert wird⁹².

1.3.4 Rolle von p53-Mutationen in Krebszellen

Studien an Krebszelllinien offenbarten das regelmäßige Vorkommen von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) bei Erhalt der DNA-Reparaturfunktion. In prä-karzinogenen Krebszellen von Patienten ohne p53-Mutationen und in Krebszellen kommen gleichermaßen DSBs vor, wobei in Krebszellen mit p53-Mutationen DNA-Reparaturfunktionen fehlten. Daher konnte im Gegensatz in den Krebszellen in prä-karzinogenen Krebszellen Apoptose und Seneszenz nachgewiesen werden. In Krebszellen wurden mehrere Onkogene zusätzlich zu p53-Mutationen nachgewiesen, wie die mutierten DNA-Checkpoint-Gene *arf*, *Rb*, *atm* usw. p53-Null Mäuse haben eine höhere Prävalenz für spontane Tumoren als normale Kontroll-Mäuse (Gesamter Absatz vom Übersichtsartikel⁹³).

1.3.5 p53-Alterationen in Leukämien

Hernandez-Boussard et al. besichtigten das Vorkommen von p53-Mutationen auf 14% in einer Kohorte von 672 hämatologischen Krebspatienten⁹⁴. Mit 30% treten die p53-Alterationen in der Therapie-begleiteten AML und MDS auf⁹⁵. Bei ca. 20% der Fälle wurden p53-Deletionen/Mutationen in CML-Studien berichtet, wobei die meisten bei Eintritt in die Blastenkrisis detektiert worden sind⁹⁶. Lethal bestrahlte Mäuse, die mit BCR/ABL-exprimierenden p53^{-/-} HSZs transplantiert wurden, entwickelten eine AML, wobei Mäuse, die BCR/ABL-exprimierende p53^{+/+} HSZs erhielten, eine CML-ähnliches myeloproliferatives Syndrom entwickelten⁹⁶. Transgene BCR/ABL sowie p53^{+/-} Mäuse entwickelten ebenfalls eine AML⁹⁷.

1.4 Modelle der Genanalyse

1.4.1 RNA-Interferenz

Das Einführen von doppelsträngiger RNA (dsRNA) in eukaryotische Zellen, die homolog zu einem Gen ist, führt zur Degradation der korrespondierenden mRNA. Der zur Grunde liegende konservierte Mechanismus wird in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)⁹⁸, in *Drosophila melanogaster*⁹⁹, in der Maus^{100,101} und in vielen anderen Organismen RNA-Interferenz (RNAi) genannt. Der verwandte Mechanismus wird in der Pflanze als *posttranscriptional gene silencing* (PTGS)¹⁰²⁻¹⁰⁵ und in Pilzen (*Neurospora crassa*) als *Quelling* bezeichnet^{106,107}. Eine Hypothese besagt, dass sich die RNAi im Laufe der Evolution gegen Viren und mobile genetische Elemente (Transposons) entwickelte¹⁰⁸.

1.4.2 Mechanismus der RNAi

Doppelsträngige RNA wird zuerst in 21-23 Nukleotide lange *small interfering RNAs* (siRNA) prozessiert¹⁰⁹⁻¹¹¹. In Säugetieren und *Drosophila* geschieht dieser Prozess im Cytoplasma der Zelle durch das RNase-III-Enzym Dicer¹¹². Dicer wurde erstmals in *Drosophila* entdeckt, daraufhin wurden Dicer-Homologe in *C. elegans*, *Arabidopsis*, Säugetieren sowie *Schizosaccharomyces pombe* nachgewiesen. Humanes Dicer liegt in einem Komplex mit den dsRNA-bindenden Proteinen TRBP (*the human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein*), und PACT (*protein activator of the interferon-induced protein kinase*) sowie Ago2, einer katalytischen Untereinheit (Endonuklease) des *RNA induced silencing complex* (RISC) vor¹¹³⁻¹¹⁶. Beim Menschen wird der siRNA-Duplex im Dicer-TRBP-PACT-Ago2-Komplex durch Ago2 gebunden, wobei der sense Strang (*passenger strand*) geschnitten wird^{109,117,118}.

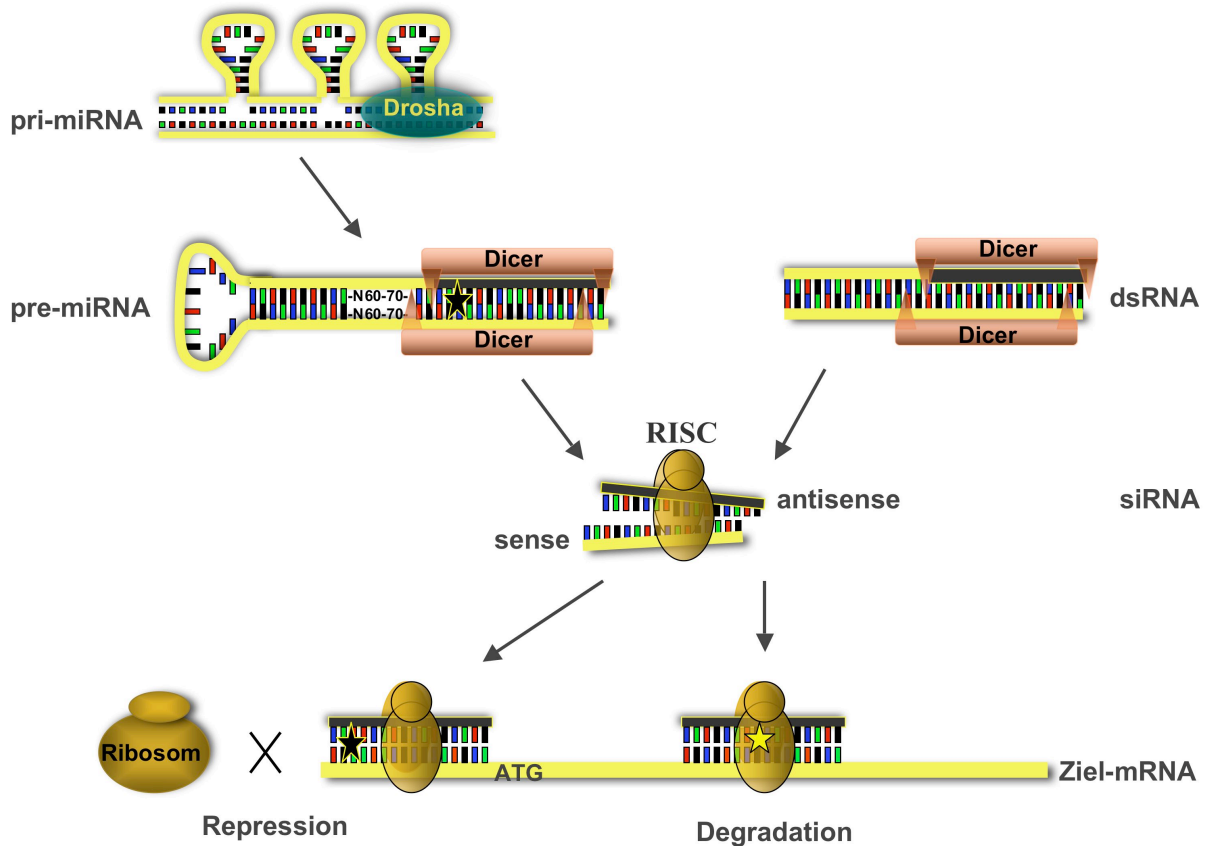


Abbildung 5 Der Mechanismus der RNA-Interferenz. Schwarzer Stern gleich nicht-komplementärer Bereich. Gelber Stern gleich Schnitt in der mRNA. Verändert nach Tuschl et al.¹¹⁹.

RISC bindet mittels antisense Strang (*guide strand*) an die komplementäre Position auf der Ziel-mRNA und schneidet sie zwischen Nucleotidposition +10 und +11 des antisense Stranges (5'-Position als +1), wobei die mRNA wegen Instabilität durch RNasen degradiert wird^{120,121} (**Abbildung 5**, rechte Hälfte).

1.4.3 MicroRNAs

Das *lin-4* Gen kodiert kurze RNAs, die die 3'UTR der *lin-14* mRNA binden. Dadurch wird die Lin-14-Proteinexpression posttranskriptionell blockiert. Das Lin-14 steuert zeitlich-abgestimmt entwicklungs-spezifische Prozesse in *C. elegans*¹²². Ein weiteres kurzes RNA Produkt, das das *let-7* Gen kodiert, bindet an andere Wurmentwicklung-spezifische mRNAs, die daraufhin posttranskriptionell blockiert werden¹²³. Diese und weitere kürzlich entdeckte kurzen RNAs, die sich in Aufbau und Wirkungsweise ähneln, wurden *microRNAs* (miRNAs) genannt¹²⁴⁻¹²⁶. Die miRNA Gene werden zu langen primären miRNAs (pri-miRNA) transkribiert und im Nucleolus durch die RNaseIII Drosha zu 60-70bp langen *prekursoren* miRNAs (pre-miRNA) prozessiert^{127,128}. Anschließend werden die pre-miRNAs in das

Cytoplasma transportiert^{129,130}, wo sie durch Dicer weiter in 21 Nukleotide-lange miRNAs prozessiert werden¹³¹. Die RISC-Zusammensetzung läuft in humanen Zellen wie bei siRNAs ab. Die meisten miRNAs bewirken nach Hybridisierung an die Ziel-mRNA die Repression der Translation oder fördern den Abbau der mRNA¹³²⁻¹³⁴ (**Abbildung 5**, linke Hälfte).

1.4.4 miRNA-ähnliche shRNAs

DsRNAs können zur sequenz-spezifischen Degradation einer komplementären mRNA genutzt werden, um Genfunktionen zu analysieren. Ein Nebeneffekt der Applikation langer dsRNAs in eukaryotische Zellen ist die Rekrutierung der dsRNA-aktivierten Proteinkinase R (PKR). Die PKR phosphoryliert nach Aktivierung den Initiationsfaktor der Transkription eIF-2a, der wiederum unspezifisch die gesamte Transkription der Zelle blockiert. Weiterhin aktivieren lange dsRNAs die 2'5'-Oligoadenylat-Polymerase (-Synthetase), die die Reaktion von ATP zu 2'5'-Oligoadenylat katalysiert und somit die RNase L aktiviert. Die RNase L ruft den unspezifischen Abbau der RNA-Moleküle der Zelle hervor.

Zur Vermeidung der Nebeneffekte der langen dsRNAs werden Zellen zur Genanalyse synthetisch hergestellte siRNAs appliziert. Da synthetische siRNAs nur transiente Effekte in der Zelle erzielen, wurden Plasmid-kodierte siRNAs oder *short hairpin* RNAs (shRNA) hergestellt. Dabei können si/-shRNA kodierende retro/lentivirale Vektoren zum stabilen Gentransfer in eukaryotische Zellen genutzt werden. Die Struktur, der in dieser Studie benutzten shRNAs ähneln den prekursoren miRNAs, wobei der doppelsträngige Stamm einen komplementären antisense Strang zur Ziel-mRNA beinhaltet. In der Zelle transkribiert, faltet sich diese RNA und bildet die für die pre-miRNA-typische Haarnadelschleife. Am Übergang des Stammes zur Haarnadelschleife wird die shRNA von Dicer gebunden und zu den typischen 21 nt großen siRNAs prozessiert¹³⁵. Zur Untersuchung von Genfunktionen wurden diese Erkenntnisse ausgenutzt, um spezielle RNA-Polymerase-III gesteuerte shRNA-Transkriptions-Plasmide zu generieren.^{136,137}

1.4.5 Gentransfer durch retrovirale Vektoren

Retrovirale Vektoren sind gentechnisch veränderte, meist bakterielle Plasmide mit retroviralen Sequenzen, die zum Gentransfer in Zielzellen, wie hämatopoetische und embryonale Stammzellen, Neuronen und vielen anderen Zelltypen schon erfolgreich eingesetzt worden sind. Retrovirale Vektoren werden in γ -retrovirale Vektoren (**Abbildung 6A**) und Lentivirale Vektoren unterteilt (**Abbildung 6B**). Lentivirale Vektoren beinhalten *long terminal repeats* (LTR) vom HIV, die sich auch in ruhende Zellen integrieren können, γ -

retrovirale Vektoren besitzen meistens LTRs von dem murinen Leukämie Virus. Der in dieser Studie verwendeter γ -retrovirale Vektor ist ein Hybrid-Vektor bestehend aus LTRs und anderen viralen Sequenzen von dem murinem embryonalen Stammzellvirus (MESV) und dem *Spleen Focus Forming Virus* (SFFV)¹³⁸.

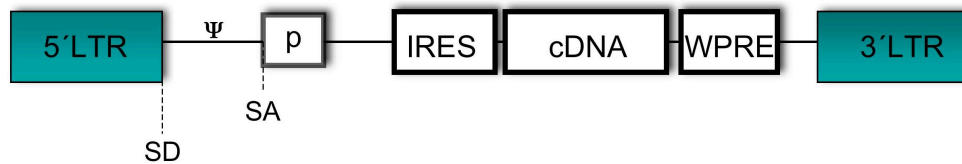


Abbildung 6A Aufbau eines γ -retroviralen Vektors (Verändert nach Hildinger et al.¹³⁸).

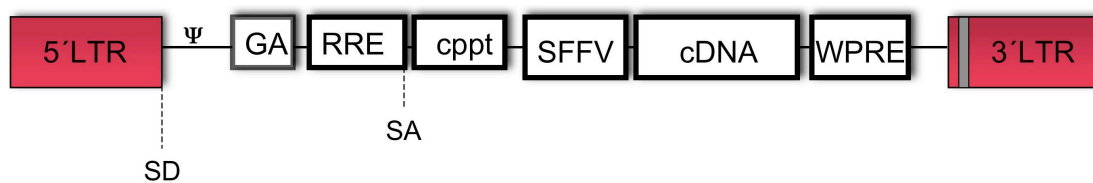


Abbildung 6B Aufbau eines lentiviralen Vektors (Verändert nach Scherr et al.¹³⁹).

Für die Sicherheit dieser Methode wurden cis-aktive-Sequenzen, die für den Gentransfer in die Zielzelle benötigt werden und trans-aktive-Sequenzen, die virale Strukturelemente kodieren, auf zwei Plasmide aufgeteilt. Daraus ergeben sich das Transgen-Plasmid und das Verpackungs-Plasmid. Durch transiente Transfektion der beiden Plasmide in Helferzellen können virale Zellkulturüberstände produziert werden. Die viralen Partikel beinhalten das Transgen mit den flankierenden LTRs.

Die Spezifität des Virus für bestimmte Zelltypen ist durch die Interaktion seiner Hüllproteine mit Rezeptoren der Zellmembran festgelegt. Die Modifikation der Hülle viraler Partikel durch Einbau verschiedener Glykoproteine wird auch Pseudotypisierung genannt. Dafür wird auf einem dritten Plasmid das Hüllprotein kodiert (*Envelope*). Das Vesikuläre-Stomatitis-Virus-Glykoprotein (VSV-G) wird für eine breite Palette von Zelltypen verwendet. Das VSV.G bindet an ein Phospholipid der Zellmembran und initiiert die Fusion mit der Virushülle¹⁴⁰. Virale Partikel, die durch VSV.G *pseudotypisiert* wurden, können durch Ultrazentrifugation

konzentriert werden. Dagegen kann durch ein Nager-spezifisches ecotropes Hüllprotein das Infektionsrisiko enorm reduziert werden.

Ziele

- 1) Etablierung von bifunktionalen γ -retroviralen Vektoren, um simultan eine onkogene cDNA sowie eine spezifische shRNA in hämatopoetischen Zellen zu exprimieren.
- 2) Transformation der murinen hämatopoetischen Zelllinie 32D mit onkogenen Zytokinrezeptor-Mutanten.
- 3) Etablierung eines Zellkultursystems, um kooperierende genetische Ereignisse in der Leukämogenese durch vergleichende Quantifizierung von Transformationseffizienzen zu messen.
- 4) Kooperierende Effekte bei der Transformation von 32D Zellen durch Expression von onkogenen Zytokinrezeptoren (β GMR-I374N, c-KitV558D oder mplS368C) sowie RNAi-vermitteltem Funktionsverlust von Transkriptionsfaktoren (PU.1, LEF-1, Bmi-1) und des Tumorsuppressors p53 finden.

2.1.0 Material

2.1.1 Chemikalien

Agarose LE	Biozym, Hess. Oldendorf, D
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg, D
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, München, D
Chloroquine	Sigma-Aldrich, München, D (100 mM (0,51g/10ml aq.dest.)
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt, D
Chloroform	J.T. Baker, Deventer, Holland
Essigsäure	J.T. Baker, Deventer, Holland
Ethanol	J.T. Baker, Deventer, Holland
Glycerin	Merck, Darmstadt, D
Glykogen	Roche, Mannheim, D
HEPES	Sigma-Aldrich, München, D
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
Isopropanol	J.T. Baker, Deventer, Holland
Kalimchlorid	Merck, Darmstadt, D
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
Natriumazetat	Merck, Darmstadt, D
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Phenol	Invitrogen, Karlsruhe, D
Phenol/Chloroform/	Invitrogen, Karlsruhe, D
Isoamylalkohol	(Verhältnis 25:24:1)
Trizol UltraPure 100ml	Invitrogen, Karlsruhe, D

2.1.2 Gebrauchsmaterialien

Handschuhe	Kimberlay, Omnilab AG, Mettmensstetten, D
Bacillol	Bode, Telgte, D
Pipettenspitzen	Gilson Sarstedt AG&Co, Nümbrecht, D
Eppendorf Combitip Plus 10ml	Eppendorf AG, Hamburg, D
Mikrozentrifugenröhrchen	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D
Falconröhrchen	Sigma-Aldrich, München, D
Petrischalen	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D

Zellkulturflaschen	Sigma-Aldrich, München, D
Zellkulturschalen	Nunc, Wiesbaden, D
Einmalpipetten	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D
Küvetten	Biozym, Hess. Oldendorf, D
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden, D
Sephadex-G25-Säulen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Spritzen	Fresenius Kabi, Friedberg, D
Sterilfilter Millex-HV, 0,45 µm	Millipore, Carrigtwahill, Irland
96-Loch Optische Reaktionsplatte	Applied Biosystems, Foster city, CA, USA

2.1.3 Stammlösungen für Zellkultur

<i>Dulbecco's MEM</i> mit Glutamax (DMEM)	GibcoBRL Eggenstein, D
RPMI	GibcoBRL Eggenstein, D
Fetales Kälberserum (FCS)	GibcoBRL, Eggenstein, D
Fetales Rinderserum (FBS)	Biochrom AG, Berlin, D
HBS (2x)	(<i>HEPES-buffered saline</i>) (500 ml mit 8g NaCl, 6,5 g HEPES, 5,25g Na ₂ HPO ₄ , pH 7,05)
Imatinib	Novartis, Basel, Schweiz (100µM)
<i>PBS</i> (-Ca/-Mg)	GibcoBRL, Eggenstein, D
Polybrene (Hexadimethrinbromid)	Sigma-Aldrich, München, D (2500x 100mg/10ml aq.dest.) (100x 400µl Stocklsg. /10ml)
Poly-L-Lysin (0,01 %)	Sigma-Aldrich, München, D
RPMI 1640 mit L-Glutamin	GibcoBRL, Eggenstein, D

2.1.4 Medien und Lösungen für Bakterienkulturen

Ampicillin	Sigma-Aldrich, München, D
LB-Agar	2% Lennox L Broth Base, 0,5% NaCl, 1,5% Agar, Invitrogen, Karlsruhe, D
LB Broth (<i>LENNOX L Broth Base</i>)	Invitrogen, Karlsruhe, D
S.O.C (<i>Super optimal broth with glucose</i>)	Invitrogen, Karlsruhe, D

2.1.5 Reagenzien-Satz und Fertiglösungen

Sequenzier-PCR-Lösung (<i>BigDye</i>)	Applied Biosystems, Foster city, CA, USA
Bovine alkalische Phosphatase (BAP)	1U/μl Roche, Mannheim, D
Bovines Serum-Albumin (BSA)	100x NewEngland-BioLabs, Ipswich, MA, USA
TaqMAN ABI-Mastermix	Applied Biosystems, Foster city, CA, USA
Power Sybr Green 2x Mastermix	Applied Biosystems, Foster city, CA, USA
<i>DNA Molecular Weight Marker I-VIII</i>	Roche, Mannheim, D
Desoxy-Nukleotid-Triphosphate (dNTP)	Roche, Mannheim, D
DNaseI (10U/μl)	Roche, Mannheim, D
<i>First-strand buffer (5x)</i>	Invitrogen, Karlsruhe, D
Gelextraktions-System	Qiagen, Hilden, D
Klenow-Enzym (5U/ml)	New England-BioLabs, Ipswich, MA, USA
MMLV-RT (200U)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Minipräparations System	Qiagen, Hilden, D
Maxipräparations System	Qiagen, Hilden, D
<i>QIAamp DNA Blood Minikit</i>	Qiagen, Hilden, D
<i>Random Hexamere Primer p(dN)₆</i>	
<i>Site-directed mutagenesis Kit</i>	Stratagen
T4 DNA Ligase-Puffer	New England-BioLabs, Ipswich, MA, USA
RNasin (RNase-Inhibitor 40 U/μl)	Promega, Mannheim, D
Stoppuffer (5x)	10 ml, 11g Sucrose, 0,1M EDTA, 25mg Bromphenolblau
T4-Polynukleotid-Kinase	New England-BioLabs, Ipswich, MA, USA

2.1.6 Geräte

Autoklav	Getinge, Rastatt, D
Bakterienschüttler (Thermoshake)	Gerhardt, Königswinter, D
Biofuge 13	Heraeus Sepatech, Hanau, D
Blockthermostate	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden, D
Elektrophorese-Apparaturen	MHH Forschungswerkstätte, Hannover, D
Eppendorf Centrifuge 5415D	Eppendorf AG, Hamburg, D
FACSAria	Becton Dickinson, Heidelberg, D

FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Fluoreszenzmikroskop	Nikon Eclipse TE 300, Düsseldorf, D
Geldokumentationsystem Gbox	Syngen, Cambridge, UK
Inkubator-CO ₂ Heraeus BB 6220	Heraeus, Hanau, D
Kühlzentrifuge	Beckman J2-MC
Lichtmikroskope	Axiovert 25, Carl Zeiss, Jena, D
Nanodrop ND-1000 Spectrometer	PEQLab, Erlangen, D
Netzgeräte Elektrophoresis-1(EPS 301)	GE Healthcare Europe GmbH, München, D
Neubauer Zellzählkammer	Karl Hecht, Sondheim, D
Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau, D
Multifuge 3SR + Zentrifuge	Heraeus, Hanau, D
PCR-Geräte	Biometra, Göttingen, D
Pipetten (Gilson)	Pipetman 2/10/100/1000µl, Middleton, WI, USA
pH-Meter	Basic Meter PB-20, Sartorius AG, Göttingen, D
Pipettierhilfe	Pipetman abimed, Langenfeld, D
Quantitative Realtime TaqMan PCR	ABI Prism7500 SequenceDetector, Applied Biosystems, Foster city, CA, USA
Sequenziergerät ABIPrism	Applied Biosystems, Foster city, CA, USA
Spektrometer	GeneQuant, Pharmacia Biotech
Sterilbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen, Heraeus, D
Thermomixer	Eppendorf AG, Hamburg, D
Tiefkühltruhe (-85 Ultrafreezer NU6514E)	Nuaire, Plymouth, MN, USA
Ultrazentrifuge	Optima LE-80K Ultrazentrifuge, Beckman, USA
Vortexer-genie2	Scientific Industries, Bohemia, New York, NY, USA
Wasserbad	BLB-Braunschweiger Laborbedarf, GFL, Burgwedel, D
Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, D

2.1.7 Synthetische Oligonukleotide

Primer für *site directed mutagenesis*: U3-Region der R780-3'LTR:

FP-5'CCTGTAGGTTTGGCAAGCTACGTACAGTAACGGCCATTTTGC-3'

RP-5'-GCAAAATGGCCGTTACTGTACGTAGCTTGCCAAACCTACAGG-3'

shRNA-kodierende Oligonukleotide

Fettgedruckte Schrift steht für Hybridisierungsstelle an der Ziel-mRNA:

FPshGI2-5'-GATCCCCC**GTACGCGGAATACTTCGATTCAAGAGATCGAAGTATTCCG**
CGTACGTTTTTTTGGAAAG-3'

RPshGI2-5'-TCGACTTCCAAAAA**CGTACGCGGAATACTTCGATCTCTTGAATCGAA**
GTATTCCGCGTACGGGG-3'

FPshp53-5'-GATCCCC**GTACATGTGTAATAGCTCCTTCAAGAGAGGAGCTATTACAC**
ATGTATTTTTTTGGAAAG -3'

RPshp53-5'-TCGACTTCCAAAAA**GTACATGTGTAATAGCTCCTCTCTTGAAGGAGC**
TATTACACATGTACGGG -3'

FP720shPU.1-5'-GATCCCC**GAAGCTCACCTACCAGTTCTTCAAGAGAGAACTGGTA**
GGTGAGCTTCTTTTTTGGAAAG -3'

RP720shPU.1-5'-TCGACTTCCAAAAA**GAAGCTCACCTACCAGTTCTCTCTTGAAG**
AACTGGTAGGTGAGCCTCGGG -3'

FPshLEF-1-5'-GATCCC**AGTGCAGCTATCAACCAGATTCAAGAGATCTGGTTGATAG**
CTGCATTTTTTTGGAAAG -3'

RPshLEF-1-5'-TCGACTTCCAAAAA**AGTGCAGCTATCAACCAGATCTCTTGAATC**
TGGTTGATAGCTGCACTGGG -3'

FP-Bmi-1mu614-5'-GATCCCC**TGGACATTGCCTACATTTATTCAAGAGATAAATGTAG**
GCAATGTCCATTTTTTGGAAAG-3'

RP-Bmi-1mu614-5'-TCGACTTCCAAAAA**TGGACATTGCCTACATTTATCTCTTGAA**
TAAATGTAGGCAATGTCCAGGG-3

2.1.8 Primer und Sonden für quantitative *real-time* PCR

FP-GAPDH: 5'-CAACAGGGTGGTGGACCTC-3

RP-GAPDH: 5'-GGGTGGTCCAGGGTTTCTTA-3

Sonde: muGAPDH-5'-FAM-TGGCCTACATGGCCTCCAAGGA-TAMRA-3

FP-p53: 5'-TGACGGAGGTCGTGAGACG -3'

RP-p53: 5'-TCCACCCGGATAAGATGCTG -3'

Sonde: p53-5'-CCGATGGTGGTGGCCTGGCTCCTC-Tamra-3'

FP-PU.1: 5'-GACAAGGGCACCTTCCAGT-3
RP-PU.1: 5'-AGGTCATCTTCTTGCGGTTG-3
Sonde: PU.1: 5'-FAM-AGCACAAGGAGGCGCTGGCG-TAMRA-3
FP-LEF-1: 5'-TTGGTTAACGAGTCCGAAATCA-3'
RP-LEF-1: 5'-GGGCTTGTCTGACCACCTC-3'
Sonde: LEF-1: 5'-FAM-CCCAGCCAGCAACGGGCA-TAMRA-3'
FP-Bmi-1: 5'-ATGCAGCTCACCCGTCAG-3'
RP-Bmi-1: 5'-CTCCTCATCTGCAACTTCTTCT-3'
Sonde-Bmi-1: 5'-FAM-TGATGCTGCCAATGGCTCCAATG-3'

FP-WPRE-5'-GAGGAGTTGTGGCCCGTTGT-3'
RP-WPRE-5'-TGACAGGTGGTGGCAATGCC-3'
FP-FLK-1-5'-GTGAATTGCAGAGCTGTGTGTTG-3'
RP-FLK-1-5'-ATTCATTGTATAAAGGTGGGATTG-3'

2.1.9 Sequenzier-PCR-Primer

H1-Primer: GCATGTCGCTATGTGTTCTGGGA

2.1.10 Plasmide

pSuper	Brummelkamp et al. ¹³⁷ .
R780 (pSF91-IRES-EGFP-PRE)	Hildinger et al. ¹⁴⁰ , Schwieger et al. ^{141,142} .
pUC19	Yanish-Perrong et al. ¹⁴³ .
Super-pUC19	Dogan, pUC19 EcoRI/AflIII-Fragment. ersetzt durch pSuper EcoRI/AflIII- Fragment.
pHR-SIN-cppt-SFFV-SR	Naldini, modifiziert durch Scherr.
sF91-cKitV558D-IRES-YFP-WPRE	Carol Stocking.
sF91-mp1S368C-IRES-YFP-WPRE	Daniel Wicke/Ute Modlich.
K73	Carol Stocking.
M57	Carol Stocking.
pCMV 8.9.1	Zuffery et al.
pMD.G	Ory et al

Inkubation: Bei 37 °C mit 5% CO₂
Verdoppelung: ca. 15 Stunden

Phoenix-eco-Zellen

Phoenix-eco-Zellen basieren auf 293T-Zellen, wobei das ecotrope Hüllprotein retroviral in 293T transduziert wurde. Dadurch wird das Hüllprotein endogen exprimiert, um höhere Virustiter zu gewährleisten.

Die Kultivierung erfolgt wie bei 293T Zellen (siehe auch unter http://www.stanford.edu/group/nolan/retroviral_systems/phx.html).

2.1.14 Software

Microsoft Office Microsoft, Redmond, WA, USA
SPSS 13 SPSS Inc., Chicago, IL, USA
FlowJo 6.4.7 Tree Star Inc., Ashland, OR, USA

2.2.0 Methoden

2.2.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Eine Vorkultur mit 20ml LB-Medium wurde mit einer Kolonie (HB101) angeimpft und bis zur Sättigung bei 37°C geschüttelt. Ein Milliliter der Vorkultur wurde für das Animpfen von 150 ml LB verwendet. Diese Hauptkultur wurde bei 21°C bis zu einer optischen Dichte (bei 578 nm Wellenlänge) von 0,4 bis 0,5 geschüttelt. Diese Kultur wurde auf drei Falcon-Röhrchen aufgeteilt, 10Min auf Eis gestellt und 15 Min bei 3000UpM abzentrifugiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis ausgeführt und Zentrifugationen bei 3000UpM bei 4 °C betätigt. Der Überstand wurde verworfen, die Bakterienpellets vereinigt und in 100ml 0,1 M CaCl₂ resuspendiert. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 3 ml 0,1M CaCl₂ resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde mit 1 ml einer 86% sterile Glycerinlösung vermischt und vorsichtig mit einer 10-ml-Pipette gemischt. Es wurden 100µl-Aliquots in Eppendorf-Röhrchen angelegt und diese gleich in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen wurden bei -70°C aufbewahrt. Die Kompetenz der Bakterien wurde mit 5pg pUC19 DNA überprüft, diese lag bei 5-10 x 10⁶ Kolonien pro µg DNA.

2.2.2 Transformation von Bakterien

Der Ligationsansatz wurde in HB101-Zellen transformiert. Dafür wurden 50µl Zellen auf Eis aufgetaut (5-10Min.) und 10µl des Ligationsansatzes durch leichtes Rühren der Pipettenspitze auf die Zellen gegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurde das Röhrchen für 45Sek. bei 42°C inkubiert (Hitzeschock) und anschließend wieder für 2 Min. auf Eis gestellt. Der Bakteriensuspension wurde 300µl S.O.C.-Medium zugefügt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert, damit die transformierten Bakterien das Resistenzgen exprimieren. Der gesamte Ansatz wurde auf eine LB-Agarplatte mit 0,1mg/ml Ampicillin verteilt und für 12 bis 16h bei 37°C inkubiert.

2.2.3 Photometrische Messung der DNA-Konzentration

Die Messung der DNA Konzentration erfolgte mit einem Spektrometer. Für die Messung wurden 2µl DNA in 198µl Aqua des. aufgenommen und in eine Quarzküvette überführt. Vor der Messung wurden folgende Einstellungen gewählt: Verdünnungsfaktor 100; OD = 50 für doppelsträngige DNA. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 260nm.
 $1 \text{ OD dsDNA} = 1\mu\text{g}$

2.2.4 Plasmid-DNA-Minipräparation

Ein Plastikröhrchen wurde mit 2ml LB-Ampicillin (0,1mg/ml) gefüllt und mit einer Bakterienkolonie angeimpft. Das Röhrchen wurde bei 37°C im Schüttler für 12 bis 16 Stunden inkubiert. Die Bakterien-Suspension wurde in ein 1,5ml Mikroreaktionsgefäß überführt und bei 13000UpM für 5 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA aus dem Bakterienpellet mit dem Qiagen Minipräparations-System nach Anleitung isoliert.

2.2.5 Plasmid-DNA-Maxipräparation

Eine mit dem entsprechenden Plasmid transformierte Bakterienkolonie wurde mit einer sterilen Pipettenspitze herausgepickt, um eine 2ml-LB-Amp.-Vorkultur anzuimpfen, die nach 6-stündiger Inkubation in 200ml LB-Amp. überführt wurde. Nach einer Inkubation bis maximal 16 Stunden im Schüttler bei 37°C wurde aus der Bakteriensuspension die Plasmid-DNA isoliert und gereinigt. Dafür wurde die Bakteriensuspension bei 6000UpM abzentrifugiert und die DNA nach Anleitung mit dem Qiagen Maxipräparations-System aus dem Bakterienpellet isoliert.

2.2.6 Restriktionsverdaue

Für Klonierungen wurden 6µg Plasmid-DNA verwendet. Die DNA wurde mit den entsprechenden Restriktionsenzymen für 2 - 3h bei 37°C in einem Gesamtvolumen von 40µl geschnitten. Plasmide, in die ein DNA-Fragment eingesetzt werden sollte, wurden anschließend mit boviner alkalischer Phosphatase (BAP) behandelt, wenn vorher nur mit einem Enzym oder *blunt-end* geschnitten wurde, um die Religation der Plasmidenden zu verhindern. Zuletzt wurde die Reaktion mit 5x Stopppuffer angehalten. Zur Auftrennung der DNA-Banden wurde die Reaktion auf einem Agarosegel separiert.

Für Kontrollverdaue wurden 0,5 – 1µg DNA in einem Volumen von 20µl eingesetzt.

2.2.7 Klonierung von shRNA-kodierenden Oligonukleotiden in das pSuper Plasmid

Die shRNA-kodierenden Oligonukleotide wurden hinter den H1-Promotor des pSuper-Plasmids kloniert. Dafür wurde es mit den Restriktionsenzymen *Bg/II* und *SalI* verdaut und anschließend dephosphoryliert.

15µl	pSuper Vektor (6µg Gesamt)
4µl	NEB-Puffer (10x)
1µl	<i>SalI</i> (16U)
1µl	<i>Bg/II</i> (8U)
0,4µl	BSA 100x
18,6µl	Wasser
40µl	Gesamtvolumen

Der Reaktionsansatz wurde für 3h bei 37°C inkubiert. Danach wurde 1µl (1IU) BAP hinzugefügt und 30 Min bei 37°C inkubiert. Der Verdau wurde mit 5x Stopppuffer fixiert und auf ein 1%iges Agarosegel bei 120V separiert. Für die Elektrophoresekammer wurde 1x TBE verwendet. Die entsprechende Vektorbande wurde unter einer UV-Tischlampe herausgeschnitten und die linearisierte Plasmid-DNA mit dem Gelextraktions-System von Qiagen nach Anleitung gereinigt. Die DNA wurde mit 20µl destilliertem Wasser von der Säule eluiert. Zur Abschätzung der DNA-Konzentration wurde 2µl DNA auf ein 1%iges Agarosegel analysiert.

2.2.8 Phosphorylierung und Hybridisierung

Die Enden chemisch synthetisierter shRNA-kodierender Oligonukleotide wurden mit T4-Polynukleotid-Kinase (PNK) phosphoryliert.

1,5µl	Forward Primer (100pmol/µl)
1,5µl	Reverse Primer (100pmol/µl)
2µl	PNK-Puffer 10x
1µl	ATP (10mM)
1µl	PNK (10U)
13µl	Wasser

Der Reaktionsansatz wurde gevortext, kurz anzentrifugiert und 30 Min bei 37°C inkubiert. Schließlich wurde die Reaktion 3 Min. bei 100°C im Wasserbad erhitzt, um die Kinase zu inaktivieren und die Oligonukleotide zu linearisieren. Die Reaktionsansätze wurden zur Hybridisierung im Wasserbad gelassen bis das Wasser RT erreichte.

2.2.9 Ligation

Zur Ligation von DNA Fragmenten wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

1µl	Geschnittener und aufgereinigter Vektor
3µl	Oligonukleotid mit phosphorylierten Enden bzw. augereinigtes DNA-Fragment
2µl	10x T4 DNA Ligase-Puffer
13µl	Wasser
1µl	T4-DNA-Ligase (3U)
20µl	Gesamtvolumen

Der Reaktionsansatz wurde 2h bei RT stehen gelassen oder 16h bei 16°C gekühlt.

2.2.10 Klonierung in retrovirale Plasmide

Das γ -retrovirale Plasmid R780S und das lentivirale Plasmid pHR-SIN-cppt-SFFV-SR wurden mit *Sna*BI linearisiert und anschließend mit BAP dephosphoryliert. H1-shRNA-Kassetten aus pSuper wurden mit *Hinc*II und *Sma*I herausgeschnitten und die Plasmidbanden und die *Insert*-Bande nach einer Trennung auf einem 1% igem Agarosegel mit dem

Gelextraktionskit von Qiagen nach Anleitung aufgereinigt. Vektor- und Insertbande wurden im Verhältnis von 1:3 ligiert und in chemisch kompetente HB101 transformiert.

2.2.11 Sequenzier-PCR

Der Erhalt der Basenfolge nach Klonierung wurde bestätigt, indem die shRNA-kodierende Basensequenz mittels H1-Primer (Bindungsstelle im H1-Promotor) sequenziert wurde.

2µl	DNA (100ng)
1µl	H1-Primer (100pmol/µl)
3µl	<i>Big Dye</i> (4x)
4µl	Wasser

PCR-Programm

96°C	30Sek. Denaturierung
60°C	4Min Hybridisierung/Verlängerung
25	Zyklen

Die PCR-Produkte wurden auf einer Sepharose-Säule gereinigt, um die restlichen fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotid-triphosphate (ddNTPs) sowie Proteine und Salze zu entfernen, die ein Hintergrundrauschen bei der Sequenzierung erzeugen würden. Die Sequenzierung erfolgte an einem ABI-Gerät.

2.2.12 Kryokonservierung von Zellen

Für Langzeitkonservierung von Zellen wurde folgender Ansatz gemischt:

5-10x 10 ⁶	Zellen
800µl	DMEM
800µl	FCS
180µl	DMSO

Die Kryoampullen wurden einen Tag bei -80°C in Kryoboxen gestellt und danach in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.13 Calcium-Phosphat-Transfektion

Für die Virusproduktion wurden zwei 175cm²-Zellkulturflaschen mit 0,01% Poly-L-Lysin (PLL) beschichtet und 5 Min stehengelassen, das PLL wurde entfernt und die Kulturflasche mit ca. 10ml PBS gewaschen. Die Flaschen wurden zwei Stunden unter der Sterilwerkbank zum Trocknen stehengelassen. Jede Flasche wurde mit 5x10⁶ 293T oder Phoenix-eco-Zellen in 25 ml DMEM + 10% FCS ausgesät.

Nach drei Tagen erfolgte die Transfektion, bei einer Konfluenz von 80-90%.

33µg	Retrovirales Plasmid
22µg	Verpackungsplasmid
4,5µg	“Envelope” Plasmid
244µl	2M CaCl ₂
(x) µl	Wasser
2000µl	Gesamtvolumen

Es wurden 2ml (2x) HBS auf 14-ml-Röhrchen verteilt, 2ml der obigen DNA/CaCl₂-Mischung tropfenweise unter ständiger Lufteinfuhr mit einer zweiten Pipette dazugegeben und anschließend zum Präzipitieren für 10Min stehengelassen. Vorbereitet wurden 12ml DMEM mit 10% FCS mit 4µl 0,1M Chloroquine. Das alte Medium der Zellen wurde mit 12ml vorbereitetes Medium und 4ml DNA/Calciumphosphat-Präzipitation ersetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, und 5% CO₂ Atmosphäre für ca. 16h über Nacht. Das alte Medium wurde von den Zellen entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 16ml RPMI + 10% FCS ersetzt. Nach 8 Stunden wurde der Überstand durch 16ml RPMI ersetzt und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Zellkulturüberstand gesammelt, bei 4°C aufbewahrt und wieder 16ml RPMI ohne FCS zugegeben. Nach 8 Stunden Inkubation wurde der zweite Zellkulturüberstand entnommen und mit neuem Medium ersetzt. Die gesammelten Überstände (64ml) wurden in 50ml-Falconröhrchen bei 1000UpM für 5Min zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen 0,45µm-Filter mit einer 50ml-Injektionsspritze in eine Zellkulturflasche gedrückt.

2.2.14 Konzentrierung des Virus

64ml Virusüberstand wurden auf 2 Beckman-Plastikzentrifugenröhrchen verteilt und diese in Ultrazentrifugen-Röhrchen eingesteckt. Die Zentrifugation erfolgte bei 10.000 UpM bei 10°C über Nacht (12-16h). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das

Zentrifugenröhrchen über Kopf auf ein steriles Tuch gestellt, um restliches Medium zu entfernen. Das Viruspellet wurde in 100µl PBS oder Medium pro Röhrchen aufgenommen, in 50µl-Aliquots aufgeteilt und bei -80°C gelagert.

2.2.15 Titerbestimmung

Zur Feststellung der Transduktionseffizienz des Viruskonzentrats wurden 1×10^5 32D-Zellen in einem Gesamtvolumen von 100µl RPMI/10% FCS/10% WehiCM/1xProtaminsulfat in ein Loch einer 96-Loch-Flachboden-Mikrotiterplatte ausgesät. Eine Verdünnungsreihe wurde mit 0,5/1/2/5µl Virus pro Loch angesetzt und die Platte für 90Min bei 32°C und 2500Upm zentrifugiert. Nach 24h wurden die Zellen in eine 24-Loch-Platte mit 1ml Medium überführt und für weitere 48h bei 37°C und 5%iger CO₂-Atmosphäre inkubiert. Nach 96h wurde der prozentuale Anteil transduzierter Zellen anhand von GFP bzw. RFP Fluoreszenz durch eine FACS-Messung ermittelt. Der Titer wurde im Wertebereich der linearen Phase als die Anzahl der transduzierten Zellen pro ml Viruskonzentrat angegeben.

2.2.16 RNA-Isolierung

Gesamt-RNA wurde 5 Tage nach Transduktion aus 32D-Zellen isoliert. Dafür wurden $1-5 \times 10^6$ Zellen in 1ml Trizol lysiert. Nach Zugabe von 200µl Chloroform wurde 15Sek. gevortext und der Ansatz 10Min. bei RT stehengelassen. Anschließend wurde bei 14000UpM bei 10°C zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Röhrchen überführt und mit 500µl Isopropanol für 10Min bei RT präzipitiert. Danach folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 14000UpM bei 10°C. Das RNA-Pellet wurde in 200µl 70%igem Alkohol gewaschen und der Überstand nach der Zentrifugation verworfen. Nach dem Trocknen wurde das RNA-Pellet in 22µl Wasser gelöst und bei -70°C gelagert oder gleich mit *DNaseI* verdaut.

2.2.17 *DNaseI*-Verdau

Zum entfernen von möglicher genomischer DNA wurde die RNA mit *DNaseI* behandelt.

22µl	Gesamt-RNA
8,6µl	<i>First strand buffer</i> (5x)
1,8µl	0,1M Dithiothreitol (DTT)
6,4µl	<i>DnaseI</i> (10U/µl)
1,2µl	<i>RNasin</i> (40U/µl)

Nach 1h Inkubation bei 37°C wurde die RNA gereinigt. Dazu wurden 60µl Wasser und 100µl

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol zugeführt, bis zur Trübung gevortext und 15Min. bei 14000UpM zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Röhrchen überführt, mit 300µl Ethanol und 2µl Glykogen gemischt und über Nacht bei -20°C aufbewahrt. Nach einer 25 Min. Zentrifugation bei 14000UpM und 10°C wurde das RNA-Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und 10min bei 14000UpM und 10°C zentrifugiert. Das Pellet wurde nach kurzem Trocknen in 20µl Wasser resuspendiert und die RNA-Konzentration am Nanodrop-Gerät bestimmt.

2.2.18 cDNA Synthese

Zur Umschreibung der RNA zu DNA wurde folgender Reaktionsansatz zusammenpipettiert.

4µl	<i>First strand buffer (5x)</i>
2µl	0,1M DTT
2µl	dNTP (10mM)
1µl	Primer pdN ₆ (<i>random primer</i> 100pmol/µl)
1µl	M-MLV Reverse Transkriptase (200U)
10µl	RNA (0,1µg/µl)

Der Reaktionsansatz wurde für 1h bei 37°C inkubiert, danach für 10Min. bei 70°C erhitzt und sofort auf Eis gestellt, um anschließend die quantitative *real-time* PCR qRT-PCR anzusetzen.

2.2.19 Quantitative *real-time* PCR

Alle cDNA Proben wurden für 3 bis 6 Reaktionen mit Wasser verdünnt. Von jeder cDNA Probe wurde eine Reaktion für GAPDH als Referenz und eine für PU.1 angesetzt, um durch die $\Delta\Delta C_t$ -Methode eine relative Konzentrationsbestimmung zu erzielen.

20µl cDNA Reaktion + 51,1µl Wasser = 71,1µl für drei Reaktionen von je 23,7µl.

Es wurde eine Primer/Sondenmixtur für das Referenzgen und das Zielgen angesetzt.

	1x Referenzgen	1x Zielgen
2x TaqMan-Mastermix	32	32
Forward/Reverse-Primer (30µM)	1,9	1,9
TaqMan-Sonde (2µM)	6,4	6,4
Gesamt	40,3	40,3

Danach wurden 40,3µl der Referenzgen-Mixtur bzw. Zielgen-Mixtur mit je 23,7µl cDNA-Verdünnung einer Probe zusammengemischt und als Dreifach Ansatz mit 20µl/Loch in eine optische 96-Loch Reaktionsplatte pipettiert.

PCR-Kondition

1. Phase 50°C–2 min –1 Zyklus
2. Phase 95°C–10 min –1 Zyklus
3. Phase (95°C–0,15 min/ 95°C–1 min) – 40 Zyklen

2.2.20 Berechnung der Änderung der PU.1-mRNA relativ zum Referenzgen (GAPDH)

$$\Delta C_t(\text{Kontrolle}) = C_t(\text{PU.1})_{\text{Kontrolle}} - C_t(\text{GAPDH})_{\text{Kontrolle}}$$

$$\Delta C_t(\text{Probe}) = C_t(\text{PU.1})_{\text{Probe}} - C_t(\text{GAPDH})_{\text{Probe}}$$

$$\Delta \Delta C_t = \Delta C_t_{\text{Probe}} - \Delta C_t_{\text{Kontrolle}}$$

$$2^{-\Delta \Delta C_t} = \text{Fach-Änderung}$$

Auswertung der Fach-Änderung:

- 1= Keine Änderung
- >1= x-Fache-Änderung
- <1= Reduktion (Berechnung der x-Fachen-Reduktion: 1/Reduktion)

2.2.21 Isolation genomischer DNA aus Zellklonen

Genomische DNA wurde aus Zellklonen isoliert, die mit R780 oder Derivate retroviral transduziert wurden. Dafür wurde DNA aus 1-3 x10⁶ Zellen mit dem *Qiagen Blood extraction*-System nach Anleitung isoliert und die genomische DNA in 100µl Wasser eluiert. Die DNA Konzentration wurde am Nanodrop-Spektrometer bestimmt.

2.2.22 Viruskopienzahl-Bestimmung von retroviral transduzierten Zellklonen durch qRT-PCR

Die Bestimmung der Viruskopienanzahl in Zellklonen erfolgte mit spezifischen Primer gegen die WPRE-Sequenz, die hinter der IRES-EGFP-Kassette des R780S-Plasmids vorhanden ist. Mit Hilfe der Kalibratorzelllinie *cloneB*, die genau 9 Integrationen des R780 (sF91)-Plasmids im Genom aufweist, wurden mittels qRT-PCR die zu *cloneB* relativen Kopienzahlen in den Zellklonen bestimmt¹⁴⁴. Zur Normalisierung der DNA-Menge wurde zusätzlich *flk-1* als Referenzgen verwendet. Für die qRT-PCR wurden 100ng genomische DNA pro Reaktion eingesetzt.

	1x	1x
Mastermix	WPRE	FLK-1
Forward/Reverse Primer (2µM)	32	32
Power SybrGreen (2x)	3,2	3,2
Gesamt	35,2	35,2

PCR-Kondition

1. Phase 50°C–2 min–1 Zyklus
2. Phase 95°C–10 min–1 Zyklus
3. Phase (95°C–0,15 min/ 95°C–1 min) 40 Zyklen

Die genomische DNA wurde auf 100ng in 28,8µl Wasser pro Reaktion eingestellt und mit 35,2µl WPRE bzw. FLK-1 Mastermix gemischt. Die resultierenden 64µl wurden an je 20µl auf drei Löcher einer optischen 96-Loch-Reaktionsplatte verteilt. In gleicherweise wurde die DNA der Kalibratorzelllinie sowie je eine Wasserkontrolle mit WPRE- und FLK-1-Primer angesetzt. Die Berechnung der Kopienzahlen erfolgte durch eine modifizierte $\Delta\Delta C_T$ -Methode nach Pfaffl¹⁴⁵.

2.2.23 Retrovirale Transduktion von 32D-Zellen

Der Transfer der bifunktionalen Vektoren in 32D-Zellen erfolgte mit konzentrierten retroviralen Überständen mit einer *Multiplicity of Infection* (MOI) von 0,5 bis 1,5. Dafür wurden 32D-Zellen mit eingestellten Mengen an Virus unter 10% WehiCM in RPMI/10% FBS sowie 1x Protaminsulfat in einem Gesamtvolumen von 250µl in einer 48-Loch-Platte durch Spinokkulation transduziert. Die Zellen wurden nach 24h Inkubation in 8-Loch-Platten umgesetzt und für 96h expandiert.

2.2.24 Isolation von GFP-positiver Zellen mit einem FACS-Gerät und *limiting dilution*

Test

Die transduzierten Zellen wurden nach 4 Tagen Inkubation dreimal mit PBS gewaschen und zum Sortieren in 400µl Medium ohne WehiCM aufgenommen. Die GFP-positiven Zellen wurden in Falconröhrchen sortiert. Nach der Isolation wurden die Zellen herunterzentrifugiert und in 1ml Medium ohne WehiCM resuspendiert. Die Zellzahl wurde in einem Hämocytozometer bestimmt und auf 5000-10000 Zellen/ml verdünnt. Danach wurden 200 Zellen in 40ml Medium ohne WehiCM aufgenommen. Davon wurden 20ml entfernt und für die Plattierungskontrolle in 2ml vorgelegtem WehiCM aufgenommen. Die restlichen 20ml wurden mit 2ml Medium ohne WehiCM ausgeglichen. Beide Ansätze mit je 100 Zellen wurden mit Hilfe einer Multipipette mit 200µl pro Loch auf je eine 96-Loch-Platte verteilt und ca. 12 Tage bei 32°C in einen CO₂-Inkubator gestellt. Die restlichen isolierten Zellen wurden in Medium mit WehiCM aufgenommen und über Nacht bei 32°C in einen CO₂-Inkubator gestellt, um diese am nächsten Tag zur RNA-Isolation in Trizol aufzunehmen. Am Tag 12 wurden alle GFP-positiven Zellklone auf den Platten ausgezählt. Jeweils 5-7 faktorunabhängig wachsende Klone wurden expandiert. Die Zellklone wurden am Durchflusszytometer auf Klonalität überprüft und genomische DNA für die Viruskopienzahl-Bestimmung isoliert.

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung von bifunktionalen retroviralen Vektoren

3.1.1 Generierung einer *unique-restriction-site* in die retroviralen Plasmide R780 und R780- β GMR-I374N

Das Plasmid R780 wurde zum retroviralen Gentransfer in 32D Zellen verwendet (**Abbildung 7**)¹⁴². Die *NotI*- Restriktionsschnittstelle vor der IRES-EGFP-WPRE-Kassette ermöglicht die Klonierung eines beliebigen Gens, um ein *gain-of-function* zu erzeugen. Nach retroviralem Gentransfer liegt die mRNA in den Zellen als ein bicistronisches Transkript vor, wobei das Transgen durch die *internal ribosome entry site* (IRES) mit der *enhanced green fluorescence protein* (EGFP)-Sequenz verbunden ist. Die nachgeschaltete *post-transcriptionel regulatory element* vom Woodchuck Hepatitis Virus (WPRE) verstärkt die Genexpression durch Modifikation der Polyadenylierung, RNA Export und Translation. Zur Klonierung von shRNA-kodierenden Oligonukleotiden wurde die Restriktionsschnittstelle *SnaBI* in das 3'LTR erzeugt, um zusätzlich RNAi-vermittelte *loss-of-function* zu ermöglichen (**Abbildung 7**). Der Einbau eines shRNA-kodierenden Oligonukleotids in die 3'LTR bewirkt außerdem die Verdoppelung der H1-shRNA-Expressionskassette in die 5'LTR sowie die Selbstinaktivierung während der reversen Transkription der viralen RNA.

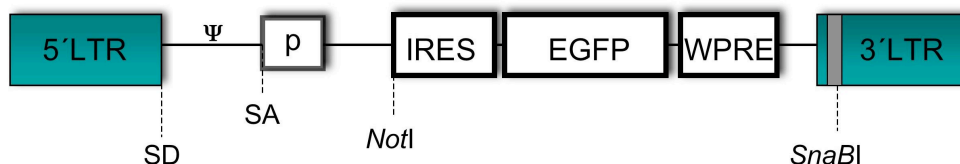


Abbildung 7 Aufbau des γ -retroviralen (*gain-of-function*) Vektors R780S (S für *SnaBI*) nach Einbau der *SnaBI*-Restriktionsschnittstelle in die 3'LTR wird gleichzeitig RNAi-vermittelte *loss-of-function* ermöglicht (vergleiche Abbildung 6A).

Dafür wurde in der U3-Region des 3'-LTRs durch Punkt-gerichtete Mutation eine *SnaBI*-Schnittstelle hergestellt. Da die zu mutierende Basensequenz sowohl in der 3'- als auch in der 5'-LTR identisch war, wurde die 3'-LTR-spannende Sequenz zuvor in ein Klonierungsvektor subkloniert. Dafür wurde das 3'-LTR-Fragment durch die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *ClaI* aus R780 herausgeschnitten und in die *NdeI*-/*ClaI*-Schnittstelle des Plasmids Super-pUC19 eingefügt.

Nach der Mutagenese-PCR an Super-pUC19-3'-LTR wurde das *Template*-Plasmid mit *DNaseI* verdaut, dabei bleibt die PCR-amplifizierte DNA erhalten. Anschließend wurde der Reaktionsansatz in chemisch kompetente Bakterien (XL1Gold) transformiert, um das mutierte Plasmid zu amplifizieren. Das 3'-LTR-*SnaBI*-Fragment wurde anschließend in die *NdeI*/*ClaI*-Schnittstelle des R780 und R780- β GMR-I374N kloniert. Die resultierenden Plasmide R780S und R780S- β GMR-I374N wurden durch Verdau mit *SnaBI* überprüft.

Folgende Konstrukte wurden hergestellt:

R780S (*SnaBI*-Schnittstelle in der U3-Region des 3'-LTRs)

R780S- β GMR-I374N (*SnaBI*-Schnittstelle in der U3-Region des 3'-LTRs)

3.1.2 Klonierung von shRNA-kodierenden Oligonukleotiden in die *SnaBI*-Schnittstelle von R780S und R780S- β GMR-I374N

Die Nukleotidsequenzen funktioneller shRNAs gegen das murine p53-Gen sowie eines Luciferase-Gens als Kontrolle (shG12=shctrl) wurden aus der Literatur übernommen und drei weitere shRNAs gegen PU.1, LEF-1 und Bmi1 wurden in diesem Labor generiert, validiert und chemisch synthetisiert^{71,146,147}. Diese Oligonukleotide wurden über *BgIII/SalI*-Schnittstellen hinter den H1-Promotor des pSuper-Plasmids kloniert. Die Klonierung wurde durch einen *EcoRI*/*XhoI*-Doppelverdau überprüft, dabei entstand ein spezifisches 350bp-Fragment. Mindestens zwei positive Klone eines klonierten Oligonukleotids wurden durch Sequenzierung auf Richtigkeit überprüft.

Als nächstes wurden die H1-shctrl/-p53/-PU.1/-Lef1/-Bmi1-Expressionskassetten über *SmaI*/*HincII* aus pSuper in die *SnaBI*-Schnittstelle des retroviralen Plasmids R780S und R780S- β GMR-I374N kloniert (**Abbildung 8**).

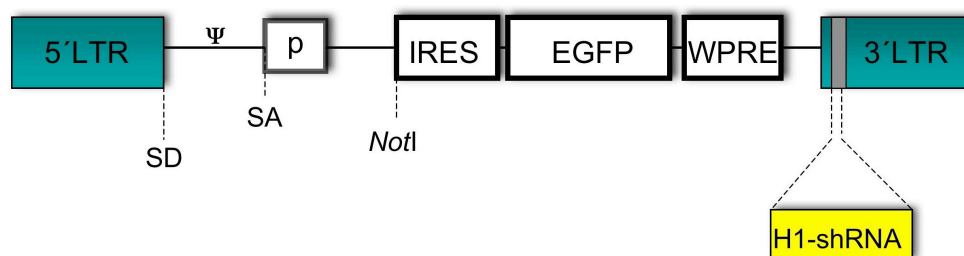


Abbildung 8 R780S mit einer H1-shRNA-Expressionskassette in der *SnaBI*-Restriktionsschnittstelle.

Folgende Konstrukte wurden hergestellt:

R780S-shctrl und R780S- β GMR-I374N-shctrl

R780S-shp53 und R780S- β GMR-I374N-shp53

R780S-shPU.1 und R780S-βGMR-I374N-shPU.1

R780S-shLef-1 und R780S-βGMR-I374N-shLEF-1

R780S-shBmi-1 und R780S-βGMR-I374N-shBmi-1

3.1.3 Klonierung der cDNAs von c-KitV558D und mplS368S Rezeptorpunktmutanten in die *NotI*-Schnittstelle der R780S, R780S-shctrl sowie -shPU.1 Plasmide

Die c-KitV558D- und mplS368C-Gene wurden über *NotI* aus sF91-cKitV558D-IRES-YFP-WPRE und sF91-mplS368C-IRES-YFP-WPRE isoliert und in die *NotI*-Schnittstelle des R780S, R780S-shctrl, -shp53, -shPU.1, shLef-1 und shBmi-1 kloniert (**Abbildung 9**). mplS368C wurde nur in R780S-shctrl und -shPU.1 kloniert.

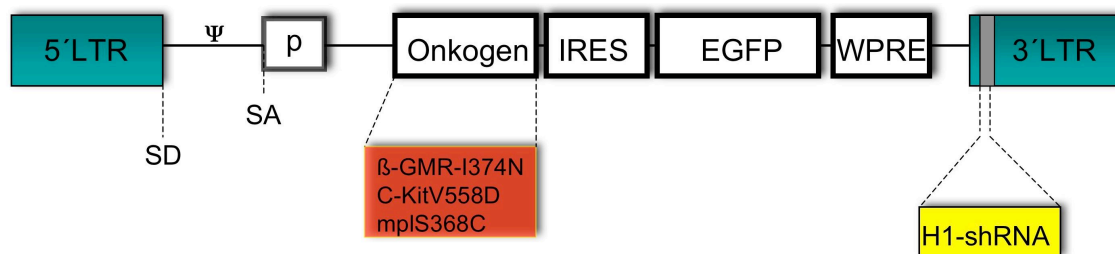


Abbildung 9 R780S mit einer onkogenen Zytokinrezeptormutante (*gain-of-function*) in der *NotI*-Schnittstelle sowie einer H1-shRNA-Expressionskassette (*loss-of-function*) in der *SnaBI*-Restriktionsschnittstelle.

Folgende Konstrukte wurden hergestellt:

R780S-c-Kit-V558D und R780S-mplS368C

R780S-c-Kit-V558D-shctrl und R780S-mplS368C-shctrl

R780S-c-Kit-V558D-shp53

R780S-c-Kit-V558D-shPU.1 und R780S-mplS368C-shPU.1

R780S-c-Kit-V558D-shLef-1

R780S-c-Kit-V558D-shBmi-1

3.2 Herstellung eines p53-defizienten 32D-Zellklons durch lentiviral-vermittelte RNAi

Zur Herstellung von 32D-Zellen mit p53-*knock-down* wurden 32D-Zellen mit einem lentiviralen Vektor, die eine murine p53-shRNA und das RFP_{EXPRESS} kodieren (dcH1-shp53-SR, **Abbildung 10**), transduziert.

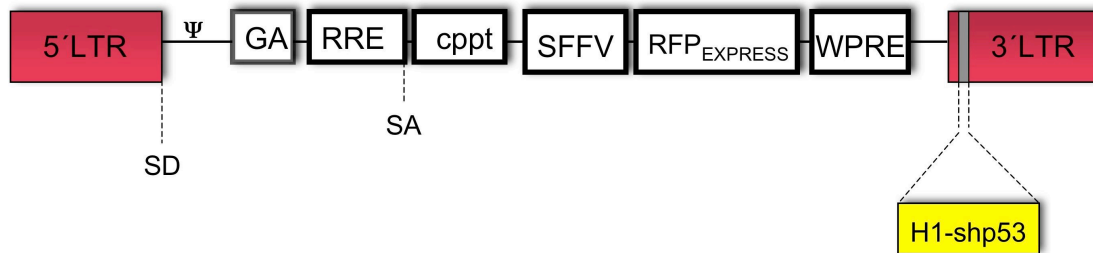


Abbildung 10 Der lentivirale Vektor dcH1-shp53-SR kodiert eine H1-shp53-Expressionskassette in der 3'LTR und das RFP_{EXPRESS}.

Die gemischte Zellpopulation wurde bei einer Verdünnung von 30 Zellen pro 96-Loch-Platte ausgesät, um stabile Zellklone zu erhalten. Die Zellklone wurden 32D-p53-hypo genannt. Die RNAi-vermittelte p53-Reduktion in 32D-p53-hypo wurde durch qRT-PCR bestimmt und war um ca. 80% reduziert.

3.3 Proliferation von 32D und 32D-p53-hypo Zellen

Beide Zelllinien wurden in WehiCM, als eine Quelle für IL-3, gehalten und die Proliferation durch die Trypanblauausschluss-Methode in einer Neubauerkammer bestimmt. Die Zellteilungsrate beider Zelllinien war dabei annähernd gleich (**Abbildung 11**).

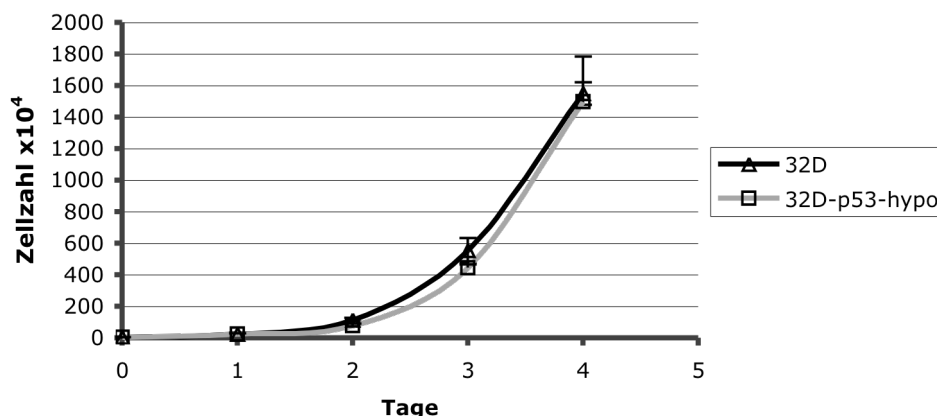


Abbildung 11 Proliferationstest 32D vs. 32D-p53-hypo in WehiCM. Zellen wurden bei einer Konzentration von 5×10^4 /ml in 24-Loch Platten ausgesät und täglich gezählt. Die Standardabweichung von zwei Experimenten ist durch senkrechte Balken dargestellt.

3.3.1 Test auf Faktorabhängigkeit von 32D und 32D-p53-hypo

Die Wildtyp-Zelllinie 32D sowie die daraus abgeleitete 32D-p53-hypo wurden vor jedem Experiment auf IL-3-abhängiges Wachstum getestet. Dafür wurden Zellen dreimal in PBS gewaschen und in Medium ohne IL-3 aufgenommen. Beide Zelllinien starben nach zwei Tagen, was durch Reduktion der Zellzahlen im Proliferationstest und durch den Anstieg des Anteils an PI-positiven Zellen durch Durchflusszytometrie gezeigt wurde (**Abbildungen 12; 13**). Weiterhin wurden auch über einen längeren Zeitraum von 1-2 Wochen keine faktorunabhängigen Zellklone beobachtet.

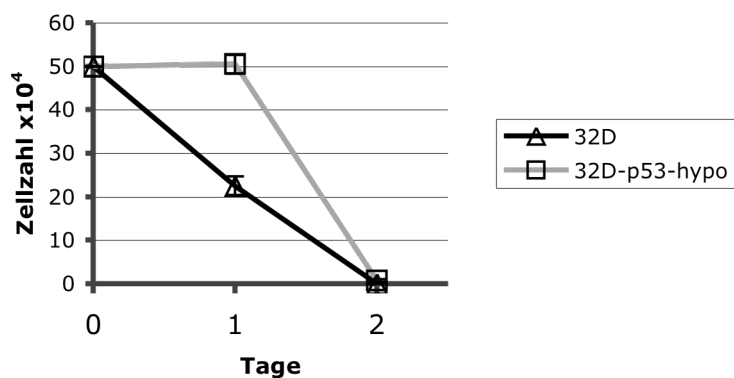


Abbildung 12 Proliferationstest nach IL-3-Entzug: Zellen wurden bei einer Konzentration von 5×10^5 /ml in 24-Loch Platten ausgesät und die Zellzahl täglich durch Trypanblauausschluss in einer Neubauerkammer bestimmt. Die Standardabweichung wurde von zwei unabhängigen Experimenten berechnet.

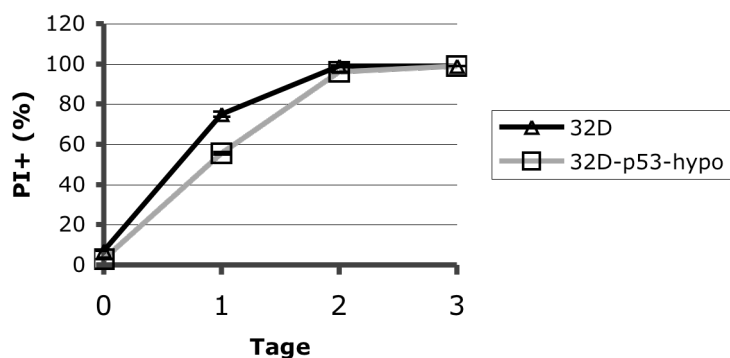


Abbildung 13 PI-Färbung nach IL-3-Entzug: Zellen wurde bei einer Konzentration von 5×10^5 /ml Medium in 24-well Platten ausgesät und der prozentuale Anteil PI-positiver Zellen täglich durch Durchflusszytometrie bestimmt. Die Standardabweichungen von zwei Experimenten sind als senkrechte Balken dargestellt.

3.4 Funktionelle Evaluation des Transformationspotentials der onkogenen Zytokinrezeptoren β -GMR-I374N, c-KitV558D und mplS368S in 32D-Zellen

Zur funktionellen Evaluation der onkogenen Zytokinrezeptoren in den bifunktionalen retroviralen Vektoren wurden Virusüberstände vom R780S- β GMR-I374N, R780S-c-KitV558D, R780S-mplS368S und R780S (Leervektor = Kontrolle) produziert, um 32D-Zellen zu transduzieren. Danach wurden die Zellen drei Tage lang in WehiCM kultiviert und der prozentuale Anteil transduzierter Zellen über die GFP-Fluoreszenz am Durchflusszytometer bestimmt, wobei GFP über IRES ko-exprimiert wird. Der Anteil GFP-positiver Zellen am Tag 3 war wie folgt (**Tabelle 1**):

	Anteil GFP+ Zellen
R780S	90%
R780S- β GMR-I374N	8%
R780S-c-KitV558D	27%
R780S-mplS368S	6%

Tabelle 1 FACS-Messung: Prozentuale Anteil GFP+ 32D-Zellen nach 3 Tagen Transduktion.

Die Zellen wurden am dritten Tag dreimal in PBS gewaschen und in Medium ohne IL-3 weiterkultiviert. Zellen, die mit dem Leervektor transduziert waren, starben nach zwei Tagen (nicht gezeigt) und GFP+ Zellen, die onkogene Zytokinrezeptoren exprimierten reicherten sich über 6-12 Tagen bis zu 99 % an (**Abbildung 14**).

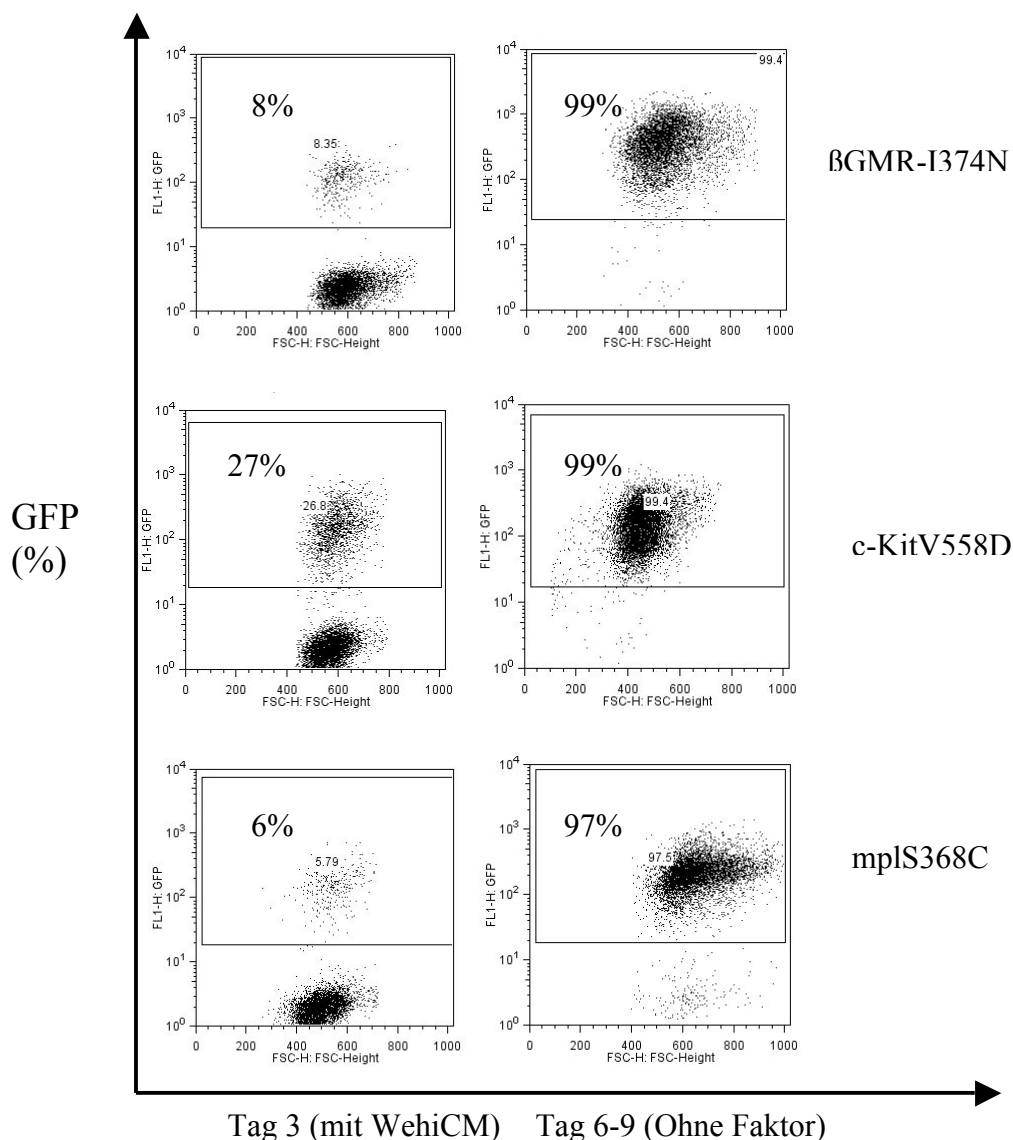


Abbildung 14: Onkogene Zytokinrezeptoren exprimierende 32D-Zellen am Tag 3 und nach Faktorentzug. GFP wird über IRES ko-exprimiert. Gezeigt sind FACS-Messungen von je einem repräsentativen Experiment.

3.5 Differenzierungspotential von wildtyp 32D, 32D- β GMR-I374N, 32D-c-KitV558D in G-CSF zu Granulozyten

Die Kultivierung von 32D-Zellen in G-CSF bewirkt die Differenzierung zu Granulozyten. Zur Testung der Differenzierungskapazität von transformierten β GMR-I374N und c-KitV558D exprimierender 32D-Zellen wurden stabile Zellklone selektiert und ohne WehiCM expandiert. 32D- β GMR-I374N und 32D-c-KitV558D Zellklone sowie wildtyp 32D wurden dreimal in PBS gewaschen und in Medium mit 50 ng/ml G-CSF kultiviert. Wobei 32D-Zellen nach 7 Tagen in G-CSF überwiegend zu Granulozyten ausdifferenzierten, blieben transformierte 32D auch nach längerer Inkubation in G-CSF undifferenziert (**Abbildung 15**).

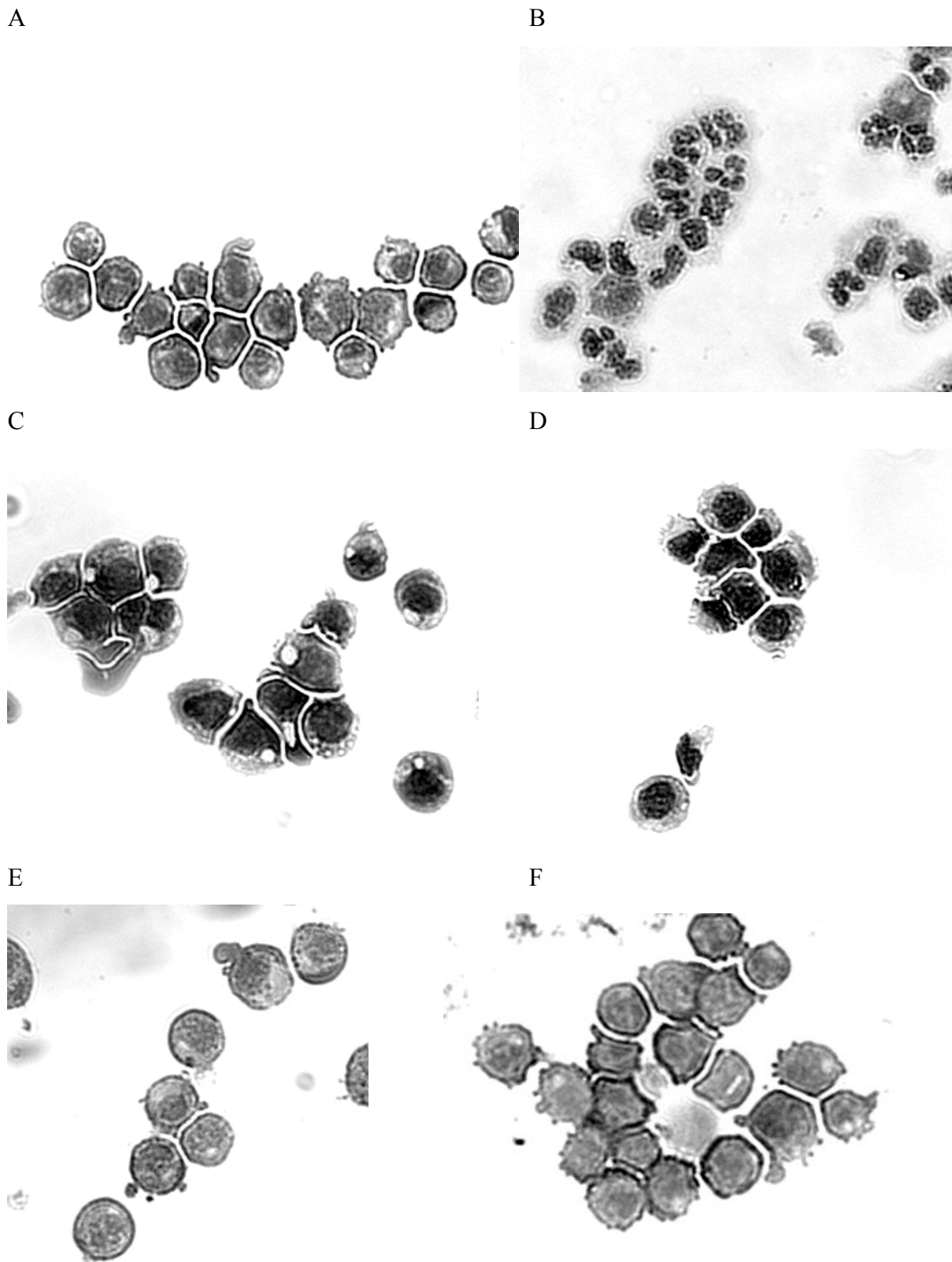


Abbildung 15 Differenzierung von 32D sowie 32D- β GMR-I374N und 32D-c-KitV558D Klone in 50ng/ml G-CSF. A. 32D in Wehi, B. 32D in G-CSF nach 7 Tagen, C. 32D- β GMR-I374N ohne Faktor, D. 32D- β GMR-I374N in G-CSF nach 10 Tagen, E. 32D-c-KitV558D ohne Faktor, F. 32D-c-KitV558D in G-CSF nach 10 Tagen. Mikroskopische Durchlichtaufnahmen bei 200-facher Vergrößerung.

3.6 Zellkulturmodell zur Identifizierung sowie Quantifizierung kooperierender Effekte von Onkogenen bei der Transformation hämatopoetischer Zellen

Der retroviral vermittelte Gentransfer der bifunktionalen Vektoren R780S-Onkogen-shRNA in wildtyp 32D bzw. 32D-p53-hypo Zellen erlaubt die stabile Expression eines Onkogens sowie GFP und die gleichzeitige Transkription einer shRNA. Dabei werden die faktorabhängigen Zellen durch die Onkogenexpression zu IL-3-unabhängiges Wachstum transformiert. In einem *limiting dilution* Test kann man somit Transformationsstärken unterschiedlicher Onkogene untereinander quantifizieren. Zusätzlich soll das Modell durch Onkogenexpression und die gleichzeitige shRNA-vermittelte RNAi gegen ein Zielgen in wildtyp 32D oder 32D-p53-hypo über mögliche kooperierende Effekte zweier oder mehrerer Onkogene bei der Transformation von hämatopoetischen Zellen Aufschluß geben.

3.6.1 Experimenteller Aufbau des Zellkulturassays

Im ersten Schritt wurden 32D-Zellen mit getiterten retroviralen Überständen mit einer MOI von 0,5-1,5 transduziert und für vier Tage mit WehiCM expandiert. Danach wurden die Zellen dreimal in PBS gewaschen und GFP-positive Zellen an einem Fluoreszenz-Durchflusszytometer mit einer Sortiereinheit sortiert. Die Reinheit der Sortierung wurde durch Durchflusszytometrie nachgemessen. Von jeder Transduktionsbedingung wurden Verdünnungen hergestellt, um 100 bzw. 1000 sortierte Zellen ohne WehiCM und 100 Zellen mit WehiCM (Kontrollplatte, Plattierungseffizienz) auf eine 96-Loch-Platte auszusäen. (**Abbildung 16**). Die restlichen sortierten Zellen (*bulk*-Populationen) wurden einen weiteren Tag mit WehiCM kultiviert und zur RNA-Isolation in Trizol aufgenommen. In diesen *bulk*-Populationen wurden durch quantitative *real time*-PCR (qRT-PCR) die mittlere Reduktionsrate des jeweilig untersuchten Gens auf mRNA-Ebene ermittelt. Nach 10-12 Tagen wurden alle GFP-positiven Klone einer Platte ausgezählt.

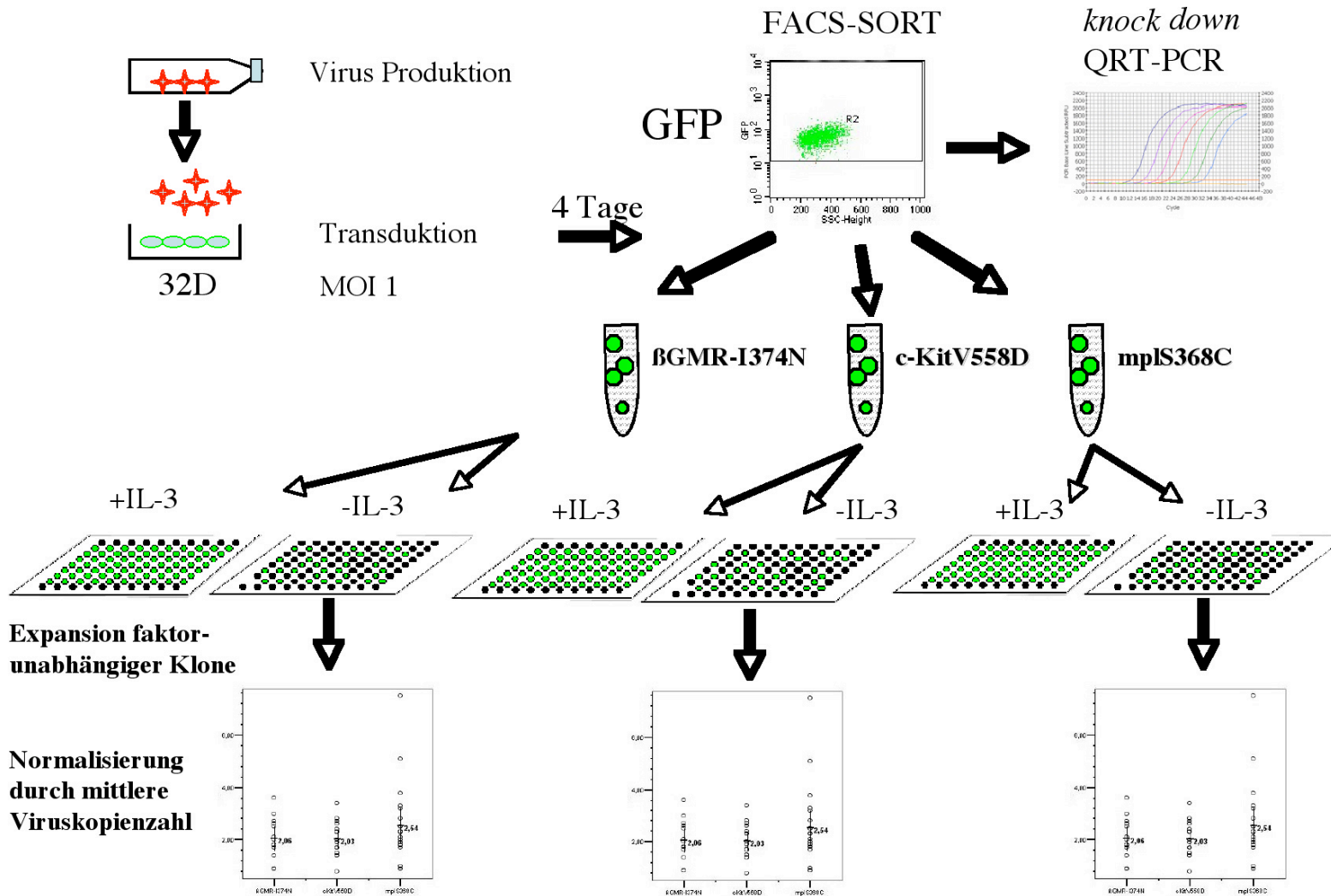


Abbildung 16 Der experimentelle Aufbau des Zellkulturtests schematisch dargestellt.

Dabei wurde die Anzahl faktorunabhängig wachsender Klone in Relation zur Kontrollplatte derselben rekombinanten Zelllinie gesetzt. Die Transformationsstärke des Onkogens bzw. der kombinierten Onkogene wurde als Prozent faktor-unabhängiger Klone zur Kontrollplatte dargestellt. Mindestens fünf faktorunabhängig wachsende Klone einer Platte wurden zur Isolation genomischer DNA expandiert, um die mittlere Kopienzahl zu bestimmen.

3.6.2 Plasmid (Virus)-Kopienzahl-Bestimmung in Zellklonen nach Virusintegration

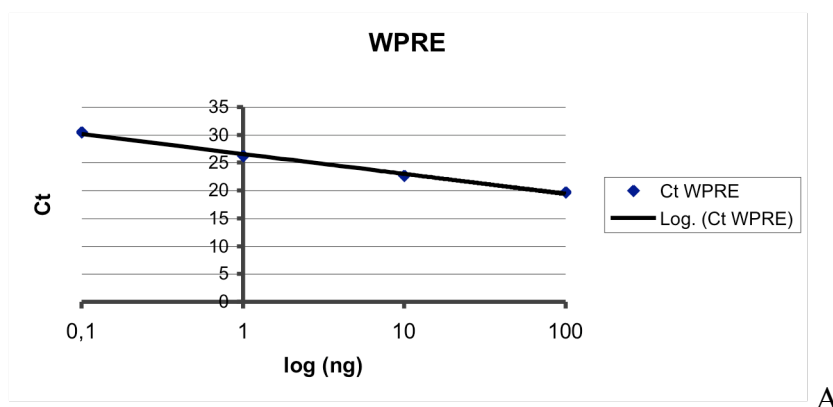
Die Kopienzahlen in den Zellklonen wurden durch spezifische Primer gegen das WPRE-Gen, das sich im R780-Plasmid hinter dem EGFP-Gen befindet, in einer quantitativen *real-time*-PCR (QRT-PCR) mit Sybr-Green bestimmt¹⁴⁴. Dafür wurde ein Primerpaar gegen das murine flk als Referenzgen zum Normalisieren der genomischen DNA-Menge verwendet. Durch den Einsatz einer Kalibratorzelllinie (*clone B*) mit genau 9 Kopien konnten mit Hilfe einer modifizierten ddCt-Methode nach Pfaffl die Kopienzahlen in den einzelnen Klonen in Verhältnis (R) zum *cloneB* bestimmt werden¹⁴⁵. Dafür wurden zuerst die Primer-Effizienzen (E) über eine Verdünnungsreihe der *cloneB* cDNA mittels qRT-PCR ermittelt (**Abbildung 17**). Ein Primerpaar ist am effizientesten, wenn sich die DNA-Menge bei jedem Zyklus der PCR verdoppelt, dabei verhält sich die DNA-Menge proportional dem Zyklen-Schwellenwert (Ct). Die Effizienzen der Primerpaare waren für WPRE und flk-1 1,9 bzw. 2.

Formel: $E = 10^{-1/\text{Steigung}}$,

$E_{(\text{WPRE})} = 1,9$ und $E_{(\text{FLK-1})} = 2,0$

$$R = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{Ct_{\text{Zielgen(Kalibrator)}} - Ct_{\text{Zielgen(Probe)}}}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{Ct_{\text{Referenzgen(Kalibrator)}} - Ct_{\text{Referenzgen(Probe)}}}} \quad \text{Pfaffl M.W. }^{145}$$

Die Viruskopienzahl (WPRE) in dem Klon beträgt damit: $R \times 9$



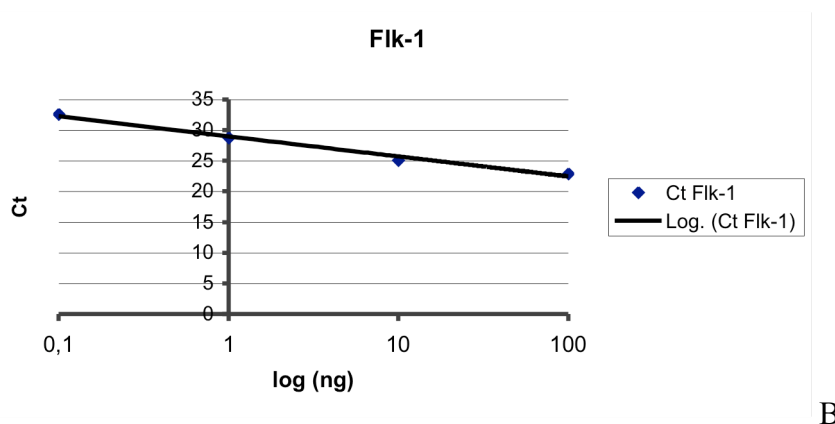


Abbildung 17 A-B Primer-Effizienzen der WPRE und flk-1 Primer. Die Primer wurden in einer Verdünnungsreihe von 0,1 bis 100 ng *clone B* cDNA eingesetzt, um über eine Regressionsgerade die Steigungen zu bestimmen.

3.6.3 Quantifizierung der Transformationsstärke von β GMR-I374N, c-KitV558D und mplS368C untereinander

Der oben beschriebene Zellkulturtest wurde zur Quantifizierung der Transformationseffizienzen der untersuchten Onkogene eingesetzt. Dabei wurden retrovirale Überstände von R780S- β GMR-I374N, R780S-cKit-V558D und R780S-mplS368C hergestellt und wildtyp 32D-Zellen mit einer MOI von 1 transduziert. Die weiteren Schritte erfolgten wie unter experimenteller Aufbau (3.6.1) beschrieben. Die Transformationsstärke von β GMR-I374N betrug 2%. Im Gegensatz dazu transformierten c-KitV558D und mplS368C mit 50-55% Effizienz, mindestens 25-fach stärker. Die Transformationsstärken zwischen den letztgenannten Onkogenen waren ungefähr gleich stark. (**Abbildung 18**).

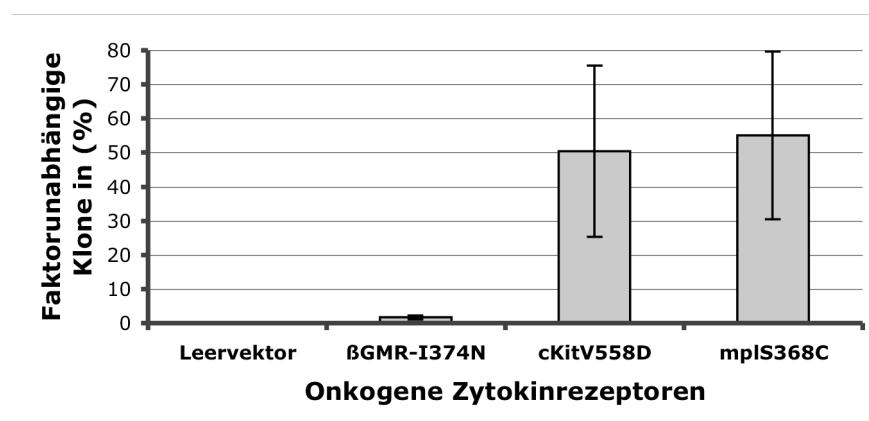


Abbildung 18 Transformationsstärken onkogener Zytokinrezeptoren bei der Transformation von 32D-Zellen. Ergebnisse von drei gemittelten Experimenten mit Fehlerbalken. Transformationsstärken sind gezeigt als prozentualer Anteil faktorunabhängiger Klone relativ zur Kontrollplatte. Dabei wurden die Anzahl der Klone ohne Faktor dividiert durch die Anzahl der Klone mit Faktor und anschließend mit 100 multipliziert.

Ergebnisse wurden auf die Viruskopienzahl von 2 normalisiert (**Abbildung 19**).

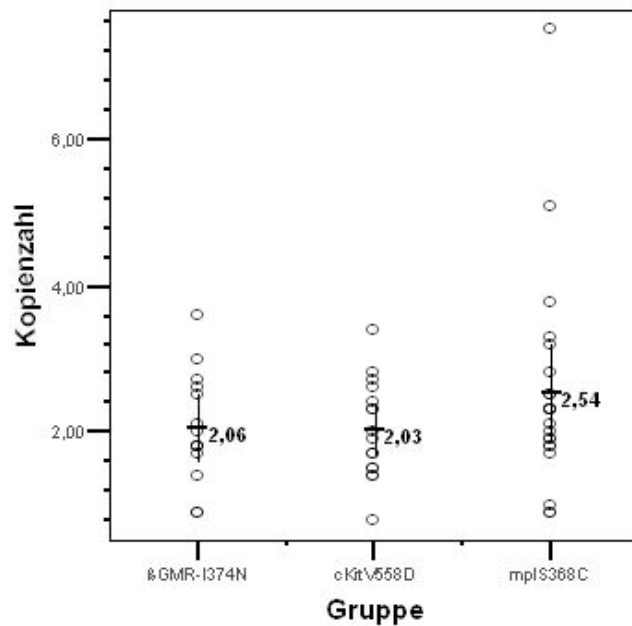


Abbildung 19 Viruskopienzahl pro Zellklon (Mittelwerte als waagerechte Linie gezeigt) ermittelt durch qRT-PCR.

3.6.4 Die alleinige Expression von R780S-shcontrol, -shp53, -shPU.1, -shLEF.1, -shBmi-1 in 32D-Zellen bzw. 32D-hypo-p53 wirkt nicht transformierend

Die Expression der Kontroll-shRNA als auch shRNAs gegen p53, PU.1, LEF.1 und Bmi-1 zeigten keine transformierenden Eigenschaften in 32D-Zellen bzw. 32D-hypo-p53 Zellen. Dafür wurden jeweils 32D- bzw. 32D-hypo-p53-Zellen, wie unter experimenteller Aufbau (3.6.1) behandelt, mit einer MOI von 1 transduziert und 100 sortierte GFP positive Zellen aus jeder Bedingung auf je eine 96-Loch-Platte mit WehiCM (Kontrollplatte) und je eine Platte mit 100 bzw. 1000 Zellen ohne WehiCM pipettiert. Unter WehiCM-Bedingungen wurden für 32D- und 32D-p53-hypo-Zellen 35-52 bzw. 35-42 faktorabhängige GFP-positive Klone erhalten, wobei ohne WehiCM keine Klone faktorunabhängig wuchsen (**Abbildungen 20, 21**).

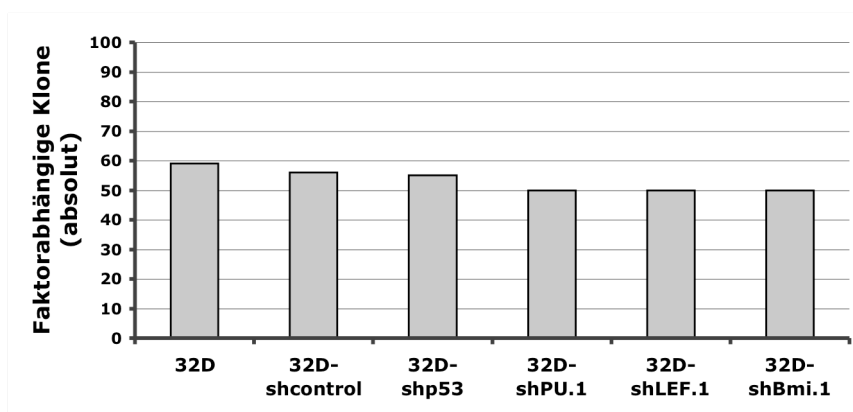


Abbildung 20: Absolute Anzahl faktorabhängiger GFP-positiver 32D-shRNA sowie wildtyp 32D-Klone bei 100 Zellen pro 96-Loch-Platte mit WehiCM.

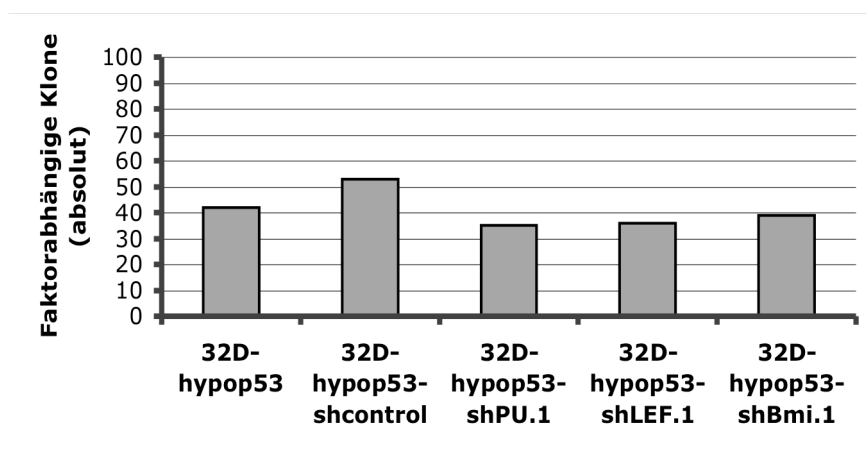


Abbildung 21: Absolute Anzahl faktorabhängiger GFP-positiver 32D-p53-hypo + shRNA sowie untransduzierte 32D-p53-hypo Klone bei 100 Zellen pro 96-Loch-Platte mit WehiCM.

Die durchschnittlichen Viruskopienzahlen pro Zelle in den jeweiligen Bedingungen lagen zwischen 1,1 und 2,7 für 32D bzw. 1,3 und 2,8 für 32D-p53-hypo, ermittelt durch qRT-PCR (**Abbildung 22**).

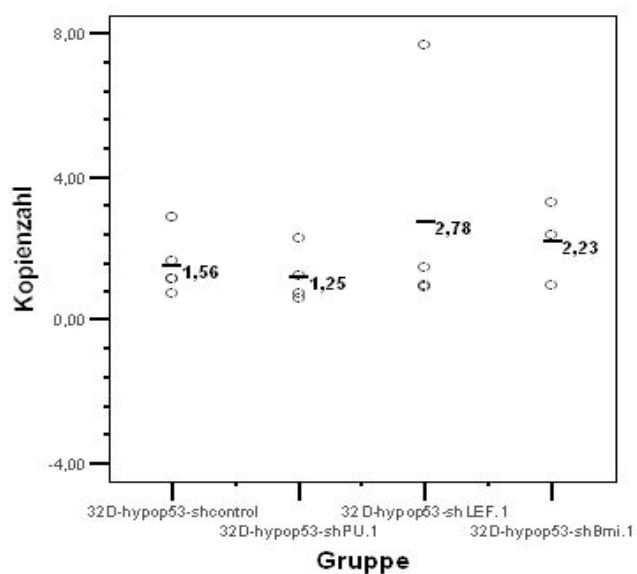
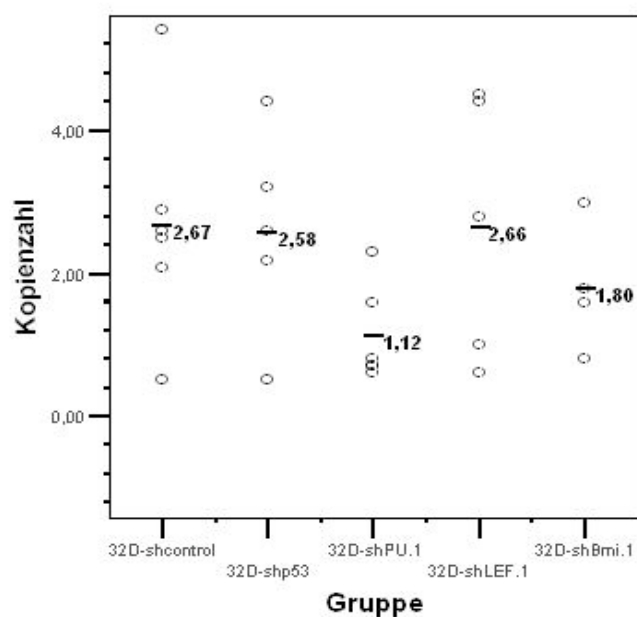


Abbildung 22 Kopienzahlen in den Klonen der Kontrollplatten (Waagerechte Linie gleich mittlere Kopienzahl), ermittelt durch qRT-PCR auf das WPRE-Gen.

In den GFP-sortierten Gesamtzellpopulationen waren die mRNA-Konzentrationen der Zielgene -2 bis -4-fach in 32D und -2 bis -3-fach in 32D-p53-hypo relativ zur KontrollshRNA transduzierten Zellen reduziert (**Abbildungen 23, 24**).

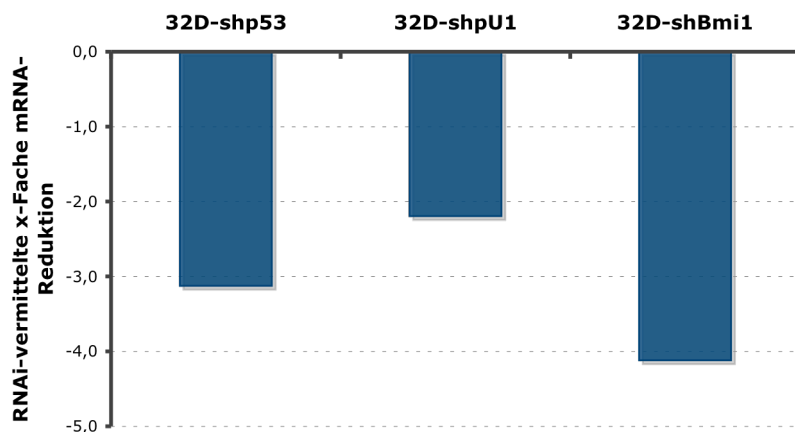


Abbildung 23 RNAi-vermittelte Reduktion in R780S-shp53, -PU.1, -Bmi-1 transduzierten und sortierten 32D-Zellen, LEF-1 konnte nicht detektiert werden. *Knock down* gezeigt als x-Fache Reduktion im Vergleich zu R780S-shctrl durch qRT-PCR, wobei GAPDH als Referenzgen diente.

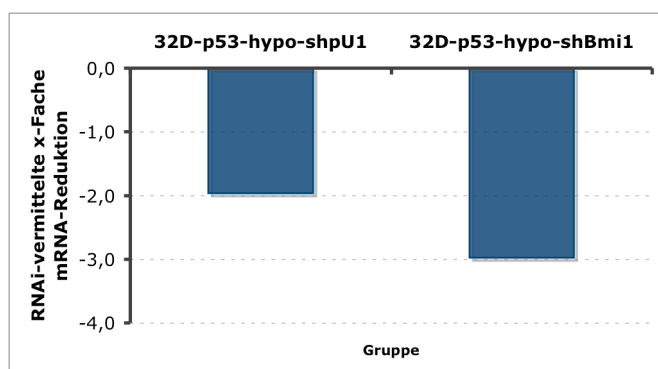


Abbildung 24 RNAi-vermittelte Reduktion in R780S-shPU.1 und -Bmi-1 transduzierten und sortierten 32D-p53-hypo-Zellen, LEF-1 konnte nicht detektiert werden

3.6.5 Evaluation der Transformationsstärke von β -GMR-I374N unter RNAi-vermittelter Reduktion von p53, PU.1, LEF-1 oder Bmi-1 in 32D-Zellen

Zur Untersuchung möglicher kooperierender Effekte wurden in 32D-Zellen β GMR-I374N simultan mit p53-, PU.1-, LEF-1-, oder Bmi-1-shRNAs exprimiert und im Zellkulturtest evaluiert. Die Transformationsstärken von β GMR-I374N mit p53-, LEF-1-, oder Bmi-1-shRNAs lagen zwischen 2% und 9%, wobei keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontroll-shRNA (shctrl.)-Bedingung festgestellt wurden. Im Gegensatz dazu überlebten keine Klone bei der Kombination von β -GMR-I374N mit der PU.1-shRNA (**Abbildung 25**). Die Zellen in jeder Bedingung wurden bei gleicher MOI transduziert sowie GFP-positive Zellen sortiert. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der sortierten Gesamt-Zellpopulationen variierten zwischen 61 und 87 nur geringfügig.

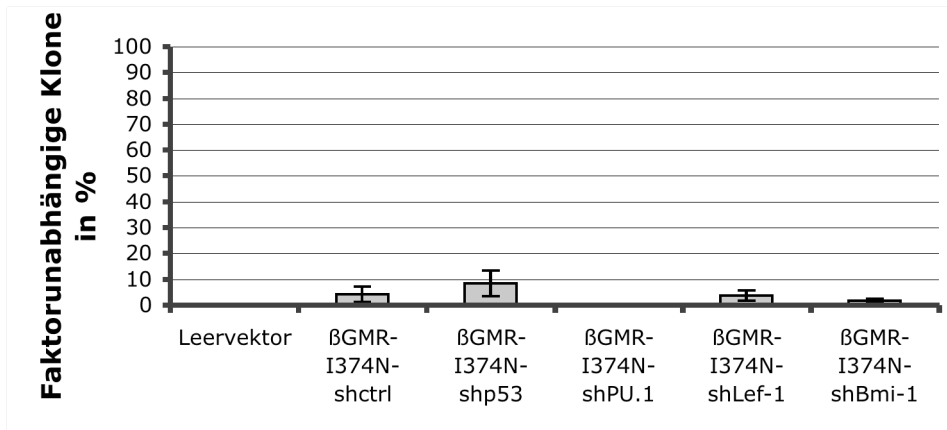


Abbildung 25 Transformationseffizienz von βGMR-I374N in Kombination mit RNAi-vermittelter Reduktion von p53, PU.1, LEF-1 oder Bmi-1 in 32D-Zellen. Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens 3 Experimenten.

Die mRNA-Konzentrationen der Zielgene waren im Mittel -1,9-fach für p53, -3,3-fach für PU.1 und -9,9-fach für Bmi-1 im Vergleich zu βGMR-I374N-Kontroll-shRNA reduziert (Abbildung 26).

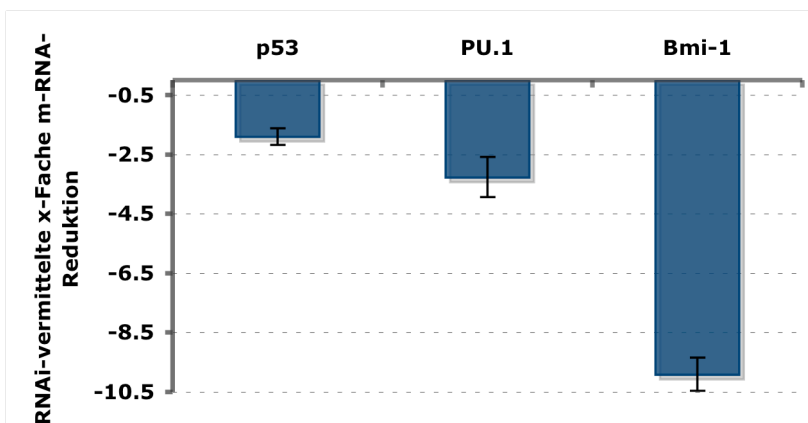


Abbildung 26 RNAi-vermittelte mRNA-Reduktion in βGMR-I374N sowie einer shRNA exprimierenden, sortierten 32D-Zellen. *Knock down* gezeigt als x-Fache Reduktion im Vergleich zu βGMR-I374N-shctrl durch qRT-PCR. GAPDH-mRNA diente als Referenzgen. Kalkulationen erfolgten mittels $\Delta\Delta Ct$ -Methode. Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens 2 Experimenten.

3.6.6 Evaluation der Transformationsstärke von βGMR-I374N unter RNAi-vermittelter Reduktion von PU.1, LEF-1 oder Bmi-1 in 32D-p53-hypo-Zellen

Zur Untersuchung dreier genetischer Defekte wurden 32D-hypo-p53-Zellen mit βGMR-I374N-shctrl, βGMR-I374N-shPU.1, βGMR-I374N-shLEF.1 oder βGMR-I374N-shBmi-1 retroviralen Überständen bei gleicher MOI transduziert und GFP-positive Zellen sortiert, um

Transformationsstärken im Zellkultursystem zu testen. Die Transformationsstärken lagen zwischen 7% und 10%, wobei 0-2% faktorunabhängige Klone auch durch Expression von β GMR-I374N-shPU.1 erzielt werden konnte (**Abbildung 27**).

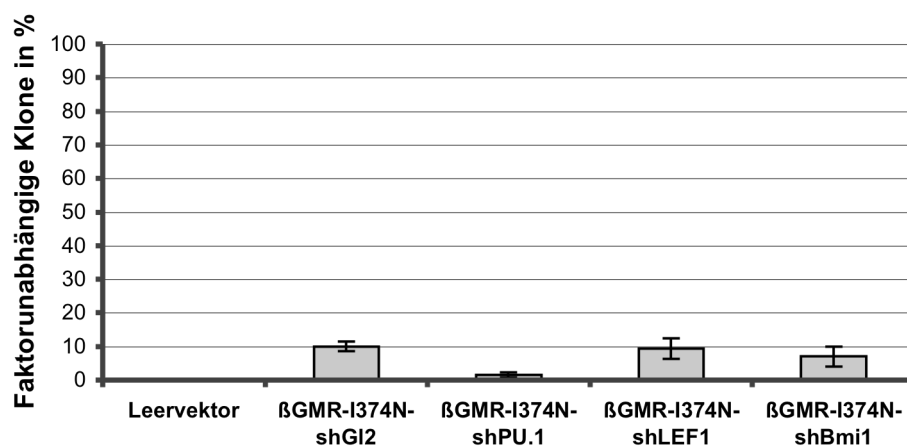


Abbildung 27 Transformationseffizienz von β GMR-I374N in Kombination mit RNAi-vermittelter Reduktion von PU.1, LEF-1 oder Bmi-1 in 32D-p53-hypo-Zellen. Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Experimenten.

Die mRNA-Konzentrationen der Zielgene waren im Vergleich zur β GMR-I374N-Kontroll-shRNA im Mittel $-2,2$ -fach für PU.1 und $-2,5$ -fach für Bmi-1 reduziert (**Abbildung 28**).

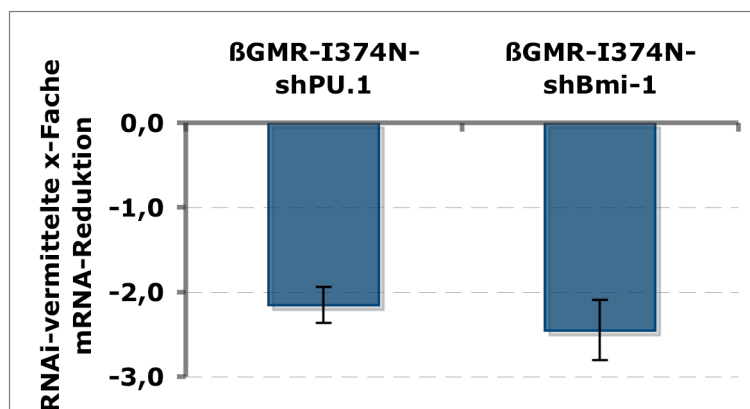


Abbildung 28 RNAi-vermittelte mRNA-Reduktion in β GMR-I374N sowie shRNA exprimierende, sortierte 32D-p53-hypo-Zellen. *Knock down* gezeigt als x-Fache Reduktion im Vergleich zu β GMR-I374N-shctrl durch qRT-PCR. Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Experimenten.

3.6.7 Evaluation der Transformationsstärke von c-KitV558D unter RNAi-vermittelter Reduktion von p53, PU.1, LEF-1 oder Bmi-1 in 32D-Zellen

Die Kombination von c-KitV558D mit p53-, Lef-1-, oder Bmi-1-shRNAs zeigte mit 67-74% transformierten 32D-Klonen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontroll-

shRNA (shctrl.)-Bedingung. Im Gegensatz dazu fiel die Transformationsstärke um ca. 35% signifikant ab, wenn c-KitV558D mit der PU.1-shRNA kombiniert wurde (**Abbildung 29**).

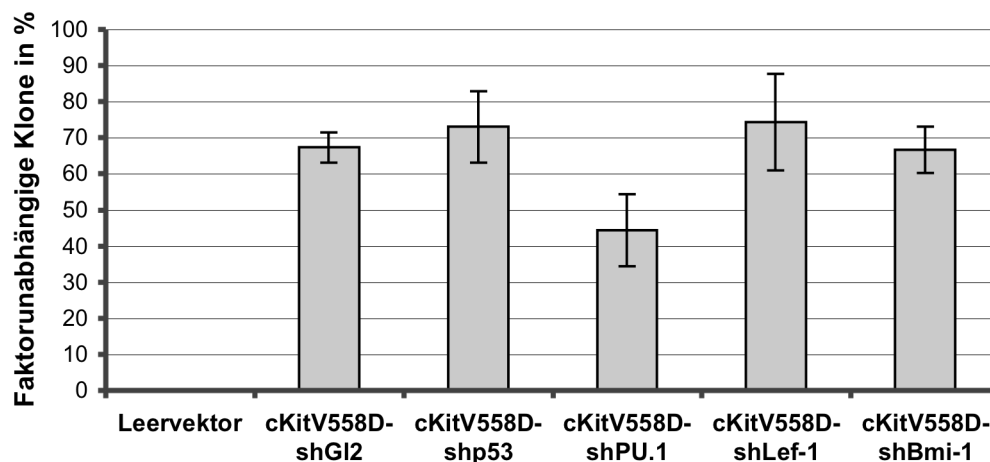


Abbildung 29 Transformationseffizienz von c-KitV558D in Kombination mit RNAi-vermittelter Reduktion von p53, PU.1, LEF-1 oder Bmi-1 in 32D-Zellen. Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens 3 Experimenten.

Die mRNA-Konzentrationen der Zielgene waren im Vergleich zur c-KitV558D-Kontroll-shRNA im Mittel $-2,5$ -fach für p53, $-3,9$ -fach für PU.1 und $-2,1$ -fach für Bmi-1 reduziert (**Abbildung 30**).

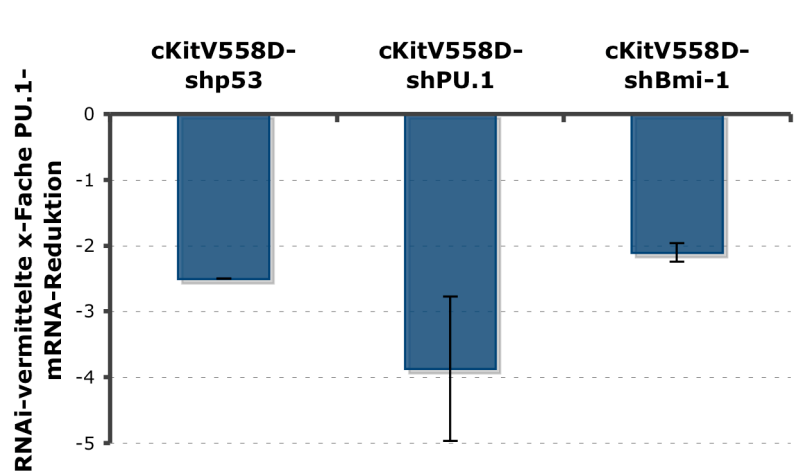


Abbildung 30 RNAi- vermittelte mRNA-Reduktion in c-KitV558D sowie shRNA exprimierenden, sortierten 32D-Zellen. *Knock down* gezeigt als x-Fache Reduktion im Vergleich zu c-KitV558D-shctrl durch qRT-PCR. Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens 3 Experimenten.

3.6.8 Evaluation der Transformationsstärke von c-KitV558D unter RNAi-vermittelter Reduktion von PU.1, LEF-1 oder Bmi-1 in 32D-p53-hypo-Zellen

Die 32D-p53-hypo wurden durch c-KitV558D-Kotroll-shRNA, c-KitV558D-shPU.1, -shLEF-1 sowie shBmi-1 im Schnitt mit 41, 62, 44 sowie 66% Effizienz im Zellkulturtest transformiert, wobei die Unterschiede untereinander nicht signifikant waren. Dabei zeigte c-KitV558D-shPU.1 die Tendenz 32D-p53-hypo-Zellen stärker zu transformieren als mit c-KitV558D-shctrl (**Abbildung 31**).

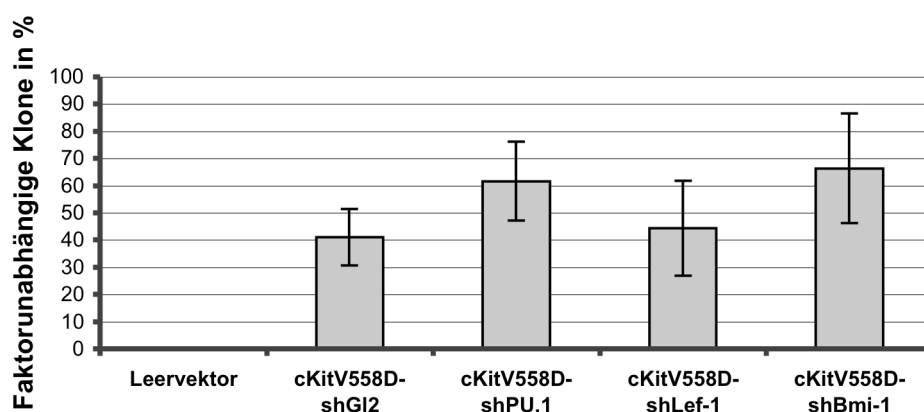


Abbildung 31 Transformationseffizienz von c-KitV558D in Kombination mit RNAi-vermittelter Reduktion von PU.1, LEF-1 oder Bmi-1 in 32D-p53-hypo-Zellen. Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens 3 Experimenten..

Die PU.1-bzw. Bmi-1-mRNA-Konzentrationen waren im Vergleich zur c-KitV558D-Kontroll-shRNA transduzierten 32D-p53-hypo im Mittel $-2,5$ -fach für PU.1 bzw. $-3,5$ -fach für Bmi-1 reduziert (**Abbildung 32**).

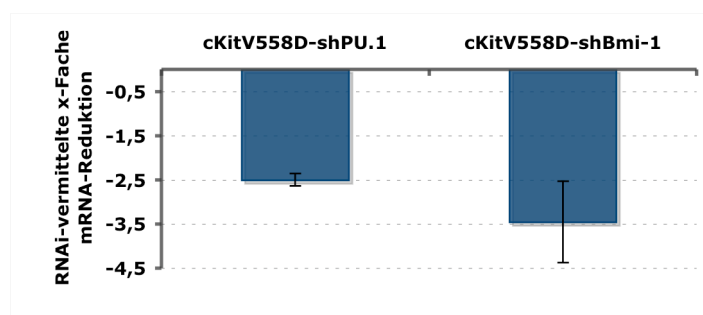


Abbildung 32 RNAi-vermittelte mRNA-Reduktion in c-KitV558D sowie shRNA exprimierenden, sortierten 32D-p53-hypo-Zellen. *Knock down* gezeigt als x-Fache Reduktion im Vergleich zu c-KitV558D-shctrl durch qRT-PCR. Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens 3 Experimenten.

Während die Transformationsstärken von β GMR-I374N sowie c-KitV558D unter RNAi-vermitteltem *knock-down* von p53, PU.1, LEF-1 oder Bmi-1 in 32D und 32D-p53-hypo-

Zellen evaluiert wurden, konnten keine Veränderungen durch Kombination mit p53, -LEF-1 und Bmi-1-shRNAs beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte in der 32D-Zelllinie eine Reduzierung der Transformationsstärke erzielt werden, wenn c-KitV558D unter PU.1-*knock-down* exprimiert wurde, dagegen überlebten keine 32D-Zellklone durch Expression von β GMR-I374N unter PU.1 *knock-down*. Überraschenderweise konnte unter PU.1-*knock-down* in der 32D-p53-hypo Zelllinie ein positiver Effekt beobachtet werden, wenn c-KitV558D exprimiert wurde. Die Expression von β GMR-I374N in 32D-p53-hypo unter PU.1 *knock-down* führte, wenn auch nicht immer, zu transformierten Klonen. Daher wurden in den folgenden Experimenten der Einfluss von PU.1-*knock-down* auf die Transformationsstärke von β GMR-I374N, c-KitV558D und zusätzlich mplS368C in 32D sowie 32D-p53-hypo in Parallel-Experimenten näher untersucht.

3.6.9 Transformationsstärken onkogener Zytokinrezeptoren unter Expression einer PU.1-spezifischen shRNA in 32D-Zellen

Zum parallelen Einsatz der onkogenen Zytokinrezeptoren unter PU.1-*knock-down* wurden retrovirale Überstände vom β GMR-I374N-shctrl, β GMR-I374N-shPU.1, c-KitV558D-shctrl, c-KitV558D-shPU.1, mplS368C-shctrl, mplS368C-shPU.1 hergestellt um im etablierten Zellkulturassays kooperierende Effekte in 32D-Zellen zu analysieren. Dafür wurden 32D-Zellen mit retroviralen Überständen mit einer MOI von 0,5 bis 1,5 transduziert (Abbildung 25). Die Transduktionseffizienzen vor dem Sortieren lagen für β GMR-I374N-shctrl bzw. β GMR-I374N-shPU.1 bei $47\% \pm 12$ bzw. $37\% \pm 11$ und für c-KitV558D-shctrl bei $70\% \pm 18$ bzw. für c-KitV558D-shPU.1 bei $72\% \pm 16$ sowie für mplS368C-shctrl bei $75\% \pm 11$ bzw. für mplS368C-shPU.1 bei $64\% \pm 12$. Der prozentuale Anteil GPF/RFP-doppelt-positiver Zellen lag nach dem Sortieren bei nahezu 100% (**Abbildung 33**).

Die Expression von β GMR-I374N-shcontrol in 32D Zellen ergab 2% faktorunabhängige Klone relativ zur Kontrollplatte. Dagegen überlebten bei der Kombination von β GMR-I374N mit der PU.1-shRNA keine Zellen unter IL-3 Entzug, wobei unter IL-3 (Kontrollplatte) die Anzahl der Klone zwischen β GMR-I374N-shctrl und -shPU.1 sich nicht signifikant unterschieden (Daten nicht gezeigt). Die Transformationsstärken – nach Normalisierung durch die Viruskopienzahlen – der c-KitV558D-shctrl und mplS368C-shctrl waren mindestens 30-fach stärker als β GMR-I374N-shctrl, wobei diese untereinander gleich stark transformierend wirkten.

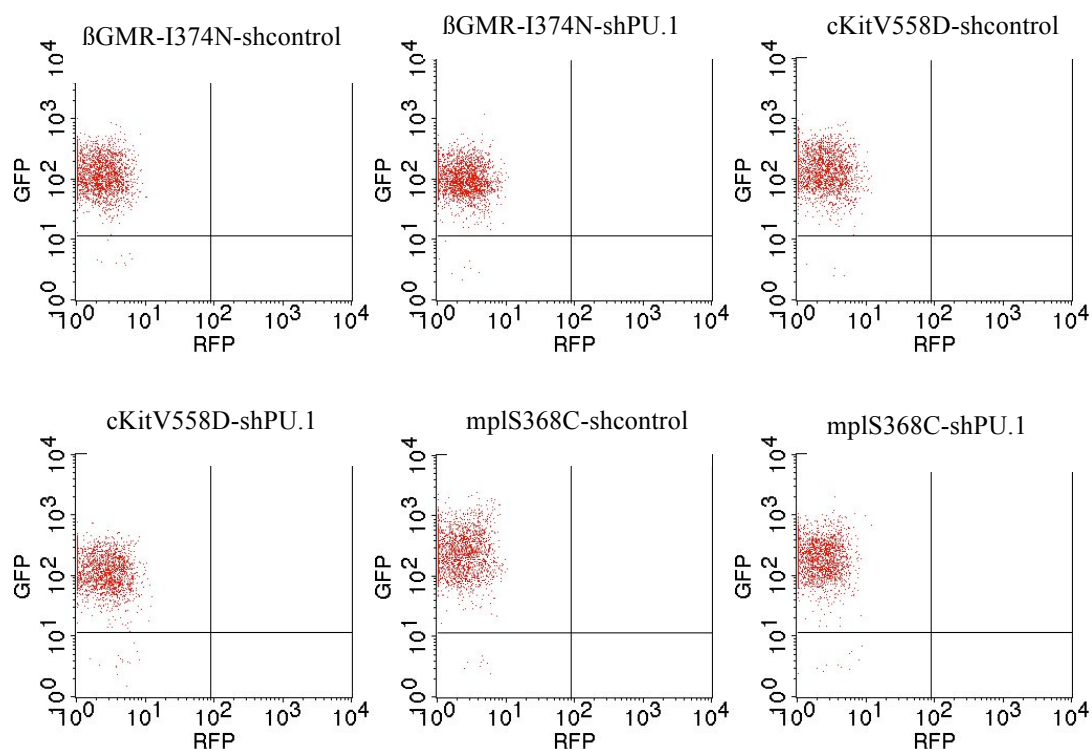


Abbildung 33 FACS-Messungen von GFP-positiven und sortierten 32D-Zellen eines repräsentativen Experiments. Zellen exprimieren ein onkogenen Zytokinrezeptor und eine PU.1-shRNA.

Die gleichzeitige Expression der c-Kit- bzw. der mpl-Mutante mit der PU.1-shRNA zeigte einen signifikanten Abfall ($p < 0,004$ bzw. $p < 0,027$) von 72% auf 43% bzw. von 71% auf 50% bei der Transformation von 32D im Vergleich zur Kontroll-shRNA (shctrl) (**Abbildung 34, Tabelle 2**).

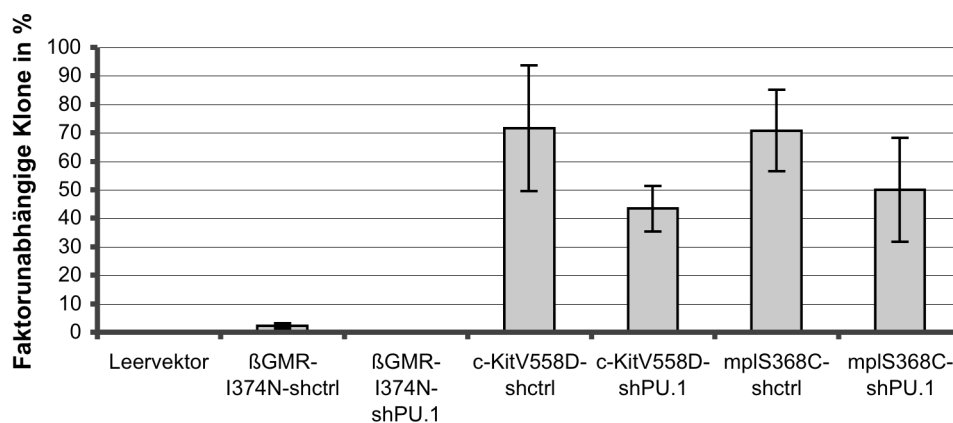


Abbildung 34 Transformationsstärken von onkogenen Zytokinrezeptoren in Kombination mit einer PU.1-shRNA in 32D-Zellen. Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens 4 Experimenten.

	Mittl. Transformationsstärke in % faktorunabhg. Klone	Mittlere Viruskopienzahl	Mittlere x-Fache PU.1- mRNA <i>knock down</i> -Rate
Leervektor	/	/	/
βGMR-I374N-shctrl	2	2	/
βGMR-I374N-shPU.1	0	/	-2,9
c-KitV558D-shctrl	72	2,1	/
c-KitV558D-shPU.1	43	1,4	-3,1
mplS368C-shctrl	71	2,8	/
mplS368C-shPU.1	50	1,8	-2,8

Tabelle 2 Ergebnisse zweier genetischer Aberrationen in wildtyp 32D-Zellen.

Die mittlere Viruskopienzahl der transformierten βGMR-I374N-shctrl-Klone lagen bei 2, c-KitV558D-shctrl-Klone bei 2,1, c-KitV558D-shPU.1-Klone bei 1,4 und in mplS368C-shctrl-Klone bei 2,8 bzw. 1,8 in mplS368C-shPU.1-Klonen (**Abbildung 35, Tabelle 2**). Die signifikante ($p < 0,003$) Differenz von 0,7 zwischen c-KitV558D-shctrl und -shPU.1 deutete auf eine Selektion von c-KitV558D-shPU.1-Klonen mit einer Viruskopie hin, wobei die gleiche Tendenz mit der mpl-Mutante beobachtet wurde.

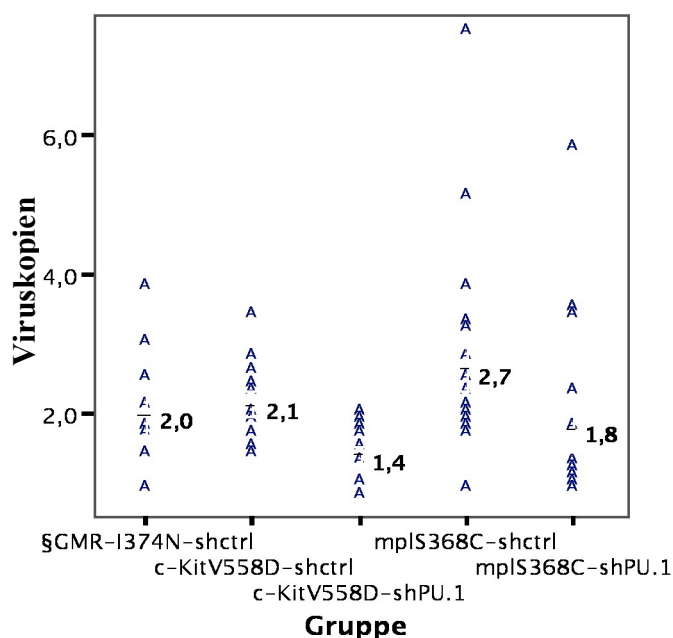


Abbildung 35 Viruskopienzahl pro Zellklon (Mittelwerte als waagerechte Linie gezeigt) von 2-4 Experimenten pro Gruppe, ermittelt durch qRT-PCR auf das WPRE-Gen.

In den sortierten GFP-positiven β GMR-I374N-, c-KitV558D-, und mplS368C-PU.1-shRNA exprimierenden Zellen waren die PU.1-mRNA-Konzentrationen im Mittel $-2,9$ -, $-3,1$ - und $-2,8$ -fach im Vergleich zu Kontroll-shRNA Bedingung reduziert (**Abbildung 36, Tabelle 2**).

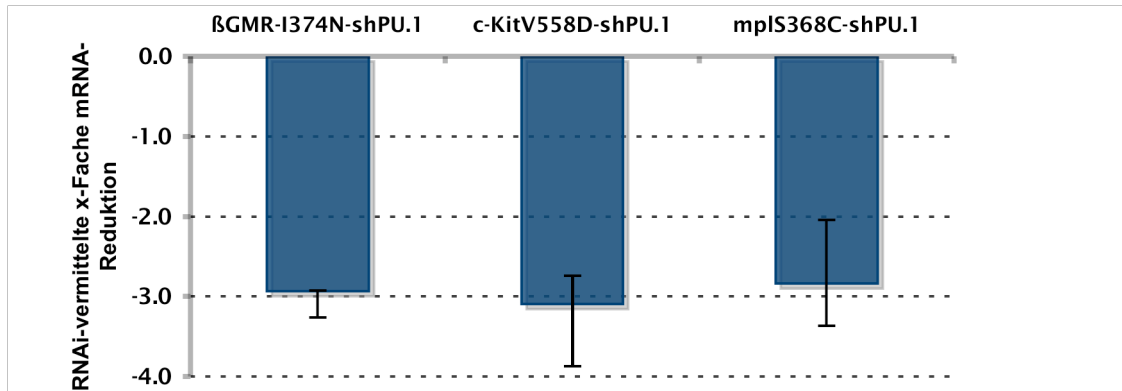


Abbildung 36 RNAi- vermittelte mRNA-Reduktion in onkogene Zytokinrezeptoren sowie PU.1-shRNA exprimierenden, sortierten 32D-Zellen. *Knock down* gezeigt als x-Fache Reduktion im Vergleich zu Kontroll-shRNA durch qRT-PCR. Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens 3 Experimenten.

3.6.10 Transformationsstärken onkogener Zytokinrezeptoren mit einer PU.1-spezifischen shRNA in 32D-p53-hypo-Zellen

Zur Analyse dreier kooperierender genetischer Defekte bei der Transformation von 32D-Zellen im Zellkulturtest wurden onkogene Zytokinrezeptoren und eine PU.1-shRNA in p53-defekte 32D-hypo-p53-Zellen transduziert. Die Transduktionseffizienzen vor dem Sortieren lagen für β GMR-I374N-shctrl bzw. β GMR-I374N-shPU.1 bei $36\% \pm 9$ bzw. $25\% \pm 5$ für c-KitV558D-shctrl bei $70\% \pm 17$ und für c-KitV558D-shPU.1 bei $71\% \pm 12$ sowie für mplS368C-shctrl bei $69\% \pm 7$ bzw. für mplS368C-shPU.1 bei $64\% \pm 9$. Der prozentuale Anteil GFP/RFP-doppelt-positiver Zellen lag nach dem Sortieren nahezu bei 100% (**Abbildung 37**).

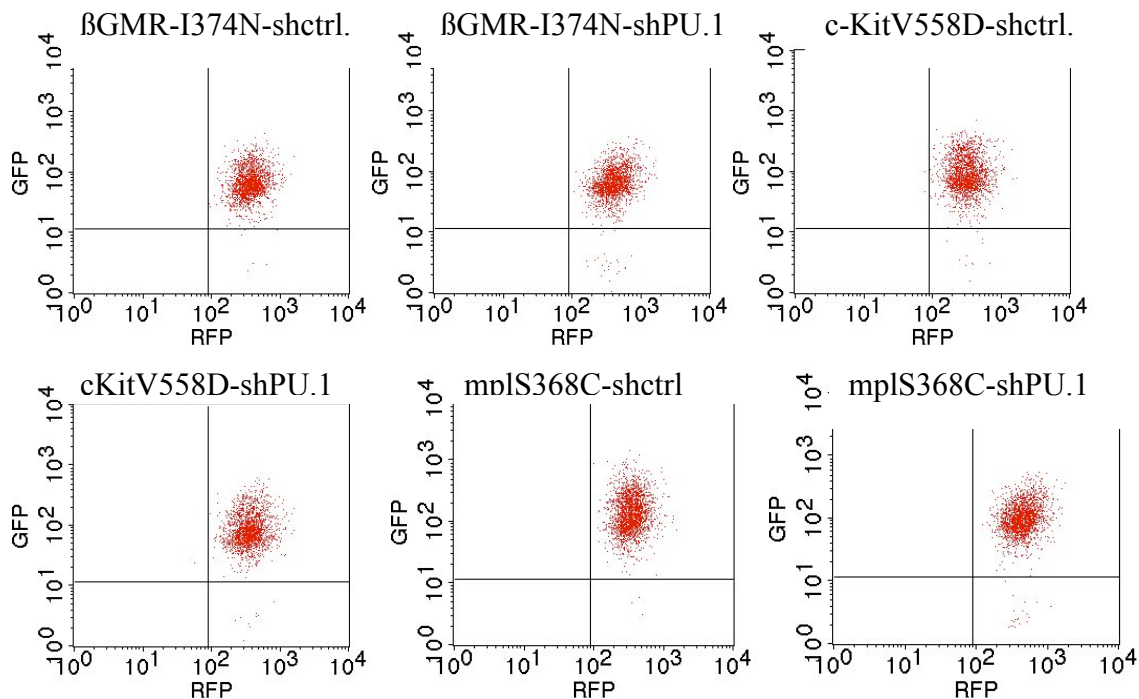


Abbildung 37 FACS-Messungen von GFP/RFP-doppelt-positiven und sortierten 32D-p53-hypo-Zellen eines repräsentativen Experiments. Zellen exprimieren ein onkogenen Zytokinrezeptor und eine PU.1-shRNA.

Die Transformationsstärke von β GMR-I374N-shcontrol in 32D-p53-hypo-Zellen betrug im Schnitt 5%, dies war mehr als doppelt so hoch als in 32D ohne p53 *knock down*, wobei der Unterschied wegen hohen Schwankungen zwischen den Experimenten nicht signifikant war. Die zusätzliche Reduktion von PU.1 führte wieder dazu, dass entweder keine Klone überlebten oder nur bis zu 2% der Klone überlebten (**Abbildung 38, Tabelle 3**).

Im Gegensatz dazu lieferte die c-KitV558D-shctrl Expression in 32D-p53-hypo im Mittel eine Transformationsstärke von 43 % (**Abbildung 38, Tabelle 3**). Im Gegensatz zu c-KitV558D-shctrl in wildtyp 32D-Zellen überleben unter p53-*knock down* signifikant weniger Klone (72 % in wildtyp 32D, $p=0,008$, **vergleiche Abbildung 34, Tabelle 2**). Dabei erhöhte c-KitV558D unter PU.1-*knock down* signifikant ($p < 0,02$) die Transformationsstärke im Mittel auf 61 % in 32D-p53-hypo-Zellen (**Abbildung 38, Tabelle 3**). Die Transformationsstärken von mplS368C-shctrl und -shPU.1 lagen im Mittel bei 59% bzw. 52% ohne signifikante Unterschiede aufzuweisen (**Abbildung 38, siehe auch Tabelle 3**).

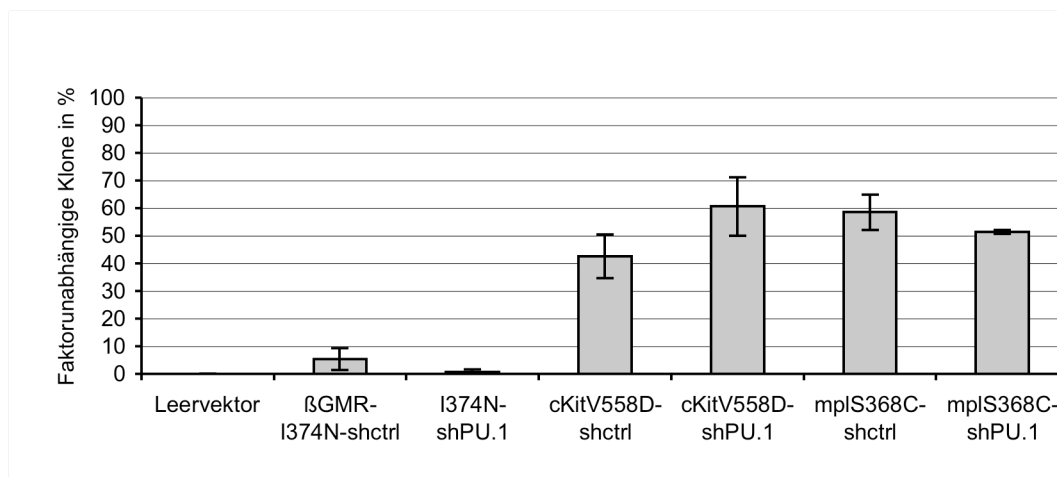


Abbildung 38 Transformationsstärken von onkogenen Zytokinrezeptoren in Kombination mit PU.1-shRNA in 32D-p53-hypo-Zellen. Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens 4 Experimenten.

Die mittleren Viruskopienzahlen lagen für βGMR-I374N-shctrl bei 2, für c-KitV558D-shctrl bei 2,1, für c-KitV558D-shPU.1 bei 1,5 und für mplS368C-shctrl sowie –shPU.1 bei 1,7 bzw. 1,9 (**Abbildung 39, Tabelle 3**).

	Transformationsstärke in % faktorunabhg. Klone	Mittlere Viruskopienzahl	Mittlere x-Fache PU.1-mRNA <i>knock down</i> -Rate
Leervektor	/	/	/
βGMR-I374N-shctrl	5	2	/
βGMR-I374N-shPU.1	0-2	n.a.	-2,1
c-KitV558D-shctrl	43	2,1	/
c-KitV558D-shPU.1	61	1,5	-2,6
mplS368C-shctrl	59	1,7	/
mplS368C-shPU.1	52	1,9	-2,6

Tabelle 3 Ergebnisse dreier genetischer Aberrationen in rekombinanten 32D-p53-hypo-Zellen. Zweiseitiger *Student-t-test* zwischen c-KitV558D-shctrl und –shPU.1 beträgt $p < 0,02$.

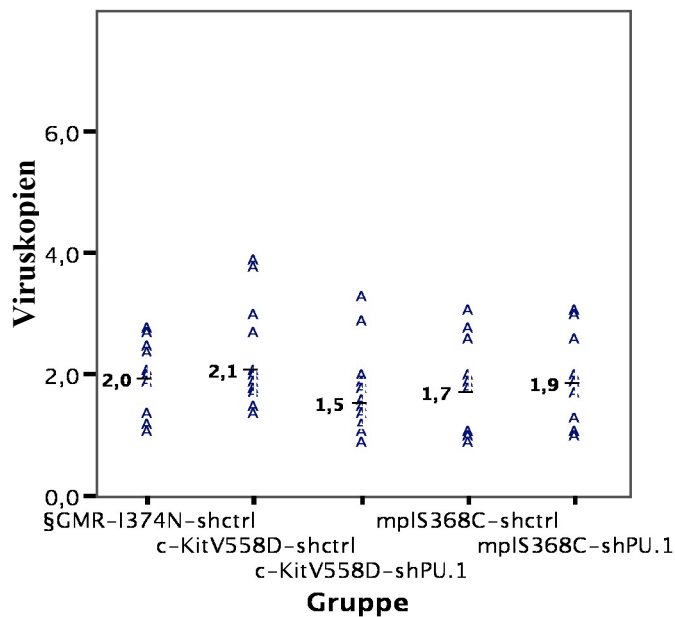


Abbildung 39 WPRE-Gen-Kopienzahl pro Zellklon (Mittelwerte als waagerechte Linie gezeigt) von 2-4 Experimenten pro Gruppe, ermittelt durch qRT-PCR.

In den sortierten GFP-positiven βGMR-I374N-, c-KitV558D-, und mplS368C-PU.1-shRNA exprimierenden Zellen waren die PU.1-mRNA-Level im Mittel –2,1-, –2,6- und –2,6-fach im Vergleich zu Kontroll-shRNA Bedingung reduziert (**Abbildung 40, Tabelle 3**).

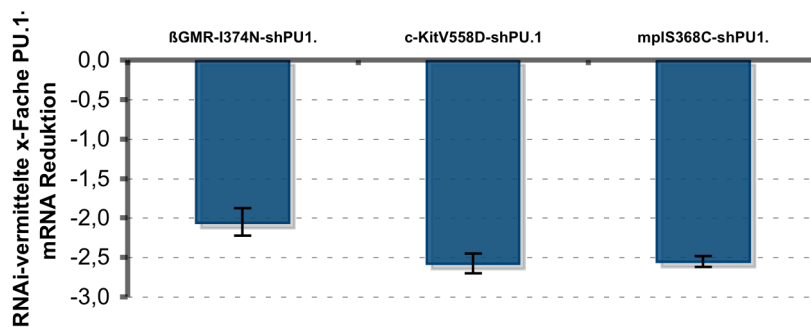


Abbildung 40 RNAi-vermittelter PU.1-mRNA *knock down* in sortierten 32D-hypo-p53 Zellen mit onkogenen Zytokinrezeptoren und einer PU.1-shRNA, ermittelt durch qRT-PCR. Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

3.7 Herstellung transformierter polyklonaler 32D-Zellen durch β GMR-I374N und c-KitV558D

Zur Herstellung von β GMR-I374N und c-KitV559D exprimierender polyklonaler Zellpopulationen wurden wildtyp 32D-Zellen mit einer MOI von 1,5 retroviral transduziert und für 3 Tage in WehiCM kultiviert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen solange in Medium ohne Faktor kultiviert bis sich die Zellpopulation stabilisierte. Die β GMR-I374N und c-KitV559D-Zellpopulationen wiesen unterschiedlich starke GFP-Expression (=Onkogenexpression) auf.

3.8 Lentiviral vermittelter PU.1-mRNA *knock down* setzt die Proliferation von 32D und 32D-cKitV559A stark herunter und führt 32D- β GMR-I374N –exprimierende Zellen zum Zelltod.

Zur Ermittlung der Proliferationsrate von wildtyp 32D und rekombinanten 32D- β GMR-I374N sowie 32D-c-KitV559A (Humane c-Kit-Mutante von c-KitV558D) Zellpopulationen unter PU.1-mRNA Reduktion wurden diese durch PU.1- und Kontroll-shRNA-kodierende Vektoren [dcH1-shPU.1-SR bzw. dcH1-shctrl-SR (kodiert auch RFP_{EXPRESS})] lentiviral transduziert. Die RFP positiven Zellen wurden am Tag 3 sortiert und im Proliferationstest untersucht. Folgende Bedingungen wurden angesetzt (**Tabelle 4**):

	Medium ohne Faktor	WEHICM
Wildtyp 32D	/	X
32D-shctrl	/	X
32D-shPU.1	/	X
32D- β GMR-I374N	X	/
32D- β GMR-I374N-shctrl	X	/
32D- β GMR-I374N-shPU.1	X	/
32D-c-KitV559A	X	/
32D-c-KitV559A-shctrl	X	/
32D-c-KitV559A-shPU.1	X	/

Tabelle 4 Wildtyp und rekombinante Zellpopulationen im Proliferationstest. Pro Bedingung wurden 2×10^4 Zellen eingesetzt (X= Verwendetes Medium).

Durch lentiviral-vermittelte RNAi waren PU.1-mRNA-Levels auf 16% in 32D-shPU.1, auf 38% in 32D-βGMR-I374N-shPU.1 sowie auf 12% in 32D-c-KitV559A-shPU.1 Zellpopulationen reduziert (**Abbildung 41**).

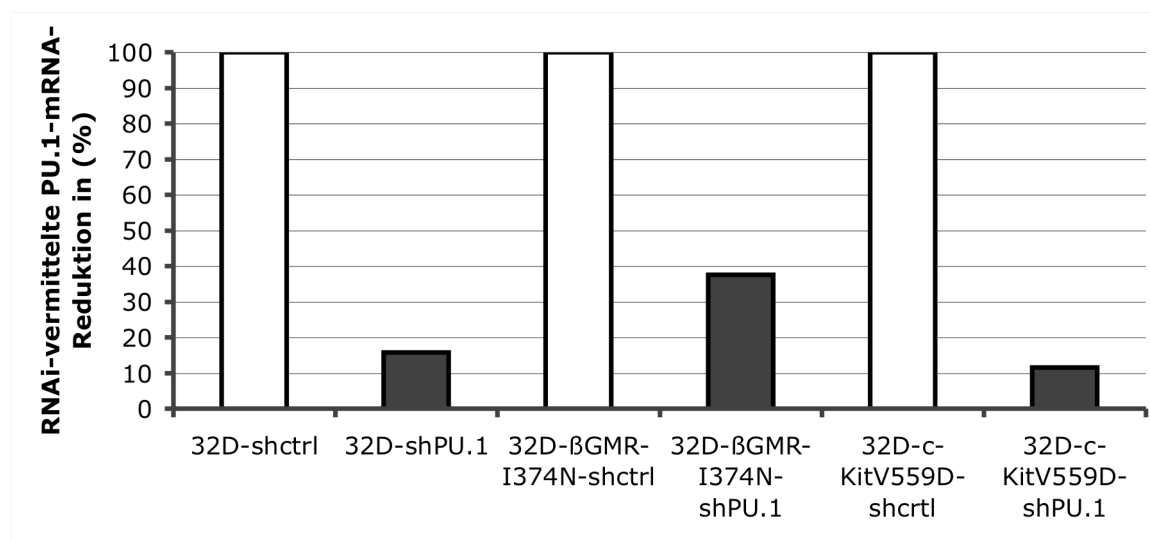
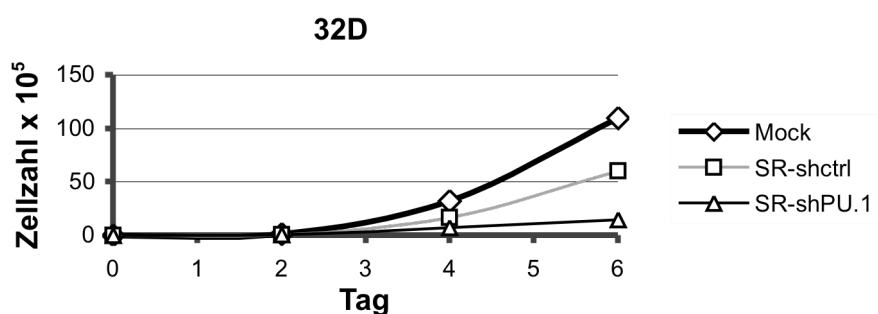


Abbildung 41 Reduktion der PU.1-mRNA durch lentiviral-vermittelte RNAi in 32D-shPU.1, 32D-βGMR-I374N-shPU.1 und 32D-c-KitV559D-shPU.1 relativ zur Kontroll-shRNA-Bedingung (shctrl) bestimmt durch qRT-PCR, GAPDH diente als Referenzgen.

Die anfängliche Teilungsrate von 32D-shPU.1 Zellen waren am Tag 6 viermal langsamer als 32D-shctrl Zellen. Während sich 32D-βGMR-I374N und 32D-βGMR-I374N-shctrl 4 mal langsamer teilten als 32D-shctrl, starben 32D-I374N-shPU.1 Zellen nach 4 Tagen. Wobei 32D-c-KitV559A und 32D-c-KitV559A-shctrl ungefähr gleich proliferierten, stagnierte dagegen die Proliferation von 32D-c-KitV559D-shPU.1 Zellen am Tag 4 bis 6 als ein Effekt des PU.1-*knock downs* (**Abbildung 42**).



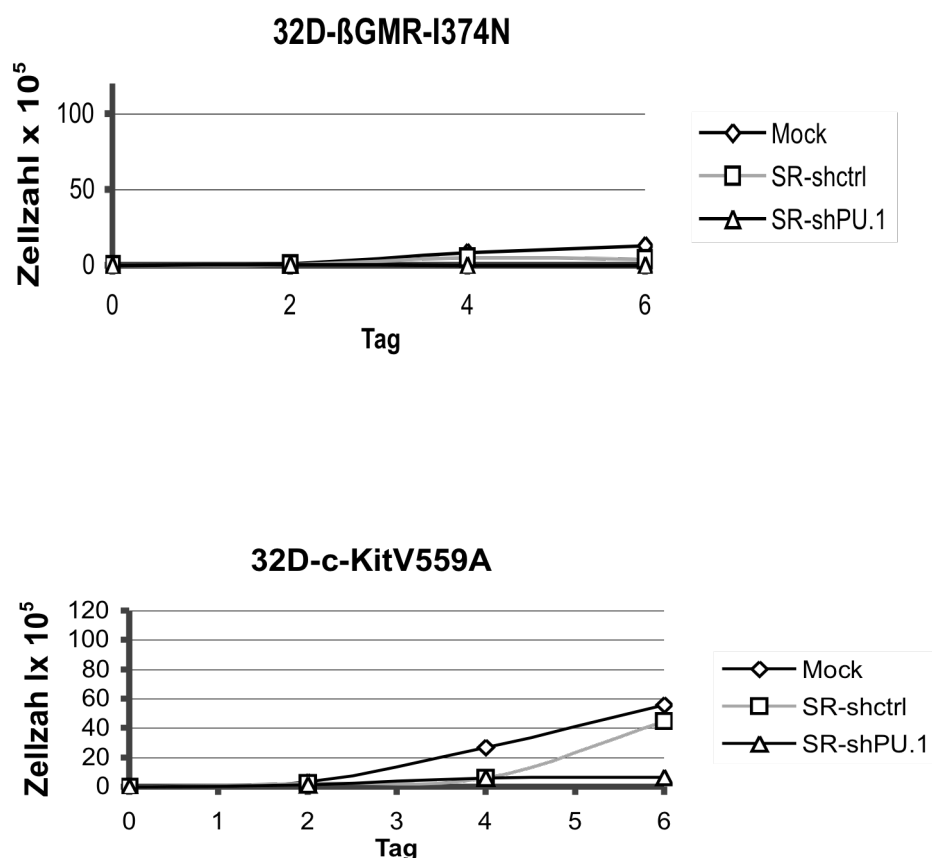


Abbildung 42 Proliferation von 32D, 32D-βGMR-I374N und 32D-c-KitV559A nach lentiviral-vermittelter PU.1-mRNA *knock down*. Es wurden 2×10^4 Zellen mit WehiCM (32D) und ohne Faktor eingesetzt (siehe Tabelle 4).

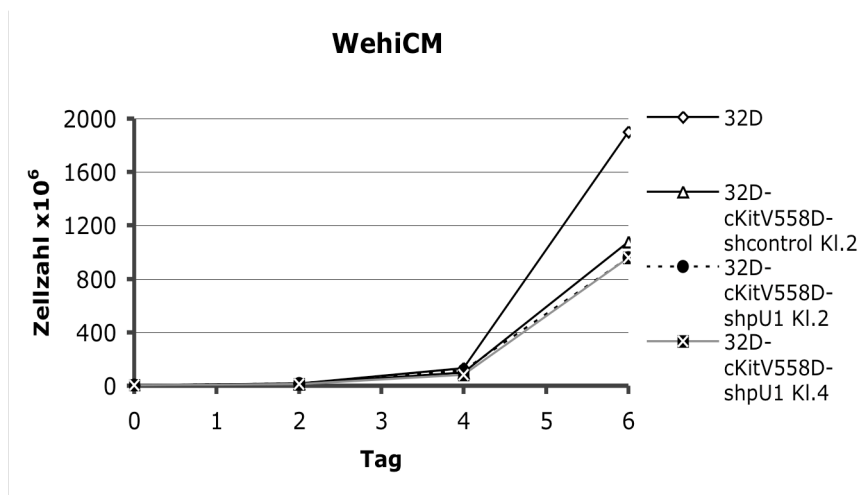
3.9 Proliferation von 32D sowie 32D-c-KitV558D-shctrl und 32D-c-KitV558D-shPU.1-Klone

Da c-KitV558D exprimierende 32D Zellen auch unter PU.1 *knock down* überlebten, haben wir uns gefragt, ob sich auch Unterschiede in einem Proliferationassay zeigten. Zusätzlich wurden c-KitV558D, c-KitV558D-shcontrol und c-KitV558D-shPU.1 exprimierende Klone zur Blockierung der Tyrosinkinaseaktivität in Imatinib kultiviert, um festzustellen ob im nachhinein diese Klone Kit-unabhängig transformiert bleiben. Dafür wurden 32D sowie 32D-c-KitV558D-shcontrol und 32D-c-KitV558D-shPU.1 Klone unter folgenden Konditionen untersucht:

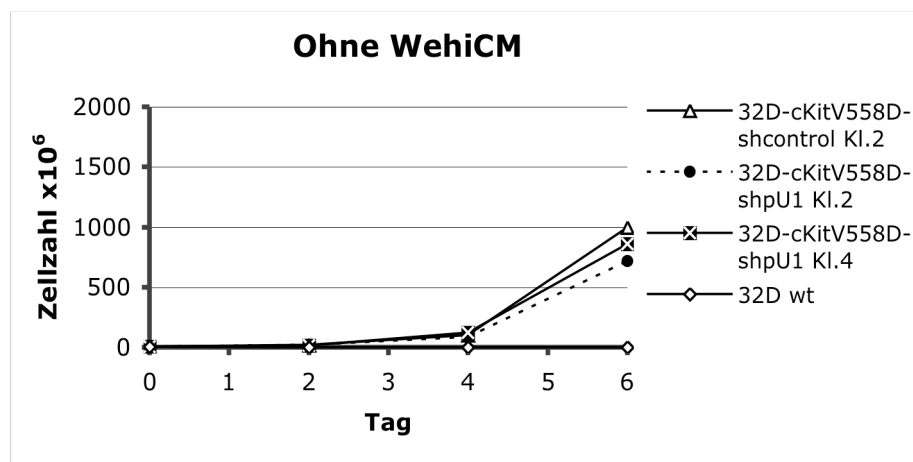
A) Ohne IL-3; B) WehiCM; C) WehiCM + 1μM Imatinib; D) Ohne IL-3 + 1μM Imatinib

Unter WehiCM proliferierten alle Zellen exponentiell (**Abbildung 43A**). Im Gegensatz dazu starben 32D ohne IL-3 innerhalb von 2 Tagen, wobei 32D-c-KitV558D-shctrl bzw. -shPU.1 exprimierende 32D Zellen in gleicherweise proliferierten (**Abbildung 43B**). Weiterhin gab es keine Unterschiede in der Proliferation zwischen den c-KitV558D-shctrl, -shPU.1 und wildtyp 32D Zellen, wenn diese unter Imatinib mit WehiCM gehalten wurden (**Abbildung 43C**, Ausser 32D-c-KitV558D-shPU.1 Klon 4 am Tag 6). Alle drei c-KitV558D-Klone starben innerhalb von 2 Tagen unter Imatinib ohne IL-3 (**Abbildung 43D**).

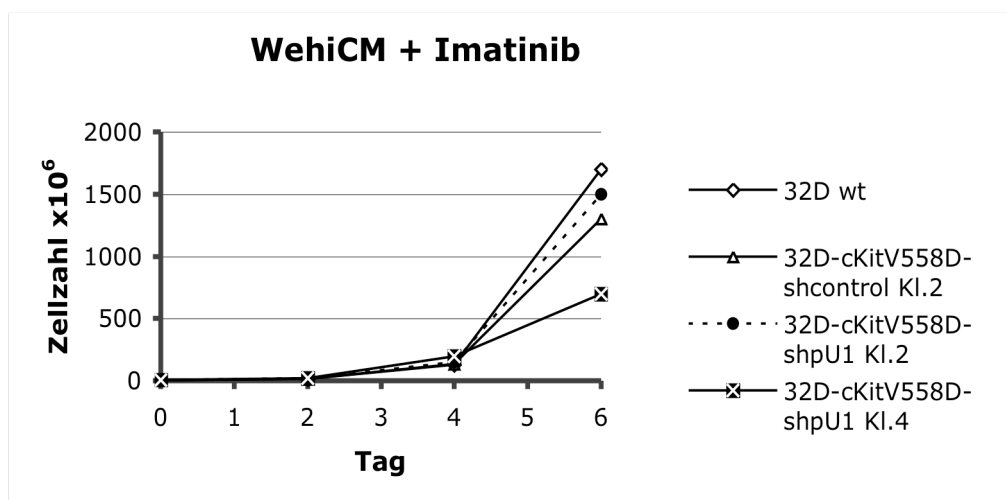
A



B



C



D

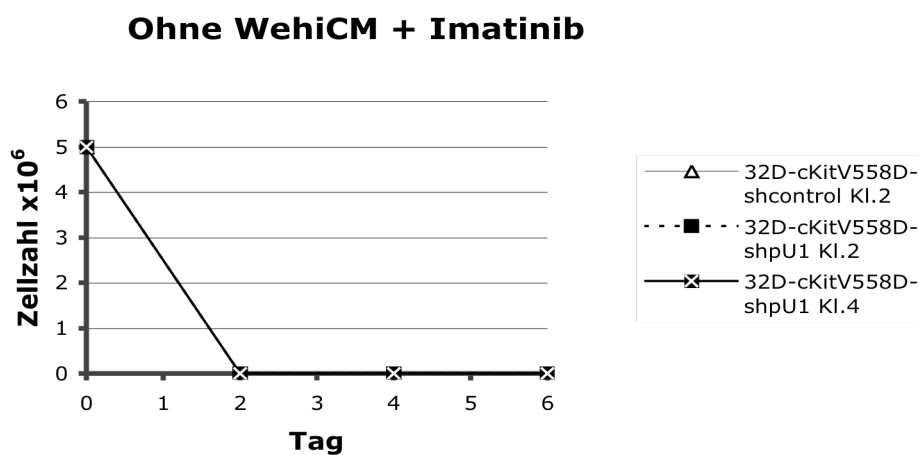


Abbildung 43 Poliferationstest mit 32D, 32D-c-KitV558D-shctrl sowie 32D-c-KitV558D-shPU.1 Klone. Zellen wurden bei einer Zellzahl von $5 \times 10^6/2\text{ml}$ RPMI + 10%FCS kultiviert. **A** WehiCM, **B** ohne WehiCM, **C** WehiCM + $1\mu\text{M}$ Imatinib, **D** ohne IL-3 + $1\mu\text{M}$ Imatinib.

Die PU.1-mRNA-Mengen waren in 32D-c-KitV558D-shPU.1 Klon 2 und 4 auf 15% bzw. 14% relativ zu 32D-c-KitV558D-shctrl Zellen reduziert (**Abbildung 44**).

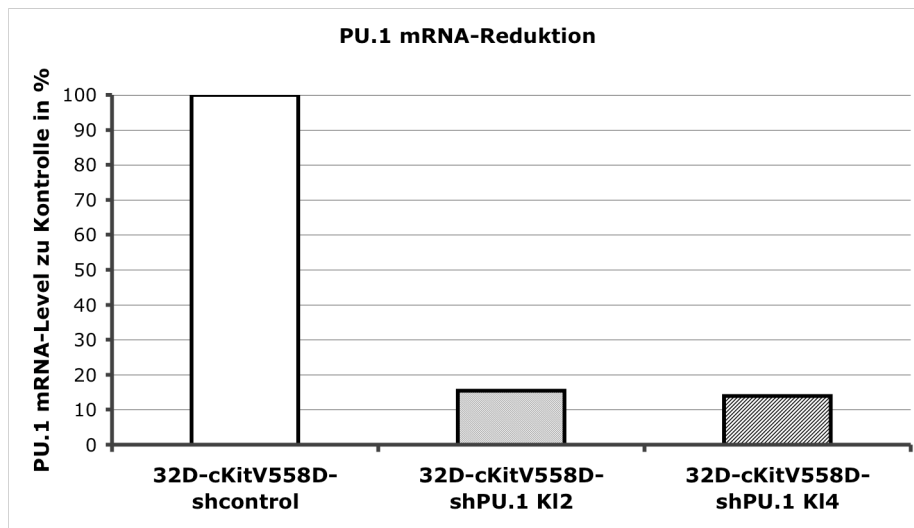


Abbildung 44 PU.1 mRNA-Konzentrationen in 32D-cKitV558D-PU.1 Klone im Vergleich zum 32D-cKitV558D-shcontrol Klon. Ermittelt durch qRT-PCR

3.10 Abhängigkeit der MFI von der Viruskopienzahl

Zur Normalisierung der Ergebnisse bei der Analyse der Transformationsstärken von onkogenen Zytokinrezeptoren untereinander sowie zur Untersuchung von PU.1-reduzierten β GMR-I374N, c-KitV558D und mplS368C Zellklonen wurden die Viruskopienzahlen durch qRT-PCR untersucht. Zusätzlich zur Viruskopienzahl in dem jeweiligen Klon wurde auch die MFI durch Fluoreszenz-Durchfluss-Zytometrie bestimmt. Eine lineare Abhängigkeit von zwei Faktoren kann durch die Pearson-Korrelation beschrieben werden. Es konnte eine starke lineare Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,8 zwischen der Viruskopienzahl und der MFI beobachtet werden (**Abbildung 45**).

Korrelation: -1 vollständige negative lineare Abhängigkeit; 0= Keine Abhängigkeit; 1 vollständige lineare Abhängigkeit.

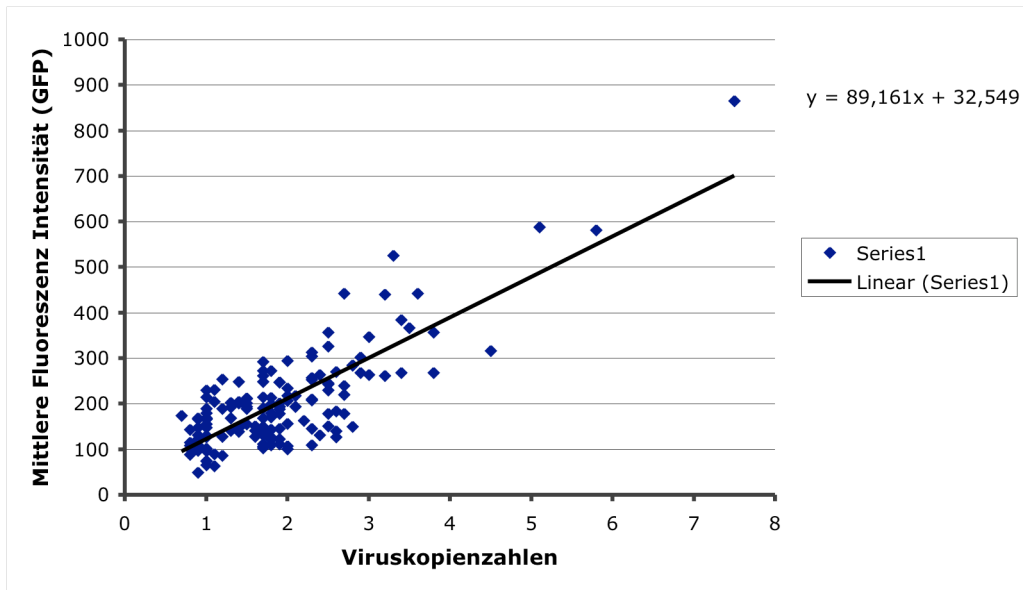


Abbildung 45 Abhängigkeit der MFI von der Viruskopienzahl in R780S-Onkogen-IRES-EGFP-shRNA transduzierten 32D-Zellklonen.

4 Diskussion

4.1 Zellkulturtest zur Identifizierung von kooperierenden genetischen Alterationen bei der Entstehung von Leukämien

Zytologische und molekulare Analysen der leukämischen Zellen von AML-Patienten mit der meist diagnostizierten Translokation t(8;21) (12% aller AML) wird das AML1-ETO Fusionsprotein in den leukämischen Zellen gefunden. Das AML1-ETO bewirkt ein Differenzierungsblock in hämatopoetischen Vorläuferzellen¹⁴⁸. Mausmodelle für AML zeigen, dass AML1-ETO oder PML/RAR α in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen allein nicht zur malignen Entartung ausreichen^{149,150}. In experimentellen *in vivo* Studien wurde gezeigt, dass konstitutive Expression von AML1-ETO in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen nur unter alkylierenden Agenzien Leukämien induzieren kann¹⁵¹. Auch bei konditioneller Expression von AML1-ETO in hämatopoetischen Vorläuferzellen konnte nur unter N-ethylnitrosourea (ENU) Behandlung eine AML oder ein T-Zell-Lymphom induziert werden¹⁵². In molekularen Analysen der leukämischen Zellen bei t(8;21) Patienten konnten Nakao et al., Schessl et al. sowie Antonescu et al. neben AML1-ETO auch sekundäre Mutationen in Zytokinrezeptor-Genen wie z.B in *flt-3*, *c-Kit* oder in ihren Signalproteinen wie im *Nras*-Gen gefunden werden^{35-37,153}. Sekundäre Mutationen werden wahrscheinlich bei der AML für eine autonome Proliferation von aberranten hämatopoetischen Zellen benötigt. Zusätzlich werden oft Tumorsuppressoren durch Mutationen inaktiviert, wodurch möglicherweise aktivierende Mutationen von Tumorkontrollmechanismen unentdeckt bleiben. Schessl et al. konnten durch Koexpression von AML1-ETO und Flt-3-ITD in HSZs eine akute Leukämie in der Maus induzieren, wobei AML1-ETO oder Flt-3-ITDs allein keine Leukämie induzierten¹⁴⁹.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines simplen Zellkultursystems zur funktionellen Analyse der Leukämogenese durch definierte, kooperierende genetische Aberrationen. Als Modell für die Transformation hämatopoetischer Zellen wurden Zytokinrezeptormutanten, die faktorabhängige hämatopoetische Zellen wie 32D transformieren, gewählt. In der Literatur wurden kooperierende Gendefekte durch zeitliche Transduktion zweier Onkogene im Proliferationstest untersucht. Das Originelle der vorliegenden Arbeit sind bifunktionale retrovirale Vektoren für die Erzeugung von *gain-of-function* und gleichzeitige RNAi-vermittelte *loss-of-function* durch Transduktion der Zelle mit einem Vektor. Diese Vektoren ermöglichten Kooperationen zweier Aberrationen (Überexpression einer aktivierenden Zytokinrezeptormutante und Verlust eines

Transkriptionsfaktors) in der 32D-Zelllinie oder dreier Aberrationen (Überexpression einer aktivierenden Zytokinrezeptormutante, Verlust eines Transkriptionsfaktors sowie eines Tumorsuppressors) in der 32D-p53-hypo-Zelllinie zu evaluieren.

Dabei wurde die Klonierungseffizienz im *limiting dilution* Test als ein Wert für die Transformationsstärke der einzelnen bzw. kooperierenden genetischen Aberrationen festgelegt.

4.2 Entwicklung bifunktionaler retroviraler Vektoren

Die U3-Region der 3'LTR des retroviralen Vektors R780 wurde mit einer *SnaBI*-Restriktionsschnittstelle versehen. Dadurch konnten shRNA-kodierende Oligonukleotide mit einem vorgeschalteten RNAIII-Polymerase-spezifischen-Promotor (H1) in die *SnaBI*-Schnittstelle kloniert werden. Gleichzeitig wurden onkogene Zytokinrezeptoren in die *NotI*-Schnittstelle kloniert (**siehe Abbildung 9**).

4.3 Transformation hämatopoetischer Zellen durch onkogene Zytokinrezeptoren

Zur Untersuchung der Transformationsstärken wurden die onkogenen Zytokinrezeptoren β GMR-I374N, cKitV558D sowie mplS368C im bifunktionalen Vektor R780S in die myeloische Vorläuferzelllinie 32D transduziert. Nach retroviral-vermittelter Transduktion von β GMR-I374N reicherten sich 8% EGFP-koexprimierende Zellen nach Faktorentzug auf 99% an. Die Anreicherung der GFP-positiven Zellen ist darauf zurückzuführen, dass nach Faktorentzug nur transduzierte Zellen überlebten, da diese Zellen einen konstitutiv aktiven Zytokinrezeptor exprimierten. Dabei reicherten sich die GFP-hoch-exprimierenden Zellen wegen höherer Onkogen-Expression durch Selektionsvorteil stärker an (**siehe Abbildung 14**).

Antonescu et al. fanden in einer Studie mit AML-Patienten eine sekundär auftretende Mutation mit einer Häufigkeit von 12% im *c-Kit*-Gen in der Position 559, in der Asparagin zu Valin substituiert war. Diese Mutante konnten Sommer et al. experimentell auch in der Maus rekonstruieren. Dafür wurde das Maus *c-Kit*-Gen in der Aminosäureposition V558 deletiert⁴¹. Diese Mutante wurde in der vorliegenden Arbeit zur Transformation der 32D-Zelllinie genutzt.

Der retrovirale Transfer von R780S-c-KitV558D in 32D zeigte eine Anreicherung der anfänglich 27% GFP-positiven Zellen nach Faktorentzug auf 99%, dabei konnte eine zeitlich kürzere Anreicherung beobachtet werden als mit β GMR-I374N, vermutlich ist c-KitV558D stärker transformierend als β GMR-I374N. Zu vermerken war, dass die MFI der GFP-

Fluoreszenz der β GMR-I374N-Zellpopulation am Tag 12 um eine halbe Log-Stufe höher lag als der c-KitV558D- oder mplS368C-Zellpopulationen, obwohl die Transduktionseffizienz am Tag 3 von β GMR-I374N bei nur 8% GFP+ Zellen lag (**Abbildung 14**). Die mplS368C-Mutante zeigte eine der c-KitV558D-ähnliche Selektion. MplS368C transduzierte 32D Zellen reicherten sich in kurzer Zeit nach Faktorentzug von 6% auf 98% an. Alle drei onkogene Zytokinrezeptoren konnten erfolgreich zur Transformation von 32D Zellen verwendet werden.

4.4 Differenzierungspotential von 32D, 32D- β GMR-I374N, 32D-c-KitV558D in GCSF

In der Hämatopoese unterläuft der multipotente Progenitor viele Differenzierungs- und Teilungsschritte bis die reife Blutzelle entsteht. Die 32D-Zellen sind immortalisierte myeloische Vorläuferzellen, die ihre Differenzierungskapazität beibehalten haben. Diese Zellen wurden hier, wie auch in der Literatur vielfach beschrieben, in G-CSF erfolgreich zu Granulozyten ausdifferenziert¹⁵⁴. Die 32D-Zellen wurden durch β -GMR-I374N-Expression transformiert und blieben auch ohne IL-3 unreif, wobei sie auch unter G-CSF nicht mehr ausdifferenzierten. Die Expression der c-KitV558D-Mutante führte ebenfalls zum Verlust der Differenzierungskapazität von 32D-Zellen in G-CSF.

4.5 Transformationsstärken von c-KitV558D und mplS368C sind ca. 25-fach höher als β -GMR-I374N in 32D-Zellen

Der Vergleich der Zytokinrezeptormutanten zeigte für c-KitV558D und mplS368C eine bis zu 25-fach stärkere Transformation im Vergleich zu β -GMR-I374N. Eine mögliche Erklärung läge darin, dass die murine GMR α -Kette mit der β GMR-I374N ein funktionelles Heterodimer oder Tetramer bildet¹² und einen begrenzenden Faktor in 32D-Zellen zur Signalweiterleitung darstellt.

Es könnten auch stöchiometrische Unterschiede bestehen. Die KitV558D und mplS368C-Rezeptormutanten benötigen für eine signalfähige Rezeptoreinheit eine Homodimerisierung, wohingegen das GMR/IL-3R/IL-5R zu einer $\beta_2\alpha_2$ -Einheit tetramerisieren kann^{4,155,156}. Da in der Literatur die Homodimerisierung der humanen betac im GMR-Komplex gezeigt wurde¹⁵⁶, ist auf 32D- β GMR-I374N-Zellen eine Rezeptorformation durch die endogen exprimierte murine β -Kette (m β c) mit der humanen β GMR-I374N (h β mut) und zwei murinen GMR α -Untereinheiten als ein m β c/h β mut/ α_2 -Tetramer nicht auszuschließen. Eine solche Rezeptorformation könnte möglicherweise in Verlust eines funktionellen Rezeptors enden.

4.6 β GMR-I374N oder c-KitV558D-Expression unter RNAi-vermittelter p53-, PU.1-, LEF-1-, oder Bmi-1 *knock down* wirkt sich nicht verstärkend auf die Transformationsstärke in 32D und 32D-p53-hypo-Zellen

RNAi-vermittelte Reduktion von p53, LEF-1 oder Bmi-1 in 32D bzw. 32D-p53-hypo-Zellen hatte im Zellkultursystem keinen Einfluss auf das Überleben dieser Zellen in WehiCM (**siehe Abbildung 20, 21**). Weiterhin wirkten sich p53, PU.1, LEF-1 oder Bmi-1 *knock down* auch unter Faktorentzug nicht transformierend auf 32D bzw. 32D-p53-hypo-Zellen aus. Die Transformationsstärken von β GMR-I374N oder c-KitV558D in 32D bzw. 32D-p53-hypo-Zellen unter p53-, LEF-1-, oder Bmi-1 *knock down* unterschieden sich nicht zur Kontroll-shRNA Bedingungen.

Da das Detektieren der LEF-1-mRNA in 32D und 32D-p53-hypo Zellen durch qRT-PCR nicht möglich war, wird in diesen Zellen LEF-1 wahrscheinlich keine Funktion ausüben.

Jacobs et al. wiesen an Bmi-1 defizienten Mausfibroblasten erhöhte Seneszenz nach. In diesen Mausfibroblasten sowie Bmi-1^{-/-} Lymphozyten wurde eine starke Erhöhung des Tumorsuppressors Arf nachgewiesen⁷⁵. Arf stabilisiert über MDM2 das p53 Protein, um die Apoptose zu erhöhen, daher ist in p53-defizienten 32D-p53-hypo Zellen durch Bmi-1-Reduzierung kein Effekt auf die Transformationsstärke zu erwarten. Die Transformationsstärke von c-KitV558D exprimierenden 32D-Zellen reduzierte sich bei gleichzeitiger RNAi gegen PU.1. Im Gegensatz dazu waren β GMR-I374N exprimierende 32D-Zellen und PU.1-*knock down* unter Faktorentzug nicht überlebensfähig. Überraschenderweise war die Transformationsstärke der c-KitV558D-Mutante unter PU.1-*knock down* in 32D-p53-hypo höher als zur Kontroll-shRNA-Bedingung.

Da nur unter PU.1-*knock down* die Zytokinrezeptormutanten sich in den Transformationsstärken im Vergleich zur Kontroll-shRNA-Bedingungen unterschieden, konzentriert sich die nachfolgende Diskussion auf PU.1.

4.7 Onkogene Zytokinrezeptor-Expression unter RNAi-vermittelter PU.1-Reduktion als Modell für zwei kooperierende genetische Alterationen im Zellkultursystem

PU.1-*knock down* in 32D und 32D-p53-hypo Zellen oder bei gleichzeitiger Expression onkogener Zytokinrezeptoren unter IL-3 (WehiCM) hatte keinen Einfluss auf die Klonierungseffizienz im Zellkultursystem. Im Mittel überlebten in den IL-3-Bedingungen (Kontrollplatten) 49 ± 11 Klone aus 100 eingesetzten Zellen.

Bei gleichzeitiger Expression von β GMR-I374N und Transkription einer PU.1-shRNA in 32D Zellen überlebten ohne IL-3 keine Klone. Anderson et al. und DeKoter et al. zeigten eine

starke Reduktion der GMR α -mRNA bzw. GM-CSF-Ligand Bindung in hämatopoetischen Zellen (Fetale Leberzellen) von PU^{-/-} Mausembryonen^{51,157}. Hohaus et al. zeigten, dass PU.1 eine Bindungsstelle im GMR α -Promotor hat und PU.1 in myeloischen Zellen mit anderen Transkriptionsfaktoren spezifisch an diese Stelle bindet. Daher besteht die Möglichkeit, dass RNAi-vermittelte PU.1-Reduktion die GMR α -Expression in der myeloischen 32D-Zelllinie reduziert. Dadurch würden in 32D- β GMR-I374N-shPU.1 Zellen weniger signalfähige β GMR-I374N/GMR α Rezeptorkomplexe entstehen, folglich würde das Überleben dieser Zellen unter Faktorentzug reduziert.

Da in 32D-Zellen auch die Transformationsstärke von c-KitV558D unter PU.1-mRNA Reduzierung signifikant herabfiel, ist zu vermuten, dass PU.1 wichtige Funktionen in der Aufrechterhaltung der Proliferation von myeloischen Zellen einnimmt. mplS368C und PU.1-shRNA exprimierende 32D-Zellen zeigten relativ zur Kontroll-shRNA Bedingung ebenfalls eine negative Tendenz in der Transformationsstärke. Eine Selektion von c-KitV558D und mplS368C-Klonen mit einer Viruskopie wurde verzeichnet, wenn simultan PU.1-shRNA Expression stattfand. Wahrscheinlich überleben 32D-Zellen bei starkem PU.1 *knock down* nicht.

4.8 Onkogene Zytokinrezeptor-Expression unter RNAi-vermittelter PU.1- und p53-Reduktion als Modell für drei kooperierende genetische Alterationen

Vergleicht man c-KitV558D-shctrl-Bedingungen in 32D und 32D-p53-hypo-Zellen überlebten in den Ersteren mehr Klone, obwohl sich im Mittel die Transduktionseffizienzen vor dem Sortieren nicht unterschieden und die mittlere Viruskopienzahlen gleich waren (**Tabelle 2 und 3**). Überraschenderweise überlebten durch c-KitV558D-Expression unter PU.1 *knock down* in 32D-p53-hypo-Zellen signifikant mehr Klone als mit einer Kontroll-shRNA (**Tabelle 3**). Weiterhin transformierte c-KitV558D-shPU.1 in der 32D-p53-hypo mit 18% höherer Effizienz signifikant ($p < 0,02$) stärker als in 32D (**vergleiche Tabelle 2 und 3**). Dabei ist darauf hinzuweisen, dass die mittlere PU.1-mRNA-Konzentration in c-KitV558D-shPU.1 exprimierenden 32D-p53-hypo leicht schwächer war als in 32D. Trotz der höheren Transformationsstärke wiesen die mittleren Viruskopienzahlen der 32D-c-KitV558D-shPU.1-Klone im Vergleich zur Kontroll-shRNA-Bedingungen auf eine Selektion hin.

Der gleiche Effekt konnte bei der β GMR-I374N vermittelten Transformation von 32D-p53-hypo-Zellen beobachtet werden. Dabei war die durch p53-Verlust erworbene Tendenz der höheren Transformationsstärke von β GMR-I374N statistisch nicht signifikant. Da aber in

einigen Experimenten auch β GMR-I374N-shPU.1 Klone überlebten, kann man auch hier den verstärkenden Effekt von p53-Verlust auf die Transformation verzeichnen.

Die mpl-Mutante wies keine Unterschiede bei simultaner Expression einer PU.1-shRNA zur Kontroll-shRNA Bedingung in 32D-p53-hypo auf. Die MFI der mit mplS368C-shctrl transduzierten 32D-Zellpopulation war um ca. eine halbe Logstufe höher verglichen zur mplS368C-shctrl transduzierten 32D-p53-hypo-Zellpopulation (**Abbildungen 33 und 37**). Dieser Unterschied war auch in den mittleren Viruskopienzahlen mit 2,6 in 32D und 1,7 in 32D-p53-hypo nachzuweisen. Auf zwei Viruskopien per Zellklon normalisiert erhält man eine Transformationseffizienz durch mplS368C-shctrl von 55% für 32D und 69% für 32D-p53-hypo. Wegen den hohen Standardabweichungen nach der Normalisierung für die mplS368C-shctrl Kondition ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Zelllinien.

4.9 Lentiviral-vermittelter PU.1-knock down inhibiert die Proliferation von 32D unter onkogenen Bedingungen

Die RNAi gegen PU.1 durch bifunktionale retrovirale Vektoren reduzierte die PU.1-mRNA-Konzentration im Mittel um ca. 75% relativ zu einer Kontroll-shRNA. Zur Untersuchung der Proliferation von stabilisierten 32D- β GMR-I374N- und 32D-c-KitV558D-Zellpopulationen sowie wildtyp 32D Zellen wurden diese Zellpopulationen mit der zuvor verwendeten PU.1-shRNA bzw. einer Kontroll-shRNA lentiviral transduziert, um die onkogene Transformaion als einen schrittweisen Prozess zu rekonstruieren. Die PU.1-mRNA-Konzentrationen in wildtyp 32D und 32D-c-KitV558D waren 4 Tage nach Transduktion um ca. 88% und in 32D- β GMR-I374N-Zellen um ca. 66% reduziert (**Abbildung 41**).

Die Proliferationsrate von 32D- β GMR-I374N Zellen war deutlich niedriger als von wildtyp 32D oder 32D-c-KitV558D Zellen. Bei lentiviral-vermittelter PU.1-Reduktion starben 32D- β GMR-I374N-Zellen 4 Tage nach Transduktion aus. Eine weitere Erklärung für das abrupte Sterben der β GMR-I374N-shPU.1exprimierenden 32D-Zellen wäre, dass PU.1-Verlust die mGMR α -Expression blockiert, die für eine signalfähige β GMR-I374N/mGMR α Rezeptorformation benötigt wird.

Der Monozyten-spezifische Transkriptionsfaktor PU.1 ist in 32D-Zellen wahrscheinlich essentiell für Proliferation und Überleben, da sowohl wildtyp 32D als auch transformierte 32D-c-KitV559A Zellpopulationen zwischen Tag 4 und 6 einem Proliferationsblock unterworfen waren.

4.10 Onkogenes Kit-Signal allein war für die Transformation von 32D ausreichend und geringe PU.1-Reduktion wurde unter c-KitV558D-Expression toleriert

32D Zellen unter PU.1 *knock down* überlebten, wenn c-KitV558D exprimiert wurde. Dabei waren die PU.1-mRNA-Konzentrationen in den Gesamtzellpopulationen auf ca. 25% reduziert und transformierte Klone dieser Zellpopulationen beherbergten meistens eine Viruskopie im Genom. Wir fragten uns, ob die Proliferation von PU.1-reduzierten 32D-c-KitV558D-shPU.1-Klonen verglichen zu 32D-c-KitV558D-shctrl-Klonen beeinträchtigt wäre. Bei residualen PU.1-mRNA-Konzentrationen von $15\% \pm 1$ wurden keine Unterschiede in der Proliferation entdeckt (**Abbildung 44**).

Desweiteren wurden diese Klone in einer Kombination mit IL-3 und Imatinib kultiviert. Dabei blockiert Imatinib die transformierende Tyrosinkinase-Aktivität von c-KitV558D bei Erhalt der PU.1-RNAi. 32D-c-KitV558D-shPU.1 Klon 2 proliferierte dabei unter den residualen PU.1-Konzentration wie der 32D-c-KitV558D-shctrl-Klon, wobei sich die Proliferation von 32D-c-KitV558D-shPU.1 Klon4 am Tag 6 verlangsamt. Wahrscheinlich wird der kritische Punkt bei PU.1-mRNA-Levels unter 15% erreicht und Mengen über diesen Wert werden von 32D sowie c-KitV558D-exprimierenden 32D Zellen noch toleriert.

Da alle untersuchten c-KitV558D-Klone mit ctrl-, oder PU.1-shRNAs unter Imatinib ohne Zugabe von IL-3 bis Tag 2 komplett ausstarben, sind vermutlich diese Klone frei von weiteren *gain-of-function* Mutationen, welche bei langer Kultivierung akkumulieren könnten. Transformierende Signale in 32D-Zellen wurden nur durch c-KitV558D vermittelt.

4.11 PU.1-Verlust vermittelt in p53-abhängiger Weise den Zelltod in 32D-Zellen

Mäuse, die mit dem Friend retroviralem Komplex, bestehend aus Replikations-defektem *spleen focus forming virus* (SFFV) und Replikations-kompetentem *friend-murine-leukemia-virus* (F-MuLV) entwickeln stufenweise eine Erythroleukämie. In der ersten Phase entstehen durch Aktivierung des Epo-Rezeptors Erythroblasten, die auf Epo noch differenzierungsfähig sind. Die zweite Phase ist von der Expansion von transformierten Erythroblasten begleitet, die durch PU.1-Überexpression, induziert durch Integration des SFFVs in den PU.1-Promotor, entstehen¹⁵⁸⁻¹⁶¹. Longmore et al. konnten in F-MuLV-induzierten leukämischen Zellen p53-Mutationen detektieren. Prasher et al. stellten fest, dass der p53-Verlust für das Fortschreiten der F-MLV/SFFV-induzierten Erythroleukämie in Mäusen benötigt wird. In einer neulich erschienenen Publikation berichten Tschan et al., dass PU.1 die p53-Aktivität durch Protein-Protein-Interaktion mit der DNA-Oligomerisierungs-Domäne inhibiert¹⁶². In einem Promotor-Luciferase-Assays wurde durch Kotransfektion von PU.1 mit p53 insbesondere die

Expression des Zellzyklus Inhibitors p21, das durch p53-Famile Proteine stimuliert wird, inhibiert¹⁶². Tschan et al. zeigten dabei in endogene PU.1 und p53-exprimierenden REH-Zellen (Leukämische B-Zell-Vorläufer Zelllinie) die Erhöhung der p21-Expression, wenn RNAi-vermittelt PU.1 herunter-reguliert wurde.

Die in der vorliegenden Arbeit erworbenen Kenntnisse deuten darauf hin, dass PU.1 in der myeloischen Zelllinie 32D eine wichtige Rolle in Proliferation und Überleben einnimmt. Dabei wirkte RNAi-vermittelte PU.1-mRNA-Reduktion in 32D auf unter 15% Proliferations-inhibierend und Transformations-senkend. In p53-defizienten 32D-Zellen dagegen hatte RNAi-vermittelter PU.1-*knock down* bei ähnlichen PU.1-Konzentrationen geringen Einfluss auf die Onkogen-vermittelte Transformation. Das Überleben von myeloischen 32D-Zellen sowie transformierten 32D-Zellen ist wahrscheinlich von PU.1-vermittelter Blockierung des p53-Proteins abhängig. Das vorgestellte Zellkultursystem stellt ein potentiell Werkzeug zur Untersuchung von kooperierenden genetischen Aberrationen bei der Leukämogense da.

Referenzen

1. Weissman, I.L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* **100**, 157-68 (2000).
2. Cline, M.J. The molecular basis of leukemia. *N Engl J Med* **330**, 328-36 (1994).
3. Uings, I.J. & Farrow, S.N. Cell receptors and cell signalling. *Mol Pathol* **53**, 295-9 (2000).
4. Bagley, C.J., Woodcock, J.M., Stomski, F.C. & Lopez, A.F. The structural and functional basis of cytokine receptor activation: lessons from the common beta subunit of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3 (IL-3), and IL-5 receptors. *Blood* **89**, 1471-82 (1997).
5. Hara, T. & Miyajima, A. Two distinct functional high affinity receptors for mouse interleukin-3 (IL-3). *Embo J* **11**, 1875-84 (1992).
6. Woodcock, J.M. et al. The human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) receptor exists as a preformed receptor complex that can be activated by GM-CSF, interleukin-3, or interleukin-5. *Blood* **90**, 3005-17 (1997).
7. Guthridge, M.A. et al. Mechanism of activation of the GM-CSF, IL-3, and IL-5 family of receptors. *Stem Cells* **16**, 301-13 (1998).
8. Ueda, T. et al. Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor. *J Clin Invest* **105**, 1013-21 (2000).
9. Miller, C.L. & Eaves, C.J. Expansion in vitro of adult murine hematopoietic stem cells with transplantable lympho-myeloid reconstituting ability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13648-53 (1997).
10. Conneally, E., Cashman, J., Petzer, A. & Eaves, C. Expansion in vitro of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic-scid/scid mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9836-41 (1997).
11. Bhatia, M. et al. Quantitative analysis reveals expansion of human hematopoietic repopulating cells after short-term ex vivo culture. *J Exp Med* **186**, 619-24 (1997).
12. Jenkins, B.J., Le, F. & Gonda, T.J. A cell type-specific constitutive point mutant of the common beta-subunit of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interleukin (IL)-3, and IL-5 receptors requires the GM-CSF receptor alpha-subunit for activation. *J Biol Chem* **274**, 8669-77 (1999).
13. Geissler, E.N., Ryan, M.A. & Housman, D.E. The dominant-white spotting (W) locus of the mouse encodes the c-kit proto-oncogene. *Cell* **55**, 185-92 (1988).

14. Lev, S., Blechman, J.M., Givol, D. & Yarden, Y. Steel factor and c-kit protooncogene: genetic lessons in signal transduction. *Crit Rev Oncog* **5**, 141-68 (1994).
15. Broudy, V.C., Lin, N.L. & Kaushansky, K. Thrombopoietin (c-mpl ligand) acts synergistically with erythropoietin, stem cell factor, and interleukin-11 to enhance murine megakaryocyte colony growth and increases megakaryocyte ploidy in vitro. *Blood* **85**, 1719-26 (1995).
16. Wendling, F., Varlet, P., Charon, M. & Tambourin, P. MPLV: a retrovirus complex inducing an acute myeloproliferative leukemic disorder in adult mice. *Virology* **149**, 242-6 (1986).
17. Souyri, M. et al. A putative truncated cytokine receptor gene transduced by the myeloproliferative leukemia virus immortalizes hematopoietic progenitors. *Cell* **63**, 1137-47 (1990).
18. Vigon, I. et al. Molecular cloning and characterization of MPL, the human homolog of the v-mpl oncogene: identification of a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5640-4 (1992).
19. Sitnicka, E. et al. The effect of thrombopoietin on the proliferation and differentiation of murine hematopoietic stem cells. *Blood* **87**, 4998-5005 (1996).
20. Kobayashi, M., Laver, J.H., Kato, T., Miyazaki, H. & Ogawa, M. Thrombopoietin supports proliferation of human primitive hematopoietic cells in synergy with steel factor and/or interleukin-3. *Blood* **88**, 429-36 (1996).
21. Alexander, W.S., Roberts, A.W., Nicola, N.A., Li, R. & Metcalf, D. Deficiencies in progenitor cells of multiple hematopoietic lineages and defective megakaryocytopoiesis in mice lacking the thrombopoietic receptor c-Mpl. *Blood* **87**, 2162-70 (1996).
22. Kirito, K. & Kaushansky, K. Transcriptional regulation of megakaryopoiesis: thrombopoietin signaling and nuclear factors. *Curr Opin Hematol* **13**, 151-6 (2006).
23. Solberg, L.A., Jr. Biologic aspects of thrombopoietins and the development of therapeutic agents. *Curr Hematol Rep* **4**, 423-8 (2005).
24. Deutsch, V.R. & Tomer, A. Megakaryocyte development and platelet production. *Br J Haematol* **134**, 453-66 (2006).
25. Kaushansky, K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest* **115**, 3339-47 (2005).
26. Philo, J.S. et al. Human stem cell factor dimer forms a complex with two molecules of the extracellular domain of its receptor, Kit. *J Biol Chem* **271**, 6895-902 (1996).

27. Jahn, T. et al. Analysing c-kit internalization using a functional c-kit-EGFP chimera containing the fluorochrome within the extracellular domain. *Oncogene* **21**, 4508-20 (2002).
28. Lennartsson, J., Jelacic, T., Linnekin, D. & Shivakrupa, R. Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit. *Stem Cells* **23**, 16-43 (2005).
29. Jenkins, B.J., D'Andrea, R. & Gonda, T.J. Activating point mutations in the common beta subunit of the human GM-CSF, IL-3 and IL-5 receptors suggest the involvement of beta subunit dimerization and cell type-specific molecules in signalling. *Embo J* **14**, 4276-87 (1995).
30. Furitsu, T. et al. Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J Clin Invest* **92**, 1736-44 (1993).
31. Tsujimura, T. et al. Constitutive activation of c-kit in FMA3 murine mastocytoma cells caused by deletion of seven amino acids at the juxtamembrane domain. *Blood* **87**, 273-83 (1996).
32. Nagata, H. et al. Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10560-4 (1995).
33. Longley, B.J. et al. Somatic c-KIT activating mutation in urticaria pigmentosa and aggressive mastocytosis: establishment of clonality in a human mast cell neoplasm. *Nat Genet* **12**, 312-4 (1996).
34. Pignon, J.M. et al. A new c-kit mutation in a case of aggressive mast cell disease. *Br J Haematol* **96**, 374-6 (1997).
35. Beghini, A., Cairoli, R., Morra, E. & Larizza, L. In vivo differentiation of mast cells from acute myeloid leukemia blasts carrying a novel activating ligand-independent C-kit mutation. *Blood Cells Mol Dis* **24**, 262-70 (1998).
36. Beghini, A. et al. C-kit mutations in core binding factor leukemias. *Blood* **95**, 726-7 (2000).
37. Sperr, W.R. et al. Systemic mastocytosis associated with acute myeloid leukaemia: report of two cases and detection of the c-kit mutation Asp-816 to Val. *Br J Haematol* **103**, 740-9 (1998).
38. Hirota, S. et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* **279**, 577-80 (1998).

39. Kitayama, H. et al. Constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase confer factor-independent growth and tumorigenicity of factor-dependent hematopoietic cell lines. *Blood* **85**, 790-8 (1995).
40. Kitayama, H. et al. Neoplastic transformation of normal hematopoietic cells by constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase. *Blood* **88**, 995-1004 (1996).
41. Sommer, G. et al. Gastrointestinal stromal tumors in a mouse model by targeted mutation of the Kit receptor tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6706-11 (2003).
42. Antonescu, C.R. et al. Association of KIT exon 9 mutations with nongastric primary site and aggressive behavior: KIT mutation analysis and clinical correlates of 120 gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* **9**, 3329-37 (2003).
43. Watowich, S.S., Hilton, D.J. & Lodish, H.F. Activation and inhibition of erythropoietin receptor function: role of receptor dimerization. *Mol Cell Biol* **14**, 3535-49 (1994).
44. Alexander, W.S., Metcalf, D. & Dunn, A.R. Point mutations within a dimer interface homology domain of c-Mpl induce constitutive receptor activity and tumorigenicity. *Embo J* **14**, 5569-78 (1995).
45. Klemsz, M.J., McKercher, S.R., Celada, A., Van Beveren, C. & Maki, R.A. The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene. *Cell* **61**, 113-24 (1990).
46. Galson, D.L. et al. Mouse beta-globin DNA-binding protein B1 is identical to a proto-oncogene, the transcription factor Spi-1/PU.1, and is restricted in expression to hematopoietic cells and the testis. *Mol Cell Biol* **13**, 2929-41 (1993).
47. Henkel, G. & Brown, M.A. PU.1 and GATA: components of a mast cell-specific interleukin 4 intronic enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 7737-41 (1994).
48. Scott, E.W., Simon, M.C., Anastasi, J. & Singh, H. Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* **265**, 1573-7 (1994).
49. McKercher, S.R. et al. Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *Embo J* **15**, 5647-58 (1996).
50. Iwasaki, H. et al. Distinctive and indispensable roles of PU.1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation. *Blood* **106**, 1590-600 (2005).
51. Anderson, K.L. et al. Myeloid development is selectively disrupted in PU.1 null mice. *Blood* **91**, 3702-10 (1998).

52. Anderson, K.L. et al. PU.1 and the granulocyte- and macrophage colony-stimulating factor receptors play distinct roles in late-stage myeloid cell differentiation. *Blood* **94**, 2310-8 (1999).
53. Hohaus, S. et al. PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene. *Mol Cell Biol* **15**, 5830-45 (1995).
54. Mueller, B.U. et al. Heterozygous PU.1 mutations are associated with acute myeloid leukemia. *Blood* **100**, 998-1007 (2002).
55. Rosenbauer, F. et al. Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1. *Nat Genet* **36**, 624-30 (2004).
56. Cook, W.D. et al. PU.1 is a suppressor of myeloid leukemia, inactivated in mice by gene deletion and mutation of its DNA binding domain. *Blood* **104**, 3437-44 (2004).
57. Walter, M.J. et al. Reduced PU.1 expression causes myeloid progenitor expansion and increased leukemia penetrance in mice expressing PML-RARalpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12513-8 (2005).
58. Travis, A., Amsterdam, A., Belanger, C. & Grosschedl, R. LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor alpha enhancer function [corrected]. *Genes Dev* **5**, 880-94 (1991).
59. Oosterwegel, M. et al. Differential expression of the HMG box factors TCF-1 and LEF-1 during murine embryogenesis. *Development* **118**, 439-48 (1993).
60. Carlsson, P., Waterman, M.L. & Jones, K.A. The hLEF/TCF-1 alpha HMG protein contains a context-dependent transcriptional activation domain that induces the TCR alpha enhancer in T cells. *Genes Dev* **7**, 2418-30 (1993).
61. Giese, K., Cox, J. & Grosschedl, R. The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures. *Cell* **69**, 185-95 (1992).
62. Korinek, V. et al. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science* **275**, 1784-7 (1997).
63. Behrens, J. et al. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* **382**, 638-42 (1996).
64. Huber, O. et al. Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev* **59**, 3-10 (1996).

65. Bruhn, L., Munnerlyn, A. & Grosschedl, R. ALY, a context-dependent coactivator of LEF-1 and AML-1, is required for TCRalpha enhancer function. *Genes Dev* **11**, 640-53 (1997).
66. Prieve, M.G., Guttridge, K.L., Munguia, J.E. & Waterman, M.L. The nuclear localization signal of lymphoid enhancer factor-1 is recognized by two differentially expressed Srp1-nuclear localization sequence receptor proteins. *J Biol Chem* **271**, 7654-8 (1996).
67. Reya, T. et al. Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. *Immunity* **13**, 15-24 (2000).
68. Tokoro, Y. et al. A mouse carrying genetic defect in the choice between T and B lymphocytes. *J Immunol* **161**, 4591-8 (1998).
69. Yu, Q., Erman, B., Park, J.H., Feigenbaum, L. & Singer, A. IL-7 receptor signals inhibit expression of transcription factors TCF-1, LEF-1, and RORgammat: impact on thymocyte development. *J Exp Med* **200**, 797-803 (2004).
70. Li, F.Q. et al. Lymphoid enhancer factor-1 links two hereditary leukemia syndromes through core-binding factor alpha regulation of ELA2. *J Biol Chem* **279**, 2873-84 (2004).
71. Skokowa, J. et al. LEF-1 is crucial for neutrophil granulocytopenia and its expression is severely reduced in congenital neutropenia. *Nat Med* **12**, 1191-7 (2006).
72. Park, I.K. et al. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* **423**, 302-5 (2003).
73. Lessard, J. & Sauvageau, G. Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature* **423**, 255-60 (2003).
74. van der Lugt, N.M. et al. Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the bmi-1 proto-oncogene. *Genes Dev* **8**, 757-69 (1994).
75. Jacobs, J.J., Kieboom, K., Marino, S., DePinho, R.A. & van Lohuizen, M. The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature* **397**, 164-8 (1999).
76. Vogelstein, B., Lane, D. & Levine, A.J. Surfing the p53 network. *Nature* **408**, 307-10 (2000).
77. Levine, A.J., Momand, J. & Finlay, C.A. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* **351**, 453-6 (1991).

78. Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Harris, C.C. p53 mutations in human cancers. *Science* **253**, 49-53 (1991).
79. Bourdon, J.C. p53 and its isoforms in cancer. *Br J Cancer* **97**, 277-82 (2007).
80. Momand, J., Zambetti, G.P., Olson, D.C., George, D. & Levine, A.J. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* **69**, 1237-45 (1992).
81. Honda, R., Tanaka, H. & Yasuda, H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* **420**, 25-7 (1997).
82. Toledo, F. & Wahl, G.M. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer* **6**, 909-23 (2006).
83. Sherr, C.J. Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. *Genes Dev* **12**, 2984-91 (1998).
84. de Stanchina, E. et al. E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev* **12**, 2434-42 (1998).
85. Chipuk, J.E. & Green, D.R. Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ* **13**, 994-1002 (2006).
86. Kastan, M.B. et al. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* **71**, 587-97 (1992).
87. el-Deiry, W.S. et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**, 817-25 (1993).
88. Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K. & Elledge, S.J. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805-16 (1993).
89. Xiong, Y. et al. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* **366**, 701-4 (1993).
90. Hurwitz, J., Dean, F.B., Kwong, A.D. & Lee, S.H. The in vitro replication of DNA containing the SV40 origin. *J Biol Chem* **265**, 18043-6 (1990).
91. Waga, S., Hannon, G.J., Beach, D. & Stillman, B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* **369**, 574-8 (1994).
92. Bendjennat, M. et al. UV irradiation triggers ubiquitin-dependent degradation of p21(WAF1) to promote DNA repair. *Cell* **114**, 599-610 (2003).

93. Halazonetis, T.D., Gorgoulis, V.G. & Bartek, J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science* **319**, 1352-5 (2008).
94. Hernandez-Boussard, T., Rodriguez-Tome, P., Montesano, R. & Hainaut, P. IARC p53 mutation database: a relational database to compile and analyze p53 mutations in human tumors and cell lines. International Agency for Research on Cancer. *Hum Mutat* **14**, 1-8 (1999).
95. Horiike, S. et al. Distinct genetic involvement of the TP53 gene in therapy-related leukemia and myelodysplasia with chromosomal losses of Nos 5 and/or 7 and its possible relationship to replication error phenotype. *Leukemia* **13**, 1235-42 (1999).
96. Krug, U., Ganser, A. & Koeffler, H.P. Tumor suppressor genes in normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene* **21**, 3475-95 (2002).
97. Honda, H. et al. Acquired loss of p53 induces blastic transformation in p210(bcr/abl)-expressing hematopoietic cells: a transgenic study for blast crisis of human CML. *Blood* **95**, 1144-50 (2000).
98. Tabara, H., Grishok, A. & Mello, C.C. RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science* **282**, 430-1 (1998).
99. Kennerdell, J.R. & Carthew, R.W. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* **95**, 1017-26 (1998).
100. Svoboda, P., Stein, P., Hayashi, H. & Schultz, R.M. Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development* **127**, 4147-56 (2000).
101. Wianny, F. & Zernicka-Goetz, M. Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol* **2**, 70-5 (2000).
102. Napoli, C., Lemieux, C. & Jorgensen, R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* **2**, 279-289 (1990).
103. Smith, C.J. et al. Expression of a truncated tomato polygalacturonase gene inhibits expression of the endogenous gene in transgenic plants. *Mol Gen Genet* **224**, 477-81 (1990).
104. van der Krol, A.R., Mur, L.A., Beld, M., Mol, J.N. & Stuitje, A.R. Flavonoid genes in *petunia*: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* **2**, 291-9 (1990).
105. Hamilton, A.J. & Baulcombe, D.C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**, 950-2 (1999).

106. Romano, N. & Macino, G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol* **6**, 3343-53 (1992).
107. Cogoni, C. et al. Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *Embo J* **15**, 3153-63 (1996).
108. Ketting, R.F., Haverkamp, T.H., van Luenen, H.G. & Plasterk, R.H. Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell* **99**, 133-41 (1999).
109. Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D. & Hannon, G.J. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**, 293-6 (2000).
110. Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A. & Bartel, D.P. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**, 25-33 (2000).
111. Elbashir, S.M., Lendeckel, W. & Tuschl, T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* **15**, 188-200 (2001).
112. Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. & Hannon, G.J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363-6 (2001).
113. Gregory, R.I., Chendrimada, T.P., Cooch, N. & Shiekhattar, R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* **123**, 631-40 (2005).
114. Maniataki, E. & Mourelatos, Z. A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev* **19**, 2979-90 (2005).
115. Chendrimada, T.P. et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* **436**, 740-4 (2005).
116. Lee, Y. et al. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *Embo J* **25**, 522-32 (2006).
117. Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D.P. & Zamore, P.D. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* **123**, 607-20 (2005).
118. Rand, T.A., Petersen, S., Du, F. & Wang, X. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* **123**, 621-9 (2005).
119. Meister, G. & Tuschl, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431**, 343-9 (2004).

120. Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Luhrmann, R. & Tuschl, T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* **110**, 563-74 (2002).
121. Ameres, S.L., Martinez, J. & Schroeder, R. Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC. *Cell* **130**, 101-12 (2007).
122. Lee, R.C., Feinbaum, R.L. & Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843-54 (1993).
123. Reinhart, B.J. et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **403**, 901-6 (2000).
124. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. & Tuschl, T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* **294**, 853-8 (2001).
125. Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G. & Bartel, D.P. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **294**, 858-62 (2001).
126. Lee, R.C. & Ambros, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **294**, 862-4 (2001).
127. Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.T., Kim, S. & Kim, V.N. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *Embo J* **21**, 4663-70 (2002).
128. Zeng, Y. & Cullen, B.R. Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *Rna* **9**, 112-23 (2003).
129. Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G. & Cullen, B.R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* **17**, 3011-6 (2003).
130. Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E. & Kutay, U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **303**, 95-8 (2004).
131. Lee, Y. et al. The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415-9 (2003).
132. Wakiyama, M., Takimoto, K., Ohara, O. & Yokoyama, S. *Let-7* microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes Dev* **21**, 1857-62 (2007).
133. Behm-Ansmant, I. et al. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev* **20**, 1885-98 (2006).

134. Eulalio, A. et al. Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing. *Genes Dev* **21**, 2558-70 (2007).
135. Grishok, A. et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* **106**, 23-34 (2001).
136. Paddison, P.J., Caudy, A.A., Bernstein, E., Hannon, G.J. & Conklin, D.S. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* **16**, 948-58 (2002).
137. Brummelkamp, T.R., Bernards, R. & Agami, R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**, 550-3 (2002).
138. Hildinger, M. et al. FMEV vectors: both retroviral long terminal repeat and leader are important for high expression in transduced hematopoietic cells. *Gene Ther* **5**, 1575-9 (1998).
139. Scherr, M., Battmer, K., Ganser, A. & Eder, M. Modulation of gene expression by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA. *Cell Cycle* **2**, 251-7 (2003).
140. Burns, J.C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M. & Yee, J.K. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8033-7 (1993).
141. Hildinger, M., Abel, K.L., Ostertag, W. & Baum, C. Design of 5' untranslated sequences in retroviral vectors developed for medical use. *J Virol* **73**, 4083-9 (1999).
142. Schwieger, M. et al. AML1-ETO inhibits maturation of multiple lymphohematopoietic lineages and induces myeloblast transformation in synergy with ICSBP deficiency. *J Exp Med* **196**, 1227-40 (2002).
143. Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-19 (1985).
144. Modlich, U. et al. Cell-culture assays reveal the importance of retroviral vector design for insertional genotoxicity. *Blood* **108**, 2545-53 (2006).
145. Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45 (2001).
146. Dirac, A.M. & Bernards, R. Reversal of senescence in mouse fibroblasts through lentiviral suppression of p53. *J Biol Chem* **278**, 11731-4 (2003).

147. Elbashir, S.M. et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-8 (2001).
148. Gilliland, D.G. & Tallman, M.S. Focus on acute leukemias. *Cancer Cell* **1**, 417-20 (2002).
149. Schessl, C. et al. The AML1-ETO fusion gene and the FLT3 length mutation collaborate in inducing acute leukemia in mice. *J Clin Invest* **115**, 2159-68 (2005).
150. de Guzman, C.G. et al. Hematopoietic stem cell expansion and distinct myeloid developmental abnormalities in a murine model of the AML1-ETO translocation. *Mol Cell Biol* **22**, 5506-17 (2002).
151. Yuan, Y. et al. AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10398-403 (2001).
152. Higuchi, M. et al. Expression of a conditional AML1-ETO oncogene bypasses embryonic lethality and establishes a murine model of human t(8;21) acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* **1**, 63-74 (2002).
153. Nakao, M. et al. Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **10**, 1911-8 (1996).
154. Valtieri, M. et al. Cytokine-dependent granulocytic differentiation. Regulation of proliferative and differentiative responses in a murine progenitor cell line. *J Immunol* **138**, 3829-35 (1987).
155. Stomski, F.C. et al. Human interleukin-3 (IL-3) induces disulfide-linked IL-3 receptor alpha- and beta-chain heterodimerization, which is required for receptor activation but not high-affinity binding. *Mol Cell Biol* **16**, 3035-46 (1996).
156. Muto, A., Watanabe, S., Miyajima, A., Yokota, T. & Arai, K. The beta subunit of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor forms a homodimer and is activated via association with the alpha subunit. *J Exp Med* **183**, 1911-6 (1996).
157. DeKoter, R.P., Walsh, J.C. & Singh, H. PU.1 regulates both cytokine-dependent proliferation and differentiation of granulocyte/macrophage progenitors. *Embo J* **17**, 4456-68 (1998).
158. Moreau-Gachelin, F. et al. Spi-1/PU.1 transgenic mice develop multistep erythroleukemias. *Mol Cell Biol* **16**, 2453-63 (1996).
159. Moreau-Gachelin, F., Tavitian, A. & Tambourin, P. Spi-1 is a putative oncogene in virally induced murine erythroleukaemias. *Nature* **331**, 277-80 (1988).

160. Moreau-Gachelin, F., Ray, D., Mattei, M.G., Tambourin, P. & Tavitian, A. The putative oncogene Spi-1: murine chromosomal localization and transcriptional activation in murine acute erythroleukemias. *Oncogene* **4**, 1449-56 (1989).
161. Moreau-Gachelin, F. et al. Spi-1 oncogene activation in Rauscher and Friend murine virus-induced acute erythroleukemias. *Leukemia* **4**, 20-3 (1990).
162. Tschan, M.P. et al. PU.1 binding to the p53 family of tumor suppressors impairs their transcriptional activity. *Oncogene* (2008).

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Doğan
Vorname: Yıldırım
Geburtsdatum: 19.09.1979
Geschlecht: Männlich

Schulbildung

1999 Abitur

Studium

01.10. 1999 Aufnahme des Studiums im Fachbereich Biologie der Universität Hannover

27.09.2001 Vordiplom in Biologie
11.09.2003 Mündliche Diplomprüfungen
Hauptfach – Zell und Entwicklungsbiologie
Nebenfach – Immunologie
Nebenfach – Genetik

Diplomarbeit

01.10.2003 - 30.06.2004 Diplomarbeit aus der Abteilung Hämatologie, Hämostaseologie, Onkologie und Stammzelltransplantation der Medizinischen Hochschule Hannover mit dem Thema: „*Stabile RNA-Interferenz in hämatopoetischen Zellen*“

10.08.2004 Abschluss zum Diplom Biologen (Dipl.-Biol.) im Fachbereich Biologie der Universität Hannover

Doktorarbeit

01.10.04 bis 10.07.08 Doktorarbeit aus der Abteilung Hämatologie, Hämostaseologie, Onkologie und Stammzelltransplantation der Medizinischen Hochschule Hannover mit dem Thema: „*Entwicklung bifunktionaler retroviraler Vektoren zur Untersuchung der Pathogenese*“

*myeloischer Systemerkrankungen und zur
Evaluierung therapeutischer Zielstrukturen.*

Zertifikate

Kategorie C -FELASA	Empfehlung über die Leitung von Tierversuchen
Gene Technology Security	Für die Leitung von gentechnischen Laboratorien

EDV-Kenntnisse

MS-Office	Sehr gut
SPSS	Grundkenntnisse
Macintosh	Sehr Gut
FlowJo	Grundkenntnisse
Adobe Photoshop	Gut
Plasmid Software (VectorNTI)	Sehr Gut

Sprachen

Deutsch	Muttersprache
Englisch	Sehr Gut
Türkisch	Muttersprache

Danksagung

Da Forschung heutzutage mit sehr viel *networking* verbunden ist, möchte ich mich auch bei allen hier nicht erwähnten Personen bedanken.

Zuallererst bedanke ich mich bei meiner Mutter sowie meinen Geschwistern, die mir unermüdbar in schlechten und guten Zeiten zur Seite standen.

Ich danke der gesamten Abteilung der Hämatologie, Hämostaseologie, Onkologie und Stammzelltransplantation der MHH für die warme Arbeitsatmosphäre, ich vermisse schon das leckere Frühstück bei Festlichkeiten.

Insbesondere möchte ich meinen herzlichen Dank an Michaela Scherr und Matthias Eder, für die unerschöpfliche Kraft mich zu betreuen, übermitteln.

Ich schätze mich für sehr glücklich die professionelle Hilfe von Karin Battmer und Iris Dallmann in Anspruch genommen zu haben. Danke vielmals!

Herzlichen Dank an die AG Baum, dass ich ihre Gerätschaften benutzen durfte und für die Einladungen zu Festlichkeiten.

Ein großes Dankeschön an Christina und Matthias Ballmaier für das Sortieren.

An Daniel, Steffi, Michael, Letizia und allen anderen Kollegen, die mir den Aufenthalt im Labor zu einen täglichen Spaß umgewandelt haben.

Weiterhin bin ich froh Komal kennengelernt zu haben, mit ihr habe ich eine sehr schöne Zeit ausserhalb des Labors verbracht. Thanks a lot Mäusschen!

Danke auch an meine Freunde insbesondere Ali (Habibi), Axel, Marc, Nonsie, Ujala, Nupur, Priyanka, Kumar, Ewa, Maciej und Girish.

Herzlichen Dank an David Dorn und seiner Familie für die Korrektur meiner Doktorarbeit.

Nicht zuletzt bedanke ich mich sehr herzlich bei Julia Skokowa, Karl Welte und Christopher Baum für den langen Arm nach New York.

Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation – Entwicklung bifunktionaler retroviraler Vektoren zur Untersuchung der Pathogenese myeloischer Systemerkrankungen und zur Evaluierung therapeutischer Zielstrukturen – selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 27.12.2008

(Unterschrift)

Name: Yıldırım Doğan