

**Peptid-basierte molekulare Therapieansätze zur Inhibierung der onkogenen
Aktivität von AML1/ETO: Etablierung eines Screening-Systems für
ETO-interagierende Peptide**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Silke Schüle
aus Singen am Hohentwiel

Frankfurt am Main, 2003
(D F 1)

FÜR MEINE ELTERN MARGRET & FRIED.

SÓ ALEGRIA!

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. W. E. Müller

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Ludwig

2. Gutachter: Prof. Dr. B. Groner

Datum der Disputation:

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. WIE KREBS ENTSTEHT	1
1.1.1. Leukämien	2
1.1.2. Klassifizierung der Leukämien	2
1.1.3. Häufigkeit akuter Leukämien	3
1.1.4. Behandlungsmöglichkeiten der akuten myeloischen Leukämien und Ziel alternativer Therapieansätze	4
<u>Ziel alternativer Therapieansätze</u>	5
1.2. MÖGLICHE VERÄNDERTE TRANSKRIPTIONSFAKTOREN BEI AKUTEN LEUKÄMIEN AUFGRUND CHROMOSOMALER TRANSLOKATIONEN	6
1.2.1. Die Bedeutung von AML1/ETO und der mögliche Einfluß des STAT5 bei der Leukämieentstehung	7
1.2.2. Der Transkriptionsfaktor AML1 und seine Familienmitglieder	8
1.2.3. Die Struktur und Funktion von AML-1	12
1.2.4. Die Bedeutung des AML1/CBF β -Transkriptionsfaktor-Komplexes innerhalb der akuten myeloischen Leukämien	14
1.2.5. AML1 und AML1/ETO: vom Transaktivator zum Repressor	17
1.2.6. STAT5: „signal transducer and activator of transcription“	20
1.2.7. Die Rolle von STAT5 in der Leukämieentstehung	20
1.2.8. Inhibition des Wachstums AML1/ETO-transformierter TF-1-Zellen durch den Einsatz eines STAT5-antagonistischen Peptids	22
1.3. PEPTID-APTAMERE: KLEINE MOLEKÜLE MIT EINER HOHEN BIOAKTIVITÄT	25
1.3.1. Die Identifizierung von Peptid-Aptameren	25
1.3.2. Die Entwicklung therapeutischer Peptide gegen Krebs	28
1.4. ZIELSETZUNG DER ARBEIT	30
2. MATERIAL UND METHODEN	31
2.1. MATERIAL	31
2.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien	31
2.1.2. Chemikalien und Biochemikalien; Medien und Zusätze für die Zellkultur	32
2.1.3. Enzyme	35
2.1.4. Antikörper	36
2.1.5. Marker und Größenstandards	36
2.1.6. Oligonukleotide	36
2.1.7. Peptidsynthese	37
2.1.8. Eukaryotische Expressionsvektoren	37
<u>Das Reporterkonstrukt ΔpMD.G</u>	38
<u>Das Reporterkonstrukt pGLK-tkneo</u>	38
<u>Der retrovirale Vektor PINCO</u>	39
2.1.9. Bakterienstämme (<i>Escherichia coli</i>)	39
2.1.10. Medien für die Bakterienkultur	40
<u>5-fach LB-Flüssigmedium</u>	40
<u>LB-Agar</u>	40
2.2. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	41
2.2.1. Arbeiten mit <i>E. coli</i> und Präparation von Plasmid-DNA	41
2.2.1.2. Herstellung kompetenter Bakterienstämme nach der Rubidiumchlorid-Methode	41
2.2.1.3. Transformation kompetenter Bakterienstämme	41
2.2.1.4. Analytische Isolierung von Plasmid-DNA	42
2.2.1.5. Präparative Isolierung von Plasmid-DNA	42
2.2.1.6. Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	43
2.2.1.7. Anlegen von Glycerin-Stocks	43

2.2.2. Enzymatische Modifikation von DNA	43
2.2.2.1. DNA-Restriktionsspaltung	43
2.2.2.2. Auffüllen von überhängenden DNA-Enden mit DNA-Polymerase (Klenow Fragment).....	44
2.2.2.3. Dephosphorylierung von Vektor-DNA	44
2.2.2.4. Ligation	45
2.2.2.5. Auftrennung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	45
<u>Agarose-Gelelektrophorese</u>	45
<u>Isolierung von DNA aus Agarosegelen</u>	46
<u>Reinigung von DNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion</u>	46
2.2.3. Arbeiten mit genomischer DNA.....	47
2.2.3.1. Präparation genomischer DNA aus 293-Zellen.....	47
2.2.3.2. Amplifizierung von DNA-Sequenzen durch semiquantitative PCR.....	47
2.2.3.3. Bestimmung der Kopienanzahl stabil in 293-Zellen integrierter pCMX-Gal4-ETO und pGLK-tkneo Plasmid-Sequenzen.....	48
2.2.4. Arbeiten mit RNA.....	50
2.2.4.1. Isolierung von Gesamt-RNA	50
2.2.4.2. DNase Verdau	51
2.2.4.3. Reverse Transkription (RT-Reaktion).....	51
2.2.4.4. RT-PCR	52
2.2.5. Arbeiten mit Proteinen.....	53
2.2.5.1. Herstellung von Zellysaten.....	53
2.2.5.2. Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen.....	53
2.2.5.3. Quantitative Protein-Bestimmung nach Bradford	54
2.2.5.4. Coimmunpräzipitation ("Co-IP")	55
2.2.5.5. "Pull-down-Assays"	56
<u>Identifizierung möglicher SH2-Domänen als Interaktionspartner des STAT5-Phosphopeptids mittels "Pull-down-Assay"</u>	56
<u>Identifizierung von Proteinen der Signalkaskade als potenzielle Interaktionspartner des STAT5-Phosphopeptids mittels "Biotin-Pull-down Assay"</u>	57
2.2.5.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot.....	58
<u>Western Blot</u>	59
2.2.5.7. Immunologischer Nachweis der Proteine.....	59
2.2.5.8. Ponceau Rot Färbung	60
2.2.5.9. Coomassie-Färbung.....	60
2.3. ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	61
2.3.1. Kultivierung von adhärenenten und Suspensions-Zelllinien	61
2.3.2. Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen	61
2.3.3. Zelllinien	62
<u>293 und 293T</u>	62
<u>Phoenix-gp</u>	62
<u>NIH3T3</u>	62
<u>Te671</u>	63
<u>Kasumi-1</u>	63
<u>TF-1</u>	63
<u>JK-1</u>	64
<u>U937</u>	64
2.3.4. Gentransfer fremder DNA in eukaryotische Zellen	65
2.3.4.1. Calciumphosphat-Transfektion	65
2.3.4.2. Generation stabil transfizierter Zellklone	65
2.3.4.3. Transiente Transfektion zur Herstellung von Virusüberständen und Transduktion verschiedener 293-Zellen.....	66
2.3.4.4. Transiente Transfektion zur Herstellung von Virusüberständen in Abhängigkeit einer Gal4-ETO regulierten VSV-G Expression	67
2.3.4.5. Titerbestimmung auf adhärenenten Zellen mittels FACS-Analyse.....	67
2.3.5. Zell-Proliferations-Test	68
2.3.5.1. Wachstumskinetik von 293-Zellklonen unter verschiedenen Selektionsmedien	68
2.3.5.2. MTS-Assay	69
2.3.6. Durchflußzytometrie (FACS-Messung)	69
2.4. AUSWERTUNG UND DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE	70

3. ERGEBNISSE	71
3.1. EIN STAT5 ANTAGONISTISCHES PEPTID FÜHRT ZUM WACHSTUMSARREST IN AML1/ETO-TRANSFORMIERTEN ZELLEN	71
3.1.1. Phosphopeptid-"Pull-down"-Experimente mit isolierten SH2-Domänen unterschiedlicher Signalmoleküle	71
3.1.2. Phosphopeptid-"Pull-down"-Experimente mit Lysaten aus Kasumi-1- und JK1-Zellen	74
3.1.3. Untersuchung der Expressionshöhe von PLC γ in AML1/ETO-transformierten Zelllinien	77
3.1.4. Untersuchung des Phosphorylierungsstatus von PLC γ in Kasumi-1-Zellen	78
3.2. ETABLIERUNG VERSCHIEDENER <i>IN-VITRO</i> -SELEKTIONSSYSTEME ZUR IDENTIFIZIERUNG ETO-INHIBIERENDER PEPTIDE	80
3.2.1. Etablierung eines transienten Selektionssystems mit einer über Gal4-ETO regulierbaren Virusproduktion	80
3.2.1.1. Das transiente Selektionssystem	80
3.2.1.2. Konstruktion des VSV-G-Reporterplasmids	82
3.2.1.3. Kotransfektion des VSV-Reporterkonstrukts mit unterschiedlichen Mengen des Repressors Gal4-ETO	83
3.2.1.4. Die Koexpression von Gal4-ETO führt zur transkriptionellen Repression des Hüllproteins (VSV-G)	86
3.2.1.5. Die ETO-vermittelte transkriptionelle Repression kann durch Zugabe eines HDAC-Inhibitors aufgehoben werden	91
3.2.1.6. Einfluß von Gal4-ETO auf UAS unabhängige Promotorsequenzen	93
3.2.2. Herstellung einer stabilen 293-Zelllinie mit einer über Gal4-ETO regulierten tkneo-Selektionskassette	95
3.2.2.1. Das stabile Selektionssystem	95
3.2.2.2. Konstruktion des tkneo-Reporterplasmids	97
3.2.2.3. Vorgehensweise zur Erstellung der stabilen 293-Zelllinie	98
3.2.2.4. Charakterisierung der etablierten Zellklone mit einer durch Butyrat regulierbaren tkneo-Expressionskassette	101
3.2.2.4.1. Nachweis der stabilen Integration der Konstrukte pCMX-Gal4-ETO und pGLK-tkneo mittels PCR	101
3.2.2.4.2. Semiquantitative Bestimmung der stabil in das Genom integrierten pGLK tkneo- und pCMX-Gal4-ETO-Kopien mittels PCR	103
3.2.2.4.3. Nachweis der Gal4-ETO-Expression in den Klonen #61 und #157	107
3.2.2.4.4. Wachstumskinetiken der stabilen Klone #61 und #157	109
3.2.2.4.5. Wachstumskinetik nach Competition des Gal4-ETO-Proteins vom tkneo-Reporterkonstrukt	112
<u>Konstruktion des retroviralen Konstrukts zur stabilen Expression der Gal4-DBD</u>	112
<u>Nachweis der Gal4-DBD Expression und Transduktion der Klone #61 und #157</u>	113
<u>Wachstumskinetik der Klone #61 und #157 nach Koexpression der Gal4-DBD</u>	115
<u>Die Koexpression der Gal4-DBD führt in den stabilen Zellklonen #61 und #157 zu erhöhten mRNA-Spiegeln des tkneo-Selektionsmarkers</u>	116
4. DISKUSSION	119
DIE ONKOGENE AKTIVITÄT VON AML1/ETO KANN IN VERSCHIEDENEN ANSÄTZEN GEHEMT WERDEN	119
5. ZUSAMMENFASSUNG	131
6. LITERATURVERZEICHNIS	132
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	153
KONGREßBEITRÄGE UND VERÖFFENTLICHUNGEN	156
DANKSAGUNG	157
LEBENS LAUF	158

1. Einleitung

1.1. Wie Krebs entsteht

Krebs ist keine einheitliche Krankheit, sondern ein Oberbegriff für fehlreguliertes Wachstum das nahezu jeden Zelltyp unseres Körpers betreffen kann. Es wird dabei zwischen epithelialen und mesenchymalen Tumoren sowie Tumoren des Nervensystems und der pigmentbildenden Zellen unterschieden. Tumorarten wie Karzinome und Sarkome, die primär einen Zellverband bilden, werden als „solide“ Tumoren bezeichnet. Leukämien sind dagegen Neoplasien des hämatopoetischen Systems und wachsen als „nicht-solide“ Tumoren.

Trotz dieser Verschiedenartigkeit entstehen alle Tumoren durch ähnliche grundlegende Prozesse. Bei der Pathogenese der soliden Tumoren durchlaufen diese zusätzlich Stadien, die mit dem Verlust des Kontakts der Zellen untereinander und zu umgebenden Strukturen zusammenhängen sowie der Invasion (=Infiltration) des Bindegewebes, Blut- und Lymphgefäßen. Durch das Wachstum des malignen Tumors in Organen und Gefäßen wird das ursprüngliche Gewebe und somit letztlich dessen Funktion zerstört. Darüber hinaus bildet der maligne Tumor häufig Metastasen (=Tochtergeschwülste) in anderen Geweben. Die invasiven, destruirenden und metastasierenden Eigenschaften sind die entscheidenden Kriterien, in denen sich ein maligner (=böartiger) von einem benignen (=gutartigen) Tumor unterscheidet [Hanahan et al., 2000].

Die Zellen eines Tumors sind in der Regel klonalen Ursprungs, d.h. sie stammen von einer gemeinsamen Ursprungszelle ab. Dabei erfährt diese „Ursprungszelle“ in Form einer Punktmutation oder Translokation (Kap. 1.2) genetische Veränderungen. Aufgrund der genetischen Abweichungen kommt es zu quantitativen oder qualitativen Störungen der normalen Genexpression. Diese Störungen verschaffen der „Ursprungszelle“ im Vergleich zu den Nachbarzellen einen Wachstumsvorteil. Als Beispiel einer genetischen Veränderung, die zu einer qualitativen Störung der Genexpression führt, sei die Translokation t(8;21) genannt. Der Austausch zweier Chromosomenabschnitte führt zur Expression des chimären Fusionsproteins AML1/ETO (Kap. 1.2.1; 1.2.5). Das Fusionsprotein blockiert die Differenzierung hämatopoetischer Zellen und trägt so zur Leukämieentstehung bei. Bei einer quantitativen Störung kann es sich dagegen um eine konstitutive Aktivierung eines Signaltransduktionswegs wie z.B. des Jak/STAT-Signalwegs handeln (Kap.1.2.1; 1.2.6). Die anhaltende Aktivierung der Signaltransduktion führt zur erhöhten Expression der entsprechenden Zielgene und in letzter Konsequenz zu einer stärkeren Proliferation der entsprechenden Zelle.

Entkommt solch eine transformierte Zelle den Kontrollmechanismen (Apoptose, Differenzierung, Immunabwehr) des Organismus, expandiert sie zu einem Klon identischer Zellen. Damit sich eine transformierte Zelle zu einem bösartigen Tumor entwickelt müssen bis zu 5 Mutationen stattfinden [Hanahan et al., 2000; Hahn et al., 1999, Weinberg et al., 1983].

1.1.1. Leukämien

Der Begriff Leukämie beschreibt eine unkontrollierte Proliferation oder Expansion hämatopoetischer Zellen, welche die Fähigkeit zur Differenzierung in reife Blutzellen verloren haben [Sawyers et al., 1991]. Diese leukämische Zellpopulation hat ihren klonalen Ursprung in einer abnormen Stamm- oder Vorläuferzelle im Knochenmark. Von dort werden sie ins periphere Blut ausgeschwemmt und infiltrieren andere Organe wie z.B. Leber, Milz, Lymphknoten, Gehirn, Haut oder Hoden. Die häufigsten, aber nicht immer vorhandenen Anzeichen einer akuten Leukämie sind der Nachweis abnormer Leukozyten im peripheren Blut und Zeichen einer Knochenmarkinsuffizienz, d.h. Anämie, Neutropenie und Thrombozytopenie [Hoffbrand et al., 1997].

1.1.2. Klassifizierung der Leukämien

Die Unterteilung in akute und chronische Leukämien erfolgt anhand des klinischen Bildes. Chronische Leukämien verlaufen zu Beginn schleichend, akute Leukämien sind dagegen durch schwere Symptome wie Fieber und einen allgemeinen Krankheitsgefühl geprägt. Mit Hilfe zytochemischer und morphologischer Untersuchungen wird festgelegt, ob die myeloische oder die lymphatische Zellreihe betroffen ist. Entsprechend wird zwischen einer akuten myeloischen oder akuten lymphatischen Leukämie bzw. einer chronisch myeloischen oder chronisch lymphatischen Leukämie unterschieden (Tab.1.1).

Die akuten Leukämien werden nach den Vorschlägen der „French-American-British Cooperative Group“ (FAB) weiter unterteilt. Hierbei werden die jeweiligen Untergruppierungen wieder aufgrund morphologische Kriterien vorgenommen. So sind z.B. die Blasten bei der AML im Vergleich zu den Blasten der ALL positiv für Myeloperoxidase und unspezifische Esterase. In der Diagnostik dienen außerdem Oberflächenmarker zur Unterscheidung der akuten Leukämien. Blasten der myeloischen Linien sind hierbei positiv für CD13, CD33, Glykophorin (M₆) oder das Thrombozytenantigen (M₇). Dagegen weisen die Blasten der ALL in der Regel keine

Differenzierungsmerkmale auf (Ausnahme: B-Zell-ALL mit CD19, cCD22 und CD10). Die AML wird demnach in acht Untergruppen (M₀-M₇) und die ALL wird in drei Untergruppen unterteilt (L₁-L₃).

Akute Leukämien

Akute Myeloische Leukämie (AML): M₀-M₇. (AML mit t(8;21) = M₂ mit Granulozytenreifung)

Akute Lymphatische Leukämie (ALL): L₁, L₂, L₃, B-Vorläufer-ALL, B-ALL

Chronische Leukämien

Chronisch-myeloische (granulozytäre) Leukämie (CML/CGL)

- > Chronisch-myeloische Leukämie, Ph-positiv (CML, Ph+)
- > Chronisch-myeloische Leukämie, Ph-negativ (CML, Ph-)
- > Juvenile chronisch-myeloische Leukämie
- > Chronisch-neutrophile Leukämie
- > Eosinophile Leukämie
- > Chronisch-myelomonozytäre Leukämie (CMML)

Chronisch-lymphatische Leukämie (CLL)

- > B-Zell-Leukämie
- > T-Zell-Leukämie

Andere chronische Leukämien

z.B. Haarzell-Leukämie, polymorphozytäre Leukämie, Lymphom/Leukämie-Syndrome

Tab. 1.1. Klassifikation der Leukämien [nach Hoffbrand et al., 1997].

1.1.3. Häufigkeit akuter Leukämien

Leukämien sind im Vergleich mit anderen Krebserkrankungen eher selten. In Deutschland erkranken pro Jahr etwa 10 000 Menschen, wobei fast drei Viertel zum Zeitpunkt der Diagnose über 60 Jahre alt sind. Die einzelnen Leukämieformen können zwar in jedem Alter auftreten, sind aber in bestimmten Altersgruppen besonders häufig. So tritt die ALL besonders oft bei Kindern im 3.- 4. Lebensjahr auf. Ab dem 10. Lebensjahr ist die Inzidenz niedrig, erreicht aber nach dem 50. Lebensjahr einen zweiten Gipfel. Bei etwa der Hälfte aller Leukämieerkrankungen handelt es sich um akute Leukämien, die alle Altersgruppen betreffen können. Sie sind die häufigste Leukämieform des Erwachsenenalters und der des älteren Menschen, wobei der Anteil der betroffenen Kinder bei 10-15% liegt.

1.1.4. Behandlungsmöglichkeiten der akuten myeloischen Leukämien und Ziel alternativer Therapieansätze

Patienten mit akuten Leukämien bedürfen sofortiger und intensiver Behandlung. Bei der AML erfolgt zunächst eine Einleitungstherapie mit ein bis zwei Kursen intensiver Chemotherapie. Dabei handelt es sich um die Gabe von Zytostatika, welche die zelluläre Proliferation hemmen. Das Ziel der Induktionstherapie ist zunächst die Einleitung einer Remission, d.h. den Rückgang der Krankheit und ihrer klinischen Anzeichen. Darauf folgen zwei Zyklen der so genannten Konsolidierungstherapie, um die noch vorhandene Leukämiezellpopulation vollständig zu beseitigen. Daran schließt sich eine Erhaltungstherapie über mindestens ein Jahr an, um den Behandlungserfolg zu stabilisieren. Da die eingesetzten myelotoxischen Medikamente nur eine sehr geringe Selektivität bezüglich ihrer toxischen Wirkung auf leukämische und normale Knochenmarkzellen haben, können die Patienten eine schwere und lang anhaltende Knochenmarkinsuffizienz entwickeln. Eine intensive Supportivtherapie (Thrombozyten- und Erythrozytentransfusion, Prophylaxe und Therapie von Infektionen) ist häufig erforderlich. Die Remissionsrate liegt bei Patienten unter 60 Jahren bei 70%. Bei Patienten über 60 Jahren kommt es aufgrund der intensiven Behandlung häufig zu Infektionen, Blutungen und Organversagen, welche oft zum Tod führen. Die Remissionrate beträgt bei dieser Patientengruppe noch 50%.

Kommt es während oder nach der Erhaltungstherapie zu einem Rezidiv (=Rückfall), wird bei Patienten unter 60 Jahren eine Knochenmarktransplantation (KMT) in Betracht gezogen, da die Patienten nicht mit einer Chemotherapie allein geheilt werden können. Die Prognosen sind dabei besser, wenn das Rezidiv erst nach der Erhaltungstherapie eintritt. Durch eine Ganzkörperbestrahlung und eine intensive Chemotherapie werden zunächst sämtliche im Körper und vor allem im Knochenmark vorhandenen leukämischen Zellen abgetötet. Mit Hilfe der Knochenmarktransplantation soll danach das blutbildende System wieder aufgebaut werden. Dabei liegt die Überlebensrate der transplantierten Patienten in den folgenden drei Jahren bei 65%, bei 18% kommt es nach den drei Jahren zu einem Rezidiv [Appelbaum et al., 2001].

Bei einer so genannten allogenen KMT erhält der Patient Blutstammzellen von einem MHC-kompatiblen Spender (z.B. nahe Verwandte). Mit dem Einsatz von Immunsuppressiva soll eine Abstoßungsreaktion des Patienten gegen die transplantierten Zellen verhindert werden. Die im Transplantat enthaltenen immunkompetenten Zellen (T-Zellen und NK-Zellen) des Spenders führen teilweise zu einer weiteren Reduktion der leukämischen Zellen, dieser positive Effekt wird als „Graft versus leukemia“ (GvHL) Effekt bezeichnet [Barnes et al., 2001; Weiden et al., 1979]. Dabei kann es aber auch zu einer

Reaktion der immunkompetenten Spenderzellen gegen die patienteneigenen Zellen kommen: Dieser Effekt wird dagegen als „Graft versus host“- Krankheit (GvHD) bezeichnet [Parkman et al., 1998].

Ist kein geeigneter Spender vorhanden, so kann alternativ eine autologe KM-Transplantation durchgeführt werden. Hierfür wird dem Patienten in der ersten Remissionsphase Knochenmark entnommen und die CD34⁺-Zellen werden aufgereinigt. Die möglicherweise noch enthaltenen Leukämiezellen werden mit Hilfe von Medikamenten oder Antikörpern zerstört. Die Nachteile der autologen Transplantation liegen zum einen im ausbleibenden GvHL-Effekt und zum anderen in der Anwesenheit von möglichen vereinzelt noch vorhandenen leukämischen Zellen, die später einen Rückfall auslösen können. Dabei erleiden noch 35% der autolog transplantierten Patienten ein Rezidiv. Im Vergleich dazu liegt diese Rate bei einer intensiven Chemotherapie ohne Knochenmarktransplantation bei 55%. Die Überlebensrate der nächsten fünf Jahre beträgt bei autolog transplantierten Patienten 56% gegenüber 48% der chemotherapierten Patienten [Appelbaum et al., 2001].

Ziel alternativer Therapieansätze

Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, ist die Behandlung einer Leukämie für den Patienten immer mit sehr starken Nebenwirkungen verbunden. Die momentan zur Therapie verfügbaren Chemotherapeutika haben nur eine sehr geringe Selektivität bezüglich ihrer toxischen Wirkung auf leukämische Knochenmarkzellen, weshalb in letzter Konsequenz auch immer gesunde Knochenmarkzellen abgetötet werden.

Das Ziel alternativer Behandlungsansätze ist es deshalb immer, ein Therapeutikum zu entwickeln, das sich spezifisch gegen die leukämischen Blasten richtet, ohne dabei die gesunden Knochenmarkzellen anzugreifen. Beispiele hierfür stellen die Erfolge dar, die mit Retinsäure (ATRA) bei der Behandlung der APL mit dem PML/RAR α -Gen [Grignani et al., 1998a; Warrell et al., 1998] oder mit dem Kinaseinhibitor STI571 im Fall der CML mit der Bcr/Abl-Translokation erreicht werden können [Au et al., 2002; Ottmann et al., 2002]. Darüber hinaus sind inzwischen eine Reihe von Substanzen bekannt (z.B. Butyrat, Trichostatin A, Valproinsäure), welche in der Lage sind, Histon-Deacetylasen zu hemmen, die bei verschiedenen Leukämien eine transkriptionelle Repression vermitteln und so zur Leukämieentstehung beitragen [Göttlicher et al., 2001; Krämer et al., 2001; Yoshida et al., 1990].

Um spezifische Therapeutika etablieren zu können, müssen deshalb immer die Funktion bzw. die Strukturen der verschiedenen Zielmoleküle genau charakterisiert sein.

Im Rahmen dieser Arbeit stehen diesbezüglich das Fusionsprotein AML1/ETO, das bei 40% der Patienten mit einer AML vom Typ M2 [Look et al., 1997] vorkommt, und die Rolle des STAT5-Moleküls bei der Entstehung dieser akuten myeloischen Leukämie im Mittelpunkt. In den folgenden Kapiteln wird deshalb auf die Funktion des hämatopoetischen Transkriptionsfaktors AML1, des chimären Fusionsproteins AML1/ETO sowie des Signalproteins STAT5 genauer eingegangen.

1.2. Mögliche veränderte Transkriptionsfaktoren bei akuten Leukämien aufgrund chromosomaler Translokationen

Maligne Erkrankungen sind mit genetischen Veränderungen in den betroffenen Zellen verbunden. Ein zentrales Merkmal der transformierten Zelle ist eine Fehlregulation der Transkription, die auf mehreren Ebenen erfolgen kann. Betroffen sind dabei vor allem Gene, die eine entscheidende Rolle in der Zellproliferation, Apoptose und der Zelldifferenzierung spielen [Lutterbach et al., 2000]. Bei der malignen Transformation der hämatopoetischen Zellen spielen chromosomale Translokationen eine besondere Rolle. So sind im Gegensatz zu soliden Tumoren 65% aller Leukämien mit bestimmten chromosomalen Rearrangements assoziiert [Look et al., 1997]. Durch den Austausch bestimmter Bereiche innerhalb eines Chromosoms (Inversion) oder mit anderen Chromosomen (z.B. reziproke Translokation) kommt es zu quantitativen oder qualitativen Störungen der normalen Genexpression.

Infolge chromosomaler Aberrationen innerhalb verschiedener Domänen, die für Transkriptionsfaktoren kodieren, entstehen chimäre Gene, die anschließend zur Expression von Fusionsproteinen mit einer veränderten Funktion führen. Dabei kann die Funktion des neuen Fusionsproteins teilweise anhand bestimmter Strukturmodule (DNA-bindende-, Dimerisierungs- und Transaktivierungsdomäne) charakterisiert werden. Solche strukturell veränderten Transkriptionsfaktoren stehen häufig mit der Entwicklung akuter Leukämien in Verbindung. Beispiele hierfür sind die Fusionsproteine AML1/ETO [t(8;21)], TEL/AML [t(12;21)], CBF β [inv(16)], PML/RAR [t(15;17)] und PLZF/RAR α [t(11;17)]. Die Expression der chimären Proteine beeinträchtigt in der Regel die normale Funktion dieser Transkriptionsfaktoren für die Differenzierung bestimmter hämatopoetischer Zelllinien. So blockiert beispielsweise das Fusionsprotein AML1/ETO die Differenzierung der Myelozyten, wohingegen das PML/RAR α -Fusionsprotein auf der Ebene der Promyelozyten auftritt [Lutterbach et al., 2000]. Als Beispiel für dysregulierte Transkriptionsfaktoren seien die Translokationen der 7q35/TCR β und 14q/TCR $\alpha\delta$ T-Zell-Leukämie genannt. In diesen Fällen ist der Transkriptionsfaktor nicht strukturell verändert,

sondern steht unter der regulatorischen Sequenz des T-Zell-Rezeptor (TCR)-Gens bzw. des Immunglobulins (Ig). Der onkogene Effekt dieser Translokationen beruht darauf, daß die Transkription der Gene durch die Veränderung regulatorischer Sequenzen permanent aktiviert ist und sich so der normalen Kontrolle entzieht [Lutterbach et al., 2000].

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die strukturell veränderten und fehlregulierten Transkriptionsfaktoren Prozesse stören, die für die weitere Entwicklung und/oder die Funktion der entsprechenden Zelllinie wichtig sind. Dadurch wird die Ansammlung abnormaler hämatopoetischer Zellen begünstigt, was in letzter Konsequenz zu einer Leukämie führt.

1.2.1. Die Bedeutung von AML1/ETO und der mögliche Einfluß des STAT5 bei der Leukämieentstehung

Translokationen innerhalb des AML1-Gens lösen nicht *per se* eine Leukämie aus, tragen aber wesentlich zu ihrer Entstehung bei. In Zwillingsstudien wurde beobachtet, daß bei den Geschwistern der Zeitpunkt der Leukämieentstehung verschoben war, obwohl die gleiche genetische Translokation des AML1-Gens schon seit der Geburt vorlag [Wiemels et al., 1999a, 1999b, 2002; Ford et al., 1998]. Außerdem können bei Leukämie-Patienten noch Jahre nach ihrer klinischen Remission Transkripte der AML1/ETO-Translokation in deren Knochenmarkzellen nachgewiesen werden [Miyamoto et al., 2000]. Diese Beobachtungen weisen stark darauf hin, daß eine Leukämie letztlich erst durch eine sekundäre Mutation ausgelöst wird. Diese Theorie wird weiter durch die bestehenden Mausmodelle für die AML1/ETO-Translokation untermauert.

Weder mit AML1/ETO-exprimierenden Knochenmarkzellen rekonstituierte SCID-Mäuse („severe combined immunodeficiency“) noch transgene Mäuse, bei denen die AML1/ETO-Expression durch Tetracyclin-Entzug induziert werden konnte, entwickeln Leukämie [de Guzman et al., 2002; Rhoades et al., 2000]. Damit bei den transgenen Tiere eine AML entsteht, müssen erst sekundäre Mutationen mit Hilfe des stark DNA-alkylierendes Mutagens ENU (N-ethyl-N-nitrosourea) erzeugt werden [Higuchi et al., 2002; Yuan et al., 2001]. Die embryonale Letalität der AML1/ETO-„Knock-in-Mäuse“ [Okuda et al., 1998] wird mit Hilfe einer zellspezifischen AML1/ETO-Expression umgangen. Hierbei steht das AML1/ETO-Gen unter der Kontrolle des humanen MRP8-Promotors. Bei MRP8 handelt es sich um ein kleines Calcium-bindendes Protein, das spezifisch in myeloischen Zellen der neutrophilen Linie exprimiert wird [Lagasse et al., 1992]. Die hMRP8-AML1/ETO-transgenen Mäuse verfügten über einen normalen Phänotyp ohne Anzeichen einer Leukämie. Erst die Behandlung mit dem stark DNA-alkylierenden Mutagen ENU induzierte

in 55% der Mäuse eine AML. Die übrigen transgenen Tiere sowie die Wildtyp-Tiere entwickelten nach der Behandlung mit ENU Lymphome oder eine ALL. Mit hoher Wahrscheinlichkeit tragen vor allem Mutationen in Genen, welche das Proliferationsverhalten oder das Apoptoseprogramm der Zellen verändern, zur Entstehung der AML bei. In der Literatur werden diese Mutationen als Mutationen der Klasse I bezeichnet, wohingegen Veränderungen in Genen, welche das Differenzierungsverhalten der Zellen beeinflussen, als Mutationen der Klasse II bezeichnet werden [Speck et al., 2002].

Die in Kap. 1.7 beschriebenen Versuche zeigen, daß AML1/ETO-transformierte TF-1-Zellen nach Stimulation mit dem Wachstumsfaktor IL-3 eine verlängerte STAT5-Aktivität aufweisen. Die transformierenden Eigenschaften dieser TF-1-Zellen konnte durch ein STAT5-antagonistisches Peptid aufgehoben werden. Eine verstärkte STAT5-Aktivität ist auch für die Zelllinie Kasumi-1 beschrieben [Spiekermann et al., 2001], welche die Translokation t(8;21) trägt und das AML1/ETO-Fusionsprotein exprimiert [Asou et al., 1991]. Darüber hinaus zeigen Studien, daß in den meisten Blasten-Proben von AML-Patienten die STAT5-Aktivität erhöht ist (Kap 1.2.7) [Spiekermann et al., 2002; Biethahn et al., 1999; Hayakawa et al., 1998; Xia et al., 1998; Gouilleux-Gruart et al., 1996]. Da es sich bei STAT5 um ein Gen der Klasse I handelt, das möglicherweise bei der Leukämieentwicklung bei Patienten mit einer t(8;21) ausschlaggebend ist, wird in Kapitel 1.2.7 zusätzlich die Rolle des STAT5-Proteins innerhalb der akuten myeloischen Leukämien beschrieben.

1.2.2. Der Transkriptionsfaktor AML1 und seine Familienmitglieder

Das AML1-Protein gehört zur Familie der heterodimeren Transkriptionsfaktoren CBF („core binding factor“), die sich aus einer DNA-bindenden α -Untereinheit und einer nicht DNA-bindenden β -Untereinheit zusammensetzen [Tenen et al., 1997; Ogawa et al., 1993b]. Die Bindung von AML1 an die Konsensussequenz TG(T/C)GGT wird durch die Assoziation mit der CBF β -Untereinheit verstärkt [Meyers et al., 1993; Ogawa et al., 1993b; Wang et al., 1993].

Die Familie der AML-Transkriptionsfaktoren werden in der Literatur auch als „Polyoma Enhancer Binding Protein“ (PEBP) und „Runt-related transcription factor“ (RUNX) bezeichnet. In unabhängigen Untersuchungen wurde in verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt, daß der heute als AML1 bezeichnete Transkriptionsfaktor sequenzspezifisch sowohl an die „Enhancer“-Region des Polyoma Viruses („polyoma enhancer binding protein2“ (PEBP2)) [Kamachi et al, 1990] als auch in der „Core Enhancer“-Region der

„Moloney leukemia virus“-LTR („core binding factor“ (CBF)) bindet [Golemis et al., 1990]. Das humane Homolog wurde schließlich aufgrund seiner Beteiligung bei der Translokation t(8;21), die häufig bei akuten myeloischen Leukämien (AML) vom FAB-Typ M2 auftritt, identifiziert. Im Jahr 1999 wurde von der „Human Genome Organisation“ (HUGO) die Bezeichnung „Runt-related transcription factor“ (RUNX) eingeführt.

Zur Familie dieser heterodimeren Transkriptionsfaktoren gehören neben AML1 auch AML2 und AML3 (Tab. 1.2) [Levanon et al., 1994]. Zwischen den einzelnen Mitgliedern besteht eine Homologie von über 60%, wobei diese innerhalb der DNA-bindenden Domäne (*Runt*-Domäne) bei 90% liegt [Meyers et al., 1996; Levanon et al., 1994]. Sowohl die Bindung an die DNA als auch die Heterodimerisierung mit dem Kofaktor CBF β erfolgen über die *Runt*-Domäne (rhd). Ihren Namen hat die DNA-bindende Domäne aufgrund ihrer großen Homologie zum Drosophila-Gen *Runt*, einem Paarregel-Gen, das während der frühen Drosophila-Entwicklung die Expression anderer Segmentierungsgene steuert [Kagoshima et al., 1993; Kania et al., 1990].

Von AML1 existieren die drei Isoformen AML1a, AML1b und AML1c, wobei nur die Isoformen AML1b und AML1c sowohl über die C-terminale *Runt*-Domäne als auch über eine N-terminale Transaktivierungs-Domäne verfügen [Miyoshi et al., 1995; Tanaka et al., 1995]. Die Spleißvariante AML1a besitzt dagegen lediglich die *Runt*-Domäne und besitzt keine zusätzliche Transaktivierungs-Domäne [Miyoshi et al., 1995]. Vor allem die Isoform AML1b spielt als transkriptioneller Aktivator eine entscheidende Rolle.

AML1 wird vor allem während der myeloischen Differenzierung in hämatopoetischen Geweben exprimiert [Cheng et al., 1996; Miyoshi et al., 1995; Tanaka et al., 1995], aber auch in Nervengewebe, Skelettmuskeln und im Gewebe der Fortpflanzungsorgane [Okuda et al., 1996]. Studien mit AML1-homozygot negativen Mäusen (AML1^{-/-}) haben bestätigt, daß der Transkriptionsfaktor für eine normale hämatopoetische Entwicklung essentiell ist (Abb.1.1).

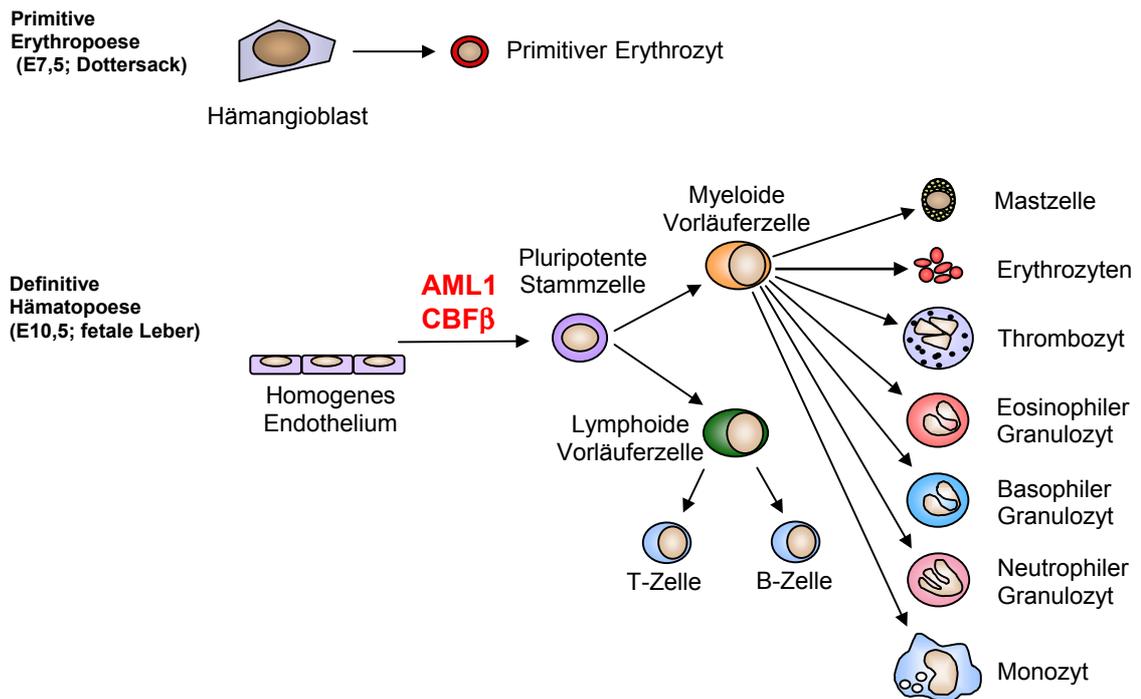


Abb. 1.1. Der AML1/CBF β -Transkriptionsfaktor-Komplex in der Hämatoese [nach Speck et al., 2002]. Der Hämangioblast stellt die Vorläuferzelle für den primitiven Erythroblasten und für Endothelzellen dar, aus dem später die hämatopoetischen Stammzellen hervorgehen. Ab Tag E7.5 entwickeln sich im Dottersack der Maus aus dem Hämangioblast primitive Erythrozyten, welche sowohl für die frühe Sauerstoff- als auch die Nährstoffversorgung des Embryos wichtig sind. Bei der primitiven Dottersack-Erythropoese spielen die Transkriptionsfaktoren AML und CBF β noch keine Rolle, wohingegen sie ab Tag E10.5 bei der Entwicklung der hämatopoetischen Stammzelle (HSC) essentiell sind. Aus der HSC differenzieren die verschiedenen hämatopoetischen Zelllinien aus, die sich später im Knochenmark ansiedeln. Diese Phase wird als „definitive“ oder „fötale“ Leberhämatopoese beschrieben.

Die AML1 - „Knock out“- Mausembryonen verfügen zwar über eine normale Morphogenese und eine primitive Dottersack-Erythropoese. Die Blutbildung in der fötalen Leber ist jedoch stark gestört, so daß die Tiere an Tag E12.5 des mittleren Embryonalstadiums an Blutungen im Gehirn, Pericard und Peritoneum sterben [Okuda et al., 1996; Wang Q. et al., 1996].

Die Expression von AML3 wurde vor allem im Knochengewebe nachgewiesen und ist dort für die Differenzierung der Osteoblasten und somit für die Ossifikation des Knochengewebes essentiell [Otto et al., 2002; Mundlos et al., 1997; Otto et al., 1997]. Obwohl das AML2-Protein in verschiedenen hämatopoetischen Zellen nachgewiesen werden konnte, ist dessen Rolle innerhalb der myeloischen Entwicklung noch unklar [Meyers et al., 1996; Levanon et al., 1994].

Die CBF β -Untereinheit ist homolog zu den Drosophila-Genen *brother* und *big brother* [Golling et al., 1996] und wird ubiquitär exprimiert (Tab. 1.2). Wie bereits erwähnt, verstärkt die Untereinheit CBF β die DNA-Bindung der drei CBF α -Untereinheiten AML1, AML2 und AML3 [Tahirov et al., 2001; Ogawa et al., 1993a], wobei CBF β selbst weder mit der DNA noch mit anderen Kofaktoren interagiert [Licht et al., 2001]. Über die existierenden Isoformen der CBF β -Untereinheit wird die Interaktion des heterodimeren Transkriptionsfaktor-Komplexes mit der DNA indirekt reguliert, indem sie wahrscheinlich die CBF α -Untereinheit in unterschiedlichem Ausmaß vor Ubiquitinierung und somit vor der Degradation schützen [Huang et al., 2001; Ogawa et al., 1993a; Wang et al., 1993].

CBF β ^{-/-}-Mäuse weisen denselben Phänotyp auf wie die bereits beschriebenen AML1^{-/-}-Mäuse [Niki et al., 1997; Castilla et al., 1996; Sasaki et al., 1996]. Die vergleichbaren Phänotypen belegen, daß die beiden Bestandteile des CBF β -Komplexes für eine ungestörte Hämatopoese gleichermaßen erforderlich sind.

Gen	alternative Namen	Chrom.	Funktion	Maus (-/-) Phänotyp	Expression	Assoziierte humane Krankheiten
AML1	RUNX1 CBFA2 PEBP2 α B	21q22.3	definitive Hämatopoese	Embryonal letal. Keine definitive Hämatopoese.	Vor allem in hämatopoetischen Geweben. Zusätzlich in Nervengeweben, Skelettmuskeln, Fortpflanzungsorganen.	Häufiger Translokations- Bruchpunkt. AML, ALL, MDS.
AML2	RUNX3 CBFA3 PEBP2 α C	1q36	Entwicklung des Gastrointestinal- trakts	Tod kurz nach der Geburt, Hyperplasie des Magen- Epitheliums.	Hämatopoetischen Zellen (myeloiden-, B- und T-Zellen)	Keine bekannt. Häufig inaktiviert bei Magen- Karzinomen.
AML3	RUNX2 CBFA1 PEBP2 α A	6p21	Ossifikation des Knochengewebes	Tod bei der Geburt. Fehlende Knochenentwicklung.	Vor allem in Knochen. Zusätzlich in Kolon, Herz, Tonsillen, Kopf/Nacken, Lunge, Eierstöcke.	Skelett-Abnormalitäten. Dysplasie des Schlüsselbeins. Prädisposition für T-Zell- Lymphome nach transgener Überexpression in Mäusen.
CBFβ	CBFb	16q22	definitive Hämatopoese	Embryonal letal. Keine definitive Hämatopoese.	ubiquitär	AML, FAB M4Eo bei inv(16)

Tab. 1.2. Die Familie der heterodimeren Transkriptionsfaktoren CBF („core binding factor“) und ihre Funktionen [nach Licht et al., 2001 und Lund et al., 2002]. AML = akute myeloische Leukämie; RUNX = „Runx-related transcription factor“; CBF = „core binding factor“; PEBP = „polyoma enhancer binding protein“; ALL = akute lymphatische Leukämie; MDS = myelodysplastisches Syndrom.

1.2.3. Die Struktur und Funktion von AML-1

Das AML1-Protein verfügt über eine zentrale RUNT-Domäne (rhd), die sowohl die sequenzspezifische Bindung an die DNA als auch die Heterodimerisierung mit dem Kofaktor CBF β vermittelt (Abb. 1.2). Nach Bindung an die entsprechende Promotorregion der DNA wird die Transkription der Zielgene im Zusammenspiel mit anderen Transkriptionsfaktoren reguliert. So befinden sich häufig neben den AML1-Bindungsstellen in den myeloiden Promotorregionen Bindungsstellen anderer hämatopoetischer Transkriptionsfaktoren wie z.B. PU.1, C/EBP α , ETS-1, MEF, ELF-1, c-Myb und AP-1 [Frank et al., 1999; Mao et al., 1999; Petrovick et al., 1998; Westendorf et al., 1998; Sun et al., 1995; Hernandez-Munain et al., 1994]. Dabei aktivieren die Transkriptionsfaktoren teilweise synergistisch die Transkription des entsprechenden Gens, wobei z.B. die Proteine CEB/ α und PU.1 zusätzlich über die RUNT-Domäne mit dem AML1-Protein interagieren [Vangala et al., 2003; Westendorf et al., 1998; Tenen et al., 1997].

Die transkriptionelle Aktivität wird über verschiedene Chromatin-modulierende Faktoren vermittelt, die im C-terminalen Bereich von AML-1 binden können. Hierbei handelt es sich sowohl um transkriptionelle Koaktivator-Proteine wie CBP/p300 und ALY [Kitabayashi et al., 1998b; Bruhn et al., 1997] als auch um die Korepressoren wie mSin3A und N-CoR [Amann et al., 2001; Lutterbach et al., 1998; Wang et al., 1998]. Außerdem wurde in der Literatur die Interaktion mit weiteren nukleären Proteinen wie YAP, LEF-1, Ear-2 und Hes-1 beschrieben [McLarren et al., 2000, 2001; Yagi et al., 1999; Ahn et al., 1998; Chen et al., 1997; Giese et al., 1995]. Am C-terminalen Ende befindet sich noch ein WRPY-Motiv, über welches das AML1-Protein mit dem humanen Homolog zum Drosophila Groucho-Repressor, TLE-1 und TLE-2 interagieren kann [Uchida et al., 1999; Fisher et al., 1996].

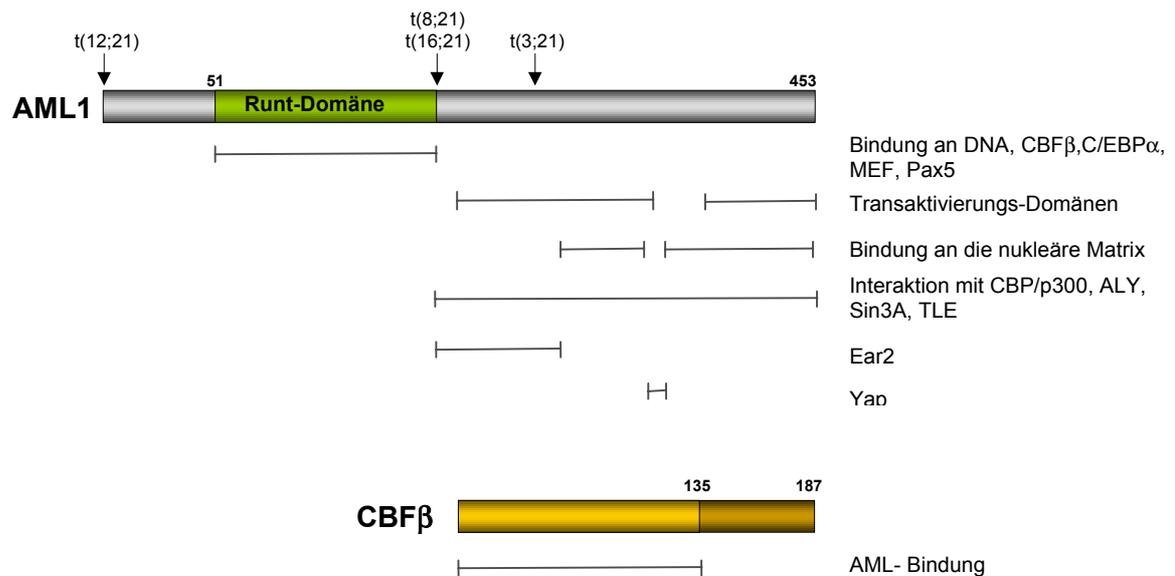


Abb. 1.2. Die Struktur der Proteine AML1 und CBFβ [nach Speck et al., 2002]. Die DNA-Bindung und die Heterodimerisierung mit dem „core-binding factor“ CBFβ werden über die Runt-Domäne (grün) vermittelt. Zusätzlich kooperiert AML1 bei der Aktivierung von Promotoren über diese Domäne mit Transkriptionsfaktoren wie C/EBPα und MEF („myeloid ets factor“). Außerdem sind die zwei Transaktivierungsdomänen im C-terminalen Bereich gezeigt, von denen eine mit der Region überlappt, die die Bindung an die nukleäre Matrix und somit die Colokalisation mit der basalen Transkriptionsmaschinerie vermittelt. Auch die Regionen, in denen verschiedene Faktoren binden können, welche die Modulation der Chromatin-Struktur steuern, sind für einige Faktoren überlappend. Hier interagieren sowohl Koaktivatoren wie CBP/p300 und ALY als auch Korepressoren wie Sin3A und TLE mit AML1. Der transkriptionelle Koaktivator YAP („Yes associated protein“) bindet an ein PPPY-Motif im C-Terminus. Die CBFβ-Untereinheit liegt im Zytosol vor und wird durch die Bindung an die AML1-Domäne mit in den Kern transportiert [Lu et al., 1995]. Hierbei verstärkt CBFβ die Bindung von AML1 an die DNA und schützt das AML1-Protein vor der Proteolyse [Huang et al., 2001].

Die große Anzahl von nukleären Proteinen, die in der Lage sind, kooperativ mit AML1 zu interagieren, verdeutlicht die zentrale Rolle des AML1-Proteins als hämatopoetischer Transkriptionsfaktor (Tab.1.3). Über AML1 werden sowohl die Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren als auch mit Chromatin-modulierenden Proteinen und mit Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie koordiniert [Scandura et al., 2002; Zeng et al., 1998]. Ob AML1 als transkriptioneller Aktivator oder Repressor agiert, hängt stark mit dem entsprechenden Zielgen und mit dem Zelltyp zusammen [Lutterbach et al., 2000]. Die meisten der beschriebenen Zielgene werden jedoch durch den heterodimeren Transkriptionsfaktor aktiviert. Hierzu gehören eine Reihe von Genen in hämatopoetischen Geweben wie z.B. das Interleukin-3 (IL-3) [Uchida et al., 1997], der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende-Faktor (GM-CSF) [Hohaus et al., 1995; Takahashi et al., 1995], der Rezeptor für den Kolonie-stimulierenden-Faktor-1 (CSF-1) [Zhang et al.,

1994], die Neutrophile Elastase [Nuchprayoon et al., 1994], das Granzym B [Wargnier et al., 1995], die Myeloperoxidase [Suzow et al., 1993] und die Untereinheiten des T-Zell- und B-Zell-Antigen-Rezeptors [Prosser et al., 1992; Redondo et al., 1992; Wang et al., 1993; Erman et al., 1998].

AML1 Zielgen	beteiligte Proteine
M-CSF-Rezeptor	PU.1, C/EBP α
GM-CSF	
IL-3	MEF
TCR α,β	TCF/LEF, Ets1, ATF/CREB, ALY
CD11a	
Myeloperoxidase	c-MYB
B-Zell Tyrosin Kinase	PAX5
Mastzell-Protease 6	Mi
c-fos	
Neutrophile-Elastase	

Tab. 1.3. Zusammenfassung der AML1-Zielgene [nach Licht et al., 2001]. Die große Anzahl an nukleären Proteinen, die in der Lage sind, kooperativ mit AML1 zu interagieren, verdeutlicht die zentrale Rolle des AML1-Proteins als hämatopoetischer Transkriptionsfaktor.

1.2.4. Die Bedeutung des AML1/CBF β -Transkriptionsfaktor-Komplexes innerhalb der akuten myeloischen Leukämien

AML1 und der Bindungspartner CBF β sind zwei der am häufigsten von genetischen Veränderungen betroffenen Gene. Diese stehen hierbei immer im Zusammenhang mit verschiedenen Formen der akuten myeloischen sowie der akuten lymphatischen Leukämie. Durch die Gen-Rearrangements kommt es fast immer zum Verlust der im C-terminalen Bereich lokalisierten AML-1-Transaktivierungsdomäne, die durch eine Repressordomäne des Fusionspartners ersetzt wird [Scandura et al., 2002; Speck et al., 2002] (Abb. 1.3). Über die noch vorhandene DNA-Bindungsstelle (Runt-Domäne) binden die Fusionsproteine dennoch im Promotorbereich der AML1-Zielgene, deren Transkription daraufhin reprimiert anstatt aktiviert wird.

Ähnlich wie beim AML1/ETO-Fusionsprotein ist die AML1-Runt-Domäne bei der Translokation t(12;21) mit einer transkriptionellen Repressor-Domäne, hier der des Transkriptionsfaktors TEL, fusioniert. Die t(12;21), die bei 20-25% aller pädiatrischen ALL-

Fällen auftritt [McLean et al., 1996; Liang et al., 1996; Romana et al., 1995], macht zusammen mit der t(8;21) und der inv(16), die zusammen in 24% der AML-Patienten zu finden sind [Look et al., 1997], den größten Anteil der AML1-assoziierten Leukämien aus.

Im Fall der eher selten auftretenden t(3;21) (3% aller AML-Fälle), wird das Fusionsprotein AML1/EVI1 bei Patienten mit einem myelodysplastischem Syndrom (MDS) oder einer CML in der Blastenkrise exprimiert [Mitani et al., 1994; Nucifora et al., 1994]. Hier vermittelt der EVI1-Anteil des Fusionsproteins die transkriptionelle Repression [Sood et al., 1999]. Bei der Inversion (16) entsteht eine Fusion zwischen CBF β und einem Genabschnitt, der für das C-terminale Ende der schweren Kette des Myosins glatter Muskelzellen kodiert („smooth muscle myosin heavy chain“; SMMHC). Der SMMHC-Anteil des Fusionsproteins inhibiert die AML1-vermittelte transkriptionelle Aktivierung und bildet über die „coiled-coiled“ Struktur Oligomere [Scandura et al., 2002; Liu et al., 1993].

	Protein	Translokation	Phänotyp	Häufigkeit
	AML1/ETO	t(8;21)	AML	12%
	TEL/AML1	t(12;21)	B-ALL	25%
	AML1/EVI1	t(3;21)	AML MDS, CML	3%
	CBF β /SMMHC	inv(16)	AML	12%

Abb. 1.3. Struktur von CBF-Fusionsgenen und deren relative Häufigkeit in verschiedenen leukämischen Subtypen [nach Speck et al., 2002]. Durch Gen-Rearrangements kommt es fast immer zum Verlust der Transaktivierungsdomäne von AML1, die durch eine Repressordomäne ersetzt wird. Über die noch vorhandene DNA-Bindungsstelle (Runt-Domäne) binden die Fusionsproteine dennoch an die AML1-Zielgene, deren Expression daraufhin reprimiert anstatt aktiviert wird.

Die t(8;21) wird bei 40% aller Patienten mit einer Leukämie vom Typ AML-M2 diagnostiziert, wobei sie innerhalb aller akuten myeloischen Leukämien einen Anteil von 12% ausmacht. Durch die Translokation t(8;21) kommt es zur Fusion der Gene AML1 auf Chromosom 21 und ETO auf Chromosom 8. Hierbei entsteht ein chimäres Protein, in welchem die Runt-Domäne von AML1 mit dem fast kompletten ETO-Protein fusioniert ist (Abb. 1.4) [Miyoshi et al., 1993; Erickson et al., 1992]. Aufgrund seiner Beteiligung an der

Translokation t(8;21) wurde ETO ("eight twenty one") erstmals beschrieben [Miyoshi et al., 1991].

ETO ist ein nukleäres Phosphoprotein, welches das humane Homolog zum *Drosophila*-Gen „Nervy“ darstellt. Bei *Drosophila* ist das „Nervy“-Protein an der Entwicklung des ZNS beteiligt [Feinstein et al., 1995]. Über die Funktionen der humanen Mitglieder der ETO-Familie (ETO, MTGR1 und MTG16 [Davis et al., 1999; Gamou et al., 1998; Kitabayashi 1998a]) ist bis jetzt nicht viel bekannt. Exprimiert werden die ETO-Proteine überwiegend in Gehirn, Herz, Lunge und Testis [Wolford et al., 1998; Erickson et al., 1994]. Die Expression der ETO-Proteine wurden auch in CD34⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen nachgewiesen, war allerdings in den differenzierten Leukozyten nicht mehr detektierbar [Erickson et al., 1996].

Besonders in vier Regionen, den sog. "Nervy"-Homologie-Domänen, verfügt ETO über eine große Homologie zu dem *Drosophila*-Protein. Die Region NHR1 verfügt zusätzlich über einen Bereich, der homolog zu dem transkriptionellen Koaktivator-Protein TAF110 [Erickson et al., 1994] ist. Außerdem ist dort das nukleäre Importsignal zu finden [Odaka et al., 2000]. Bei der NHR2-Region handelt es sich um eine amphipathische Helix, die für die Bildung von stabilen ETO/ETO-Homodimeren sowie ETO/MTGR1- und AML1-ETO/ETO-Heterodimeren erforderlich ist [Kitabayashi et al., 1998a; Lutterbach et al., 1998]. Über die Funktion der NHR3-Domäne ist noch nicht viel bekannt, wohingegen die NHR4-Domäne über zwei Zink-Finger-Motive verfügt [Kitabayashi et al., 1998a]. Diese Domäne wird auch als MYND-Motiv bezeichnet („Myeloid Nervy and Death-1“) und ist für die Interaktion mit dem nukleären Rezeptor Korepressor N-CoR verantwortlich [Gelmetti et al., 1998; Lutterbach et al., 1998; Wang et al., 1998]. Aber auch über die Interaktion mit dem Protein mSin3A, welches die Histon-Deacetylasen 1-3 rekrutiert, fungiert ETO als Repressor-Protein [Amann et al., 2001; Hildebrand et al., 2001].

Wie bereits erwähnt, ist über die Funktion des ETO-Proteins bisher sehr wenig bekannt. Zumindest weisen ETO^{-/-}-Mäuse keine Defekte im hämatopoetischen System auf [Calabi et al., 2001]. Dennoch wird vermutet, daß ETO aufgrund seiner Lokalisation im Kern und der beschriebenen Strukturen ein transkriptioneller Regulator ist [Melnick et al., 2000b].

1.2.5. AML1 und AML1/ETO: vom Transaktivator zum Repressor

Die Translokation t(8;21) führt zur Expression des AML1/ETO-Fusionsproteins, in welchem die DNA-bindende Domäne (Runt-Domäne) von AML1 mit dem fast kompletten ETO-Protein fusioniert ist (Abb. 1.4). Das daraus resultierende 95 kDa große Fusionsprotein ist im Nukleus lokalisiert, wobei das entsprechende Kernlokalisations-Signal jetzt vom ETO-Protein stammt [Sacchi et al., 1996; Tanaka et al., 1998].

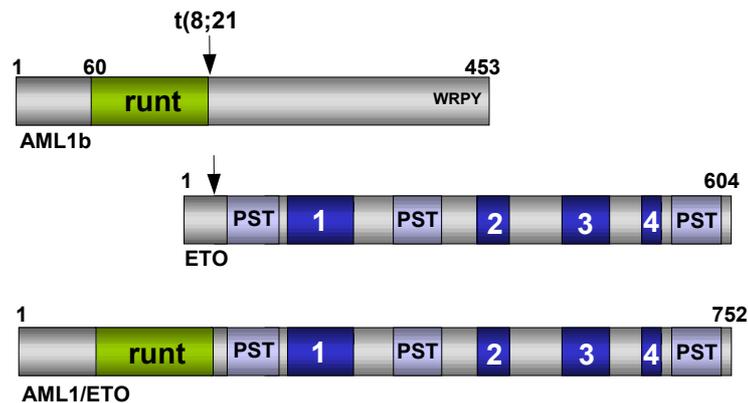


Abb. 1.4. Schematische Darstellung der Gene AML1b, ETO und dem aus der Translokation t(8;21) resultierenden Fusionsgen AML1/ETO [nach Nucifora et al., 1994 und Kitabayashi et al., 1998]. Die Pfeile markieren den Translokationsbruchpunkt, der im AML1-Gen unmittelbar nach dem letzten für die rhd-Domäne codierenden Exon liegt. Im ETO-Gen befindet sich die Bruchstelle sehr weit am 5'-Ende, so daß das resultierende Fusionsgen fast die komplette ETO-Sequenz beinhaltet. PST steht für Prolin/Serin/Threonin-reiche Region; die Zahlen 1-4 kennzeichnen die NHR-Domänen.

AML1/ETO wirkt als dominanter Inhibitor der AML1-vermittelten transkriptionellen Regulation wichtiger hämatopoetischer Zielgene (Abb. 1.5). Dieser Effekt wird durch die Interaktion des ETO-Anteils mit den Korepressoren N-CoR, SMRT und mSin3A vermittelt [Gelmetti et al., 1998; Lutterbach et al., 1998; Wang et al., 1998]. Das Fusionsprotein bindet über die Runt-Domäne an AML1-spezifische Sequenzen der verschiedenen Promotoren. Die Bindung an die DNA wird hierbei weiter durch die Untereinheit CBF β verstärkt [Meyers et al., 1993], wobei AML1/ETO sogar eine höhere Affinität zu CBF β aufweist als Wildtyp-AML1 [Tanaka et al., 1998]. Durch den Verlust der C-terminalen Transaktivierungsdomänen von AML1 wird sowohl die Regulation über die spezifischen Koaktivatoren als auch die Korepressoren unterbunden. Eines der wichtigsten Koaktivator-Signale vermittelt der Histon-Acetyltransferase-Komplex bestehend aus p300/CBP und p/CAF. Die Acetylierung der Histone führt zu einer aufgelockerten Chromatinstruktur, die sowohl für spezifische Transkriptionsfaktoren als auch für die basale

Transkriptionsmaschinerie (RNA-Polymerase II und basale Transkriptionsfaktoren wie TBP und TFIIB) zugänglich ist [Blobel et al., 2000]. Im AML1/ETO-Fusionsprotein rekrutieren die Korepressor-Moleküle N-CoR und mSin3A Histon-Deacetylasen, die zu einer konstitutiv deacetylierten Chromatinstruktur führen. Somit bleibt die DNA unzugänglich für spezifische Transkriptionsfaktoren und die Transkriptionsmaschinerie, was zur transkriptionellen Repression der AML1-Zielgene führt (Abb. 1.5). Dieser reprimierende Effekt wird zusätzlich dadurch verstärkt, daß AML1/ETO auch die Funktion anderer transkriptioneller Aktivatoren blockiert. Normalerweise aktivieren AML1 und C/EBP α synergistisch verschiedene myeloische Promotoren. *In vitro*-Untersuchungen haben aber gezeigt, daß AML1/ETO sowohl die transkriptionelle Aktivität von AML1 als auch von C/EBP α blockiert [Westendorf et al., 1998]. Außerdem reprimiert AML1/ETO *per se* die Expression des Transkriptionsfaktors C/EBP α , der vor allem die Differenzierung der neutrophilen Granulozyten stimuliert. So konnte gezeigt werden, daß die C/EBP α -mRNA-Spiegel in AML1/ETO-positiven Blasten im Vergleich zu leukämischen Blasten anderer myeloischen Leukämien um das 8-fache verringert waren. Auch in der t(8;21)-positiven Kasumi-1-Zelllinie konnten im Vergleich zu U937-Zellen stark verminderte C/EBP α -mRNA-Spiegel nachgewiesen werden. Wurde die Expression des Transkriptionsfaktors C/EBP α in den Kasumi-1-Zellen über ein Tamoxifen-regulierbares Konstrukt induziert, so konnte der Differenzierungsblock in den Kasumi-1-Zellen überwunden werden [Pabst et al., 2001]. Ein ähnlicher Sachverhalt wurde diesbezüglich auch für den Transkriptionsfaktor PU.1 dargestellt [Vangala et al., 2003], der die Aktivität vieler myeloischer und lymphoider Promotoren reguliert [Anderson et al., 2000; Shikami et al., 1999; Hohaus et al., 1995; Voso et al., 1994; Zhang et al., 1994]. So konnte gezeigt werden, daß AML1/ETO die Bindung des Koaktivators c-Jun an PU.1 kompetitiert und zusätzlich die Expression des Transkriptionsfaktors PU.1 in myeloischen Zellen inhibiert. Auch hier konnte durch die Überexpression von PU.1 der Differenzierungsblock in den t(8;21)-positiven Kasumi-1-Zellen überwunden werden. Dieser dominant inhibitorische Effekt von AML1/ETO wurde außerdem für den myeloischen Transkriptionsfaktor MEF ("myeloid ets factor") gezeigt, der normalerweise synergistisch mit AML1 die Expression des IL-3-Promotors steuert [Mao et al., 1999; Uchida et al., 1997]. Auch die Aktivierung des TCR β -Enhancers durch AML1 wird durch das Fusionsprotein AML1/ETO unterbunden und konnte in *in vitro*-Studien auch noch beobachtet werden, wenn das AML1-Konstrukt in einem weitaus höheren Verhältnis zum AML1/ETO-Plasmid kotransfiziert wurde [Takahashi et al., 1995; Meyers et al., 1993].

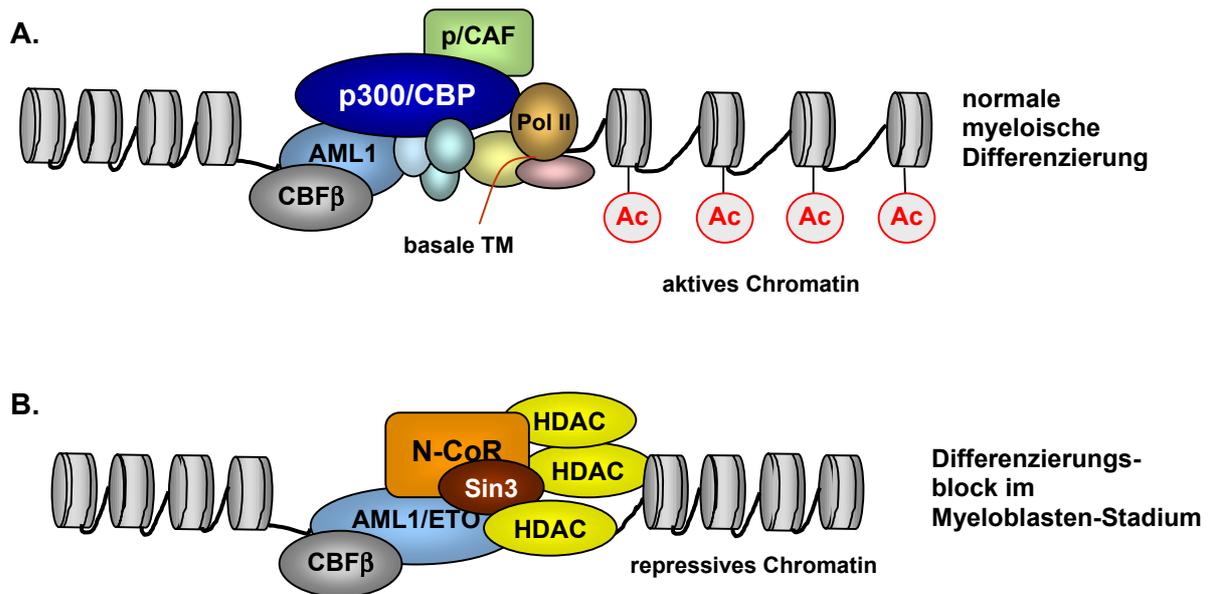


Abb. 1.5. Schematische Darstellung der Auswirkungen des Fusionsproteins AML1/ETO auf die Chromatinstruktur und die transkriptionelle Aktivität [nach Kitabayashi et al., 1998a und Gelmetti et al., 1998]. (A) AML1 bindet über die Runt-Domäne an AML1-spezifische Sequenzen in der DNA und rekrutiert über die Transaktivierungs-Domänen den Histon-Acetyltransferase-Komplex bestehend aus p300/CBP und p/CAF. Die Acetylierung der Histone führt zu einer aufgelockerten Chromatinstruktur, die sowohl für spezifische Transkriptionsfaktoren als auch für die basale Transkriptionsmaschinerie (RNA-Polymerase II und basale Transkriptionsfaktoren wie TBP und TFIIIB) zugänglich ist. **(B)** Das AML1/ETO-Fusionsprotein bindet über die Runt-Domäne ebenfalls an AML1-spezifische Sequenzen. Über den ETO-Anteil werden aber die Korepressor-Moleküle N-CoR und mSin3A und Histon-Deacetylasen rekrutiert, die zu einer konstitutiv deacetylierten Chromatinstruktur führen. Somit bleibt die DNA unzugänglich für spezifische Transkriptionsfaktoren und die Transkriptionsmaschinerie, was zur transkriptionellen Repression der AML1-Zielgene führt.

Aber nicht nur die Repression AML1-abhängiger Gene, die zum Differenzierungsblock in den myeloischen Vorläuferzellen führt, spielt bei der AML1/ETO-induzierten leukämischen Transformation der hämatopoetischen Vorläuferzellen eine Rolle. So aktiviert das AML1/ETO-Fusionsprotein zusammen mit AML1 sowohl den bcl2- als auch den M-CSF-Promotor [Klampfer et al., 1996; Rhoades et al., 1996]. Eine Überexpression des M-CSF-Rezeptors wird für die t(8;21) positive Zelllinie Kasumi-1 und für Proben von AML1/ETO-positiven Patienten beschrieben [Rhoades et al., 1996]. Die Aktivierung des M-CSF-Rezeptors fördert die Zellproliferation und verstärkt somit den onkogenen Effekt in AML1/ETO-transformierten Zellen [Borycki et al., 1995; Matsushima et al., 1991]. Die physiologische Relevanz des bcl2-Gens als Ziel für eine Dysregulation durch AML1/ETO ist bis jetzt unklar. Untersuchungen zeigten, daß die Expression des antiapoptischen

Proteins Bcl2 in Proben von Leukämie-Patienten mit einer t(8;21) im Vergleich zu anderen Leukämie-Patienten eher geringer war [Banker et al., 1998].

1.2.6. STAT5: „signal transducer and activator of transcription“

Von STAT5 existieren zwei Isoformen STAT5a und STAT5b, die eine 95%ige Homologie aufweisen [Darnell et al., 1997; Wang D et al., 1996; Schaefer et al., 1995]. STAT5 liegt im Zytoplasma als inaktiver Transkriptionsfaktor vor und wird nach Bindung über seine SH2-Domäne an Phosphotyrosin-Motive der aktivierten GM-CSF-, IL-3- oder IL-5- Rezeptoren von den assoziierten JAK2 spezifisch an Tyrosin Y694 (STAT5b: Y699) im C-terminalen Bereich phosphoryliert [Barber et al., 2001; Leonard et al., 2001; Azam et al., 1995; Quelle et al., 1995]. Die phosphorylierten STAT5-Moleküle bilden über eine reziproke Interaktion zwischen dem Phosphotyrosin im C-terminalen Bereich und der SH2-Domäne homo- und heterodimere Moleküle. Diese STAT5-Dimere werden anschließend sehr schnell in den Kern transloziert, wo sie mit unterschiedlicher Bindungsaffinität an eine spezifische DNA-Konsensussequenz binden und die Transkription spezifischer Gene aktivieren [Ehret et al., 2001; Hoey et al., 1998; Ihle et al., 1996]. Dabei rekrutiert der Transkriptionsfaktor-Komplex nukleäre Ko-Aktivatoren und die basale Transkriptionsmaschinerie [Zhang 2001, 1999]. Der STAT5-Signalweg wird zusätzlich durch weitere zelluläre Kinasen, wie z.B. den MAP-Kinasen („mitogen-activated protein“) beeinflusst. Durch eine MAP-Kinase-abhängige Phosphorylierung eines Serinrests in der C-terminalen Transaktivierungsdomäne von STAT5 wird dessen transkriptionelle Aktivität weiter gesteigert [Decker et al., 2000]. Der JAK/STAT-Signalweg wird über Protein-Tyrosin-Phosphatasen wie SHP-1 und SHP-2 negativ reguliert; hierbei werden die aktivierten JAKs dephosphoryliert [Rane et al., 2002].

1.2.7. Die Rolle von STAT5 in der Leukämieentstehung

Die konstitutive Aktivierung des STAT5-Signalwegs ist bei vielen Leukämien mit bestimmten Translokationen assoziiert [Spiekermann et al., 2002; Santos et al., 2001; Hayakawa et al., 2000; Mizuki et al., 2000; Lin et al., 2000; Lacronique et al., 1997]. Eines der wohl am besten untersuchten Beispiele ist das Fusionsprotein BCR/ABL der Translokation t(9;22), die bei etwa 90% der Patienten mit einer chronischen myeloischen Leukämie vorliegt. Die onkogenen Eigenschaften der konstitutiv aktiven Abl-Kinase werden hauptsächlich über den STAT5-Signalweg vermittelt [Gesbert et al., 2000; Nieborowska-Skorska et al., 1999; Carlesso et al., 1996; Shuai et al., 1996].

Eine verstärkte STAT5-Aktivität ist auch für die Zelllinie Kasumi-1 beschrieben [Spiekermann et al., 2001], welche endogen das AML1/ETO-Fusionsprotein exprimiert

[Asou et al., 1991]. Eigene Untersuchungen zeigten, daß die AML1/ETO-Expression in der hämatopoetischen Zelllinie TF-1 zu einer verlängerten STAT5-Aktivität führt (Kapitel 1.2.8). Darüber hinaus belegen Studien, in denen eine Vielzahl von Blastenproben verschiedener AML-Patienten untersucht wurden, daß bei akuten myeloischen Leukämien häufig eine erhöhte STAT5-Aktivität vorliegt [Spiekermann et al., 2002; Biethahn et al., 1999; Hayakawa et al., 1998; Xia et al., 1998; Gouilleux-Gruart et al., 1996]. Hayakawa et al. (1998) stellten in Western-Blot-Analysen fest, daß in 40/50 untersuchten AML-Proben STAT5 konstitutiv phosphoryliert war. Parallel wurden Proben normaler Knochenmarkzellen getestet, in welchen eine Tyrosinphosphorylierung der STAT5-Moleküle nicht vorlag. In Gelshiftexperimenten (EMSA) wurde zusätzlich gezeigt, daß die phosphorylierten STATs aktiviert sind und an DNA binden. Die DNA-Bindung an die verwendeten Sequenzen des β -Kasein-Promotors wurde in 13/17 und nach einer Untersuchung von Xia et al. (1998) in 12/36 Proben von AML-Patienten nachgewiesen.

Etwa 70% der Blastenzellen, die von AML-Patienten isoliert werden, proliferierten nach G-CSF- und GM-CSF-Stimulation. Normale myeloische Zellen differenzieren hingegen. Diese Beobachtung ist ein Hinweis darauf, daß bei der akuten myeloischen Leukämie häufig eine Dysregulation im G-CSF- und GM-CSF-vermittelten JAK/STAT5-Signalweg vorliegt [Shinjo et al., 1997; Jahns-Streubel et al., 1995].

Eine Inhibition des STAT-Signalwegs z.B. über dominant-negative STAT5-Mutanten oder über chemische Kinaseinhibitoren führte in entsprechenden Tumorzellen und in AML-Blasten zu einem Wachstumsarrest oder zur Apoptose der Zellen [Spiekermann et al., 2002; Bowman et al., 2000; Bromberg et al., 2000; Lin et al., 2000; Rosa-Santos et al., 2000; Catlett-Falcone et al., 1999; Wang D et al., 1996]. Die STAT5-Aktivität der im folgenden Kapitel 1.2.8 beschriebenen AML1/ETO-transformierten TF-1-Zellen wurde mit einem STAT5-antagonistischem Peptid aufgehoben. Im Einsatz solcher Peptid-Aptamere liegt ein großes Potential für zukünftige Therapieansätze in der Behandlung von Leukämien (Kap. 1.3).

1.2.8. Inhibition des Wachstums AML1/ETO-transformierter TF-1-Zellen durch den Einsatz eines STAT5-antagonistischen Peptids

In Voruntersuchungen zu dieser Arbeit wurde der transformierende Effekt des AML1/ETO-Proteins in der hämatopoetischen Zelllinie TF-1 untersucht. Die TF-1-Zellen stammen von einem Patienten mit einer Erythroleukämie (AML-M6), wachsen IL-3-abhängig und können in Gegenwart von Erythropoetin (EPO) in Richtung Erythrozyten differenzieren [Kitamura et al., 1989]. Die AML1/ETO-Expression führte in den TF-1-Zellklonen zu einem für dieses Fusionsprotein typischen Differenzierungsblock [Hildebrand et al., 1998; Maurer et al., 1997]. Darüber hinaus war die Koloniebildung der transformierten Zellen bei niedrigen IL-3-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle deutlich erhöht [Hildebrand et al., 1998].

Ein verstärktes Wachstum wird auch für AML-Blasten beschrieben, die nach G-CSF- und GM-CSF-Stimulation proliferieren, während normale myeloische Zellen differenzieren. Somit scheint bei akuten myeloischen Leukämien häufig eine Dysregulation im G-CSF- und GM-CSF-vermittelten JAK/STAT5-Signalweg vorzuliegen (Kapitel 1.2.7). Die konstitutive Aktivierung des STAT5-Proteins wurde in zahlreichen Blastenproben von AML-Patienten nachgewiesen (Kapitel 1.2.7). Auch in AML1/ETO-transformierten TF-1-Zellen konnte nach IL-3-Stimulation im Vergleich zu TF1-Wildtypzellen eine verlängerte STAT5-Aktivität festgestellt werden.

Um die biologische Bedeutung der verlängerten STAT5-Aktivität der AML1/ETO-transformierten TF-1-Zellen zu untersuchen, wurde ein Peptid synthetisiert (Eurogentec, Seraing/Belgien), welches die STAT5-Aktivität hemmen sollte. Das Peptid besitzt ein 8 Aminosäuren umfassendes Motiv um das C-terminale Tyrosin 694 von STAT5, welches im Wildtyp-STAT5-Molekül zu dessen Aktivierung phosphoryliert wird. Normalerweise bilden phosphorylierte STAT5-Moleküle über eine reziproke Interaktion zwischen dem Phosphotyrosin im C-terminalen Bereich und der nahegelegenen SH2-Domäne STAT5-Dimere (Abb. 1.6B). Diese Dimere wandern anschließend sehr schnell in den Kern, wo sie an eine spezifische DNA-Konsensussequenz binden und die Transkription verschiedener Gene aktivieren. Das synthetische Phosphopeptid, welches ebenfalls über das Phosphotyrosin 694 verfügt, soll an die SH2-Domäne der STAT5-Moleküle binden und so die Dimerisierung der STATs und den Transport in den Kern hemmen (Abb. 1.6B). Zusätzlich enthält das Peptid N-terminal eine 18 Aminosäuren umfassende Sequenz (Abb. 1.6A, unterstrichen) der Homöodomäne des Transkriptionsfaktors Antennapedia, welche die Aufnahme der Peptide in die Zelle ermöglicht [Derossi et al., 1998, 1994]. Darüber hinaus ist das Peptid zusätzlich mit einem N-terminalen Biotin-Marker versehen.

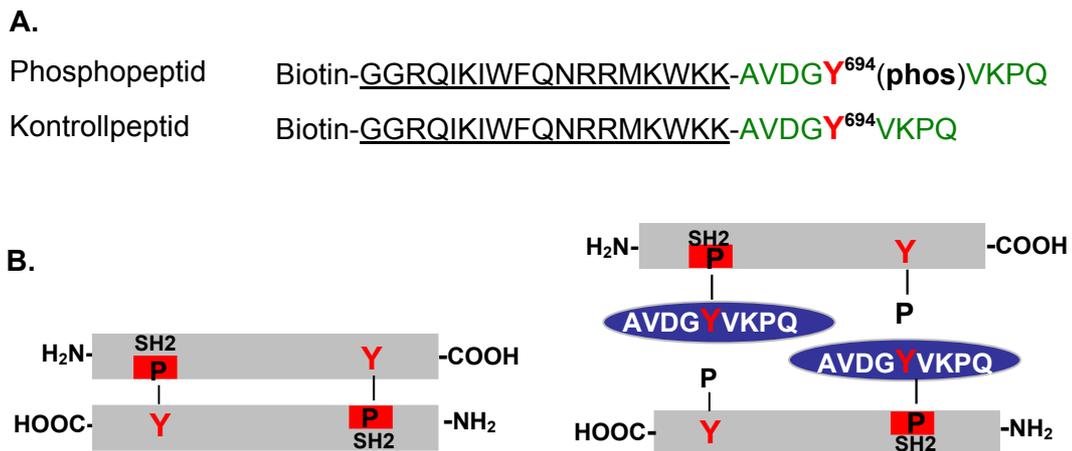


Abb. 1.6. Struktur und Funktion des STAT5-antagonistischen Peptids. (A) Um die biologische Bedeutung der verlängerten STAT5-Aktivität in AML1/ETO-transformierten TF-1-Zellen zu untersuchen, wurde ein STAT5-antagonistisches Peptid synthetisiert. Das Peptid besitzt ein 8 Aminosäuren umfassendes Motiv (grün) um das C-terminale Tyrosin (Y) 694, welches im Phosphopeptid phosphoryliert (**phos**) und im Kontrollpeptid dephosphoryliert ist. Zusätzlich enthält das Peptid N-terminal eine 18 Aminosäuren umfassende Sequenz der Homöodomäne des Transkriptionsfaktors Antennapedia (unterstrichen), welche für die Aufnahme der Peptide in die Zelle verantwortlich ist. Um das Peptid nachweisen zu können, ist es zusätzlich mit einem N-terminalen Biotin-Marker versehen. (B) Phosphorylierte STAT5-Moleküle bilden über eine reziproke Interaktion zwischen dem Phosphotyrosin 694 im C-terminalen Bereich und der SH2-Domäne STAT5-Dimere. Diese Dimere werden schnell in den Kern transloziert, wo sie an eine spezifische DNA-Konsensussequenz binden und die Transkription verschiedener Gene aktivieren. Das Phosphopeptid, das ebenfalls über das Phosphotyrosin 694 verfügt, soll an die SH2-Domäne der STAT5-Moleküle binden und so die Dimerisierung der STATs hemmen.

Da eine verlängerte Aktivierung des STAT5-Signalwegs in transformierten Zellen mit einer vermehrten Proliferation der Zellen in Verbindung gebracht wird, wurde die Proliferation des AML1/ETO-transformierten TF-1-Zellklons in Anwesenheit des Phosphopeptids untersucht. Das Phosphopeptid führte zu einem Wachstumsarrest der AML1/ETO-transformierten TF1-, nicht aber der TF-1-Wildtypzellen. Diese spezifische Wirkung hatte das Phosphopeptid auch auf die Proliferation der hämatopoetischen Zelllinie Kasumi-1. Kasumi-1-Zellen sind humane myeloische Leukämiezellen, die aus dem peripheren Blut eines Patienten mit akuter myeloischer Leukämie gewonnen wurden. Im Gegensatz zu TF-1-Wildtypzellen tragen Kasumi-1 die Translokation t(8;21) und exprimieren das AML1/ETO-Fusionsgen. Auch für die Zelllinie Kasumi-1 wurde bereits eine verstärkte Phosphorylierung des STAT5-Proteins beschrieben [Spiekermann et al., 2001]. Die Spezifität des Phosphopeptids wurde zusätzlich durch das Kontrollpeptid bestätigt, welches weder Einfluß auf das Koloniewachstum der AML1/ETO-transformierten TF-1- noch auf das der Kasumi-1-Zellen hatte. Dieses Kontrollpeptid unterschied sich in der Sequenz lediglich durch das nicht phosphorylierte Tyrosin im C-Terminus und konnte somit nicht mit der SH2-Domäne eines Signalproteins (STAT5) interagieren.

Die Behandlung einer Leukämie ist für den Patienten immer mit sehr starken Nebenwirkungen verbunden (Kap.1.1.4). Die momentan zur Therapie verfügbaren Chemotherapeutika haben nur eine sehr geringe Selektivität bezüglich ihrer toxischen Wirkung auf leukämische Knochenmarkzellen, weshalb in letzter Konsequenz auch immer gesunde Knochenmarkzellen abgetötet werden. Das Ziel alternativer Behandlungsansätze ist es daher immer, ein Therapeutikum zu entwickeln, das sich spezifisch gegen die leukämischen Blasten richtet, ohne dabei die gesunden Knochenmarkzellen anzugreifen. In Methylzellulosekulturen konnte gezeigt werden, daß sich die Wirkung des Phosphopeptids auf leukämische Zellen beschränkt. Hierfür wurde der Einfluß des Phosphopeptids auf das Wachstum und die Differenzierung von CD34⁺-Zellen eines gesunden Spenders untersucht. Die CD34⁺-Zellen können unter dem Einfluß verschiedener humaner Wachstumsfaktoren zu kleinen Kolonien ausdifferenzieren, die sich morphologisch bestimmten Zelltypen der myeloischen und der erythroiden Reihe zuordnen lassen. Die Frequenz und die Größe der Koloniebildung wurden nicht durch das Phosphopeptid beeinflusst. Dies bedeutet auch, daß die Differenzierung der CD34⁺-Zellen nicht durch das aktive Peptid beeinträchtigt wurde.

Das Phosphopeptid wirkte sehr effizient und spezifisch. Im Einsatz solcher Peptid-Aptamere liegt ein großes Potential für zukünftige Therapieansätze in der Behandlung von Leukämien. Zum einen könnten weitere Peptide wie das antagonistische STAT5-Peptid von bekannten Strukturen abgeleitet werden. Zum anderen könnten Peptide, welche in der Lage sind, die AML1/ETO-transformierenden Eigenschaften aufzuheben, aus hochkomplexen Peptid-Bibliothek identifiziert werden (Kap. 1.3). Um solche Peptid-Bibliotheken effizient und schnell nach ETO-inhibierenden Peptiden zu durchsuchen, muß allerdings ein spezifisches Selektionssystem etabliert werden.

1.3. Peptid-Aptamere: kleine Moleküle mit einer hohen Bioaktivität

1.3.1. Die Identifizierung von Peptid-Aptameren

Peptid-Protein-Interaktionen spielen eine essentielle Rolle in der Zellbiologie. So werden die meisten Signale von der Zelloberfläche nach spezifischer Bindung kleiner Peptidmoleküle an verschiedene Wachstumsrezeptoren aktiviert. Die Signaltransduktion innerhalb der Zelle wird dann nach Dimerisierung oder Oligomerisierung des Rezeptors und dessen Phosphorylierung über intrinsische oder andere zytoplasmatische Serin- oder Tyrosinkinase über weitere Signalpeptide oder Proteine vermittelt. Bei den verschiedenen über Phosphorylierung aktivierten Signal- und Adapterproteinen kann es sich z.B. um Transkriptionsfaktoren oder um Proteine, die Transkriptionsfaktoren aktivieren, handeln. Die veränderte transkriptionelle Aktivität der Zelle beeinflusst deren Proliferations- und Differenzierungsverhalten nachhaltig. Sind solche Gene mutiert oder werden sie überexprimiert, wirken sie oft onkogen und können somit zur Transformation der Zelle führen [Blume-Jensen et al., 2001; Look et al., 1997].

Aufgrund des Wissens über diese spezifischen „Protein-Protein“-Interaktionen sind verschiedene Methoden entwickelt worden, mit deren Hilfe Peptide identifiziert werden können, die über Protein-Protein-Bindung mit einem bestimmten Zielprotein wechselwirken und so dessen Interaktion mit dem eigentlichen Signalprotein verhindern oder wichtige katalytische Domänen besetzen und inhibieren [Fabbro et al., 2002; Krämer et al., 2001; Paul et al., 2001]. Ziel ist es dabei, ein Peptid zu finden, das auch *in vivo* durch seine spezifische Bindung einen entsprechenden Signalweg unterbricht und dadurch z.B. die transformierenden Eigenschaften unterbindet (Abb. 1.10).

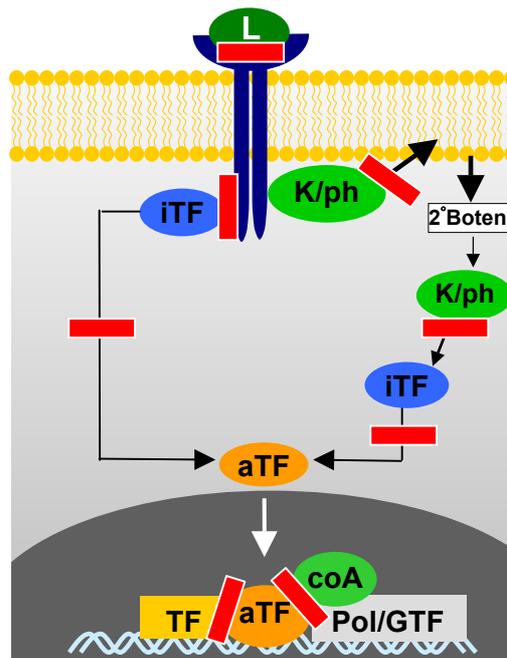


Abb. 1.10. Generalisierter Signalweg und mögliche Angriffspunkte für Peptide. Das humane Genom kodiert für eine große Anzahl verschiedener zellulärer Rezeptoren und ihre Liganden. In der Abbildung sind die Schlüsselreaktionen der Signalwege, die letztlich zu einer veränderten Transkription der zellulären Gene führt, dargestellt. Bei einem inaktiven Transkriptionsfaktor (iTf) kann es sich beispielsweise um ein STAT-Molekül handeln, das durch eine aktivierte Rezeptorkinase phosphoryliert und dadurch aktiviert wird. Die Phosphorylierung kann dabei auch durch zytoplasmatische Kinasen (K/ph) vollzogen werden, die zuvor durch sekundäre Botenstoffe (2° Boten = Ins_3P , DAG, Ca^{2+}) aktiviert wurden. Die aktiven Transkriptionsfaktoren (aTf) wandern teilweise erst nach Dimerisierung in den Zellkern und aktivieren zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren (TF) und transkriptionellen Koaktivatoren (coA) die Expression verschiedener Gene (Pol/GTF = Polymerase und basale Transkriptionsfaktoren). Mit Hilfe von Peptiden sollen diese Signalwege spezifisch unterbrochen werden. Dabei können diese Peptide die Bindung des Liganden (L) an einen Rezeptor, die Bindung des Signalproteins an den zytoplasmatischen Teil des phosphorylierten Rezeptors, die Dimerisierung der aktivierten Transkriptionsfaktoren oder den Aufbau von Transkriptionsfaktor-Komplexen verhindern, um so den Signalweg zu unterbrechen.

Ein solches Peptid kann über seine dreidimensionale Struktur und seine spezifische Sequenz so gestaltet werden, daß es mit hoher Wahrscheinlichkeit an ein ausgewähltes Zielmolekül wie etwa einen Zytokinrezeptor bindet und dieses blockiert. So wurden beispielsweise zellgängige Peptide entwickelt, die in der Lage waren, *in vitro* den über ERK vermittelten mitogenen MAP-Kinase-Signalweg zu unterbinden [Kelemen et al., 2002]. Auch die Proliferation BCR/ABL-transformierter Leukämie-Zellen konnte mit Hilfe eines Peptides, das die SH3-Domäne des Adapterproteins Grb2 blockiert, inhibiert werden. Dabei stellt die Blockade von SH2- und SH3-Domänen von Signalproteinen durch inhibitorische Peptide ein interessantes Ziel dar, da über diese Domänen die Signaltransduktion über weitere Adapterproteine oder MAP-Kinasen bis in den Kern

weitergeleitet wird [Fabbro et al., 2002; Feller et al., 1998; Yu et al., 1994]. Im Fall des BCR/ABL Fusionsproteins nimmt das Adapterprotein Grb in der Signalkaskade der konstitutiv aktiven ABL-Kinase des BCR/ABL-Fusionsproteins eine zentrale Rolle in der Weitervermittlung der mitogenen Signale ein [Kardinal et al., 2001; Feller et al., 1994].

Außerdem werden Peptidsequenzen, die sich gegen ein entsprechendes Zielmolekül richten, mit einem geeigneten Suchsystem aus hochkomplexen „Peptid-Bibliotheken“ ($\geq 10^8$ verschiedene Moleküle) identifiziert. Eine der bekanntesten Methoden, mit der solche Peptid-Aptamere (aptus: passen; meros: Teil) aus hochkomplexen Peptid-Bibliotheken identifiziert werden können, ist das „Yeast two-hybrid“-System [Fields et al., 1994]. Hierbei wird das Zielprotein mit einer Gal4-DNA-bindenden Domäne exprimiert („bait“). Über eine „Peptid-Bibliothek“ werden die verschiedenen, bis zu 20 Aminosäuren langen Peptide als Fusion mit einer Transaktivierungsdomäne in Hefen eingebracht („prey“). Bindet eines der Peptide an das Zielprotein, kommt es zur transkriptionellen Aktivierung des Selektionsmarkers, der zur Identifizierung der entsprechenden Hefeklonen dient. Das Expressionsplasmid wird dann wieder aus dem positiven Hefeklon isoliert, um die Peptidsequenz über Sequenzierreaktionen zu identifizieren. Der Nachteil dieses Systems liegt darin, daß bestimmte posttranslationale Modifizierungen in der Hefe nicht durchgeführt werden können. Daher muß hierbei immer in Betracht gezogen werden, daß die Zielproteine eventuell nicht korrekt gefaltet werden und sich dadurch von dem in Säugerzellen exprimierten Protein unterscheiden können [Hoppe-Seyler et al., 2001]. Dies führt wiederum dazu, daß die aus einem Hefe-„Screen“ identifizierten Peptid-Aptamere nicht zwangsläufig in humanen Zellen zum gleichen Effekt führen [Butz et al., 2000]. Dieses Problem kann in Zukunft durch die Entwicklung von Selektionssystemen, bei denen humane Zelllinien eingesetzt werden, umgangen werden. Der erste erfolgreiche Einsatz einer retroviralen „Peptid-Bibliothek“ in einer humanen Zelllinie gelang 2001 Xu et al. Dabei wurde in HeLa-Zellen gezeigt, daß eine durch Taxol induzierte verminderte Aktivität der proteasomalen 20S-Untereinheit zu einer erhöhten Expression des MDR-Proteins und somit in der Krebszelllinie zu einer Resistenz gegen die Substanz Taxol führt [Xu et al., 2001].

Die Funktion solcher Peptid-Aptamere kann sehr vielfältig sein. Zum einen können solche Peptide gezielt gegen bekannte Zielproteine gerichtet werden, um deren Funktion in einem bestimmten Signalweg und dessen Auswirkung auf den Phänotyp der Zelle zu charakterisieren („aptamer-induced mutagenesis“) [Geyer et al., 1999]. Zum anderen könnten die Aptamere im Hinblick auf die Akkumulation unzähliger Sequenzdaten, die in den letzten Jahren bei der Entschlüsselung des humanen Genoms gewonnen wurden, zur funktionellen Charakterisierung unbekannter Genprodukte („functional proteomics“) eingesetzt werden. Dabei ist auch eine Strukturanalyse verschiedener Zielproteine

möglich, indem die Peptid-Aptamere innerhalb spezifisch definierter Bereiche einer Proteinsequenz binden und entweder deren Funktion blockieren oder sogar Bestandteile natürlich vorkommender Interaktionspartner mit bekannten Eigenschaften und Funktionen sind [Cohen et al., 1998; Yang et al., 1995].

1.3.2. Die Entwicklung therapeutischer Peptide gegen Krebs

Die hohe Spezifität und die niedrige molekulare Masse von Peptid-Aptameren birgt die Frage nach ihrem therapeutischen Potential. Hier steht vor allem die Entwicklung von Peptiden oder Peptid-Mimetika, die später als Wirksubstanzen zur Behandlung von Erkrankungen wie beispielsweise verschiedener Krebsarten eingesetzt werden sollen, im Vordergrund. Eines der wichtigsten Probleme ist dabei die Bioverfügbarkeit der zu verabreichenden Peptide, da vor allem die zu erreichende Konzentration und die Halbwertszeit des Peptid-Aptamers für den therapeutischen Wert eine entscheidende Rolle spielen [Amidon et al., 1994].

Bezüglich ihrer Stabilität sind in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht worden. So können die Peptide durch diverse chemische Modifikationen der Seitenketten oder durch Komplexierung mit einer weiteren Trägersubstanz resistenter gegen ihre Degradation gemacht werden [Langer et al., 1998; Putney et al., 1998]. Ein Beispiel dafür ist das Parathormon (PTH), welches durch eine modifizierte Hydrathülle und mit Hilfe eines Polymer-"Carriers" oral appliziert werden konnte [Sehgal et al., 2002]. Auch die nasale oder pulmonale Verabreichung von peptidischen Mimetika ist eine weitere Möglichkeit, die Medikamente aufzunehmen [Sehgal et al., 2002; Latham et al., 1999; Amidon et al., 1994].

Eine andere Technologie beruht darauf, Peptide in Liposomen verpackt vor dem Abbau zu schützen. Dabei könnten diese Liposomen über hydrophile Polymere mit Antikörpern ausgestattet werden, die dann eine spezifische Bindung der peptidbeladenen Liposomen an einen bestimmten Zelltyp ermöglichen [Spear et al., 2001; Zhang J et al., 2001]. Auf diese Art und Weise könnten auch Peptid-Aptamere zum „Targeting“ von Liposomen, die mit zytotoxischen Stoffen beladen sind, eingesetzt werden [Allen et al., 2002; Langer et al., 1998; Putney et al., 1998]. Eine ähnliche Technologie bei der Herstellung solcher LTTs ("ligand-targeted therapeutics") hat die Firma ConjuChem Inc entwickelt, die sie als DAC („drug affinity complex“) bezeichnet. Dabei ist das Peptid mit einer weiteren Wirksubstanz und einem Träger komplexiert. Der "DAC" wird intravenös verabreicht und soll so für mehrere Tage bis Wochen stabil sein. Diese Technologie soll vor allem zur Therapie von

Dauerschmerzen, Diabetes, Entzündungen und viralen Infektionen weiterentwickelt werden [Sehgal et al., 2002].

Einige von Peptiden abgeleitete Substanzen werden teilweise schon in klinischen Studien gegen unterschiedliche Krebsarten eingesetzt [Sehgal et al., 2002]. Bei dem Medikament "Abarelix" handelt es sich um ein Decapeptid, das vom Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) abgeleitet ist. "Abarelix" verringert den Testosteronspiegel und vermindert dadurch das Wachstum maligner Prostata-Krebszellen. Bei Patienten konnte damit die durch eine Alternativ-Behandlung erreichte Remission unterstützt werden [Sehgal et al., 2002]. Auf einem ähnlichen Mechanismus beruht ein synthetisches Peptid, welches an das Follikel-Stimulierende-Hormon (FSH) bindet und dieses dadurch inhibiert. Das Peptid wurde in verschiedenen humanen Eileiter-Krebszelllinien getestet, die nur in Anwesenheit des FSH proliferieren. Die gleichzeitige Zugabe des Peptides inhibierte die Proliferation signifikant [Sehgal et al., 2002].

Zusätzlich besteht die Möglichkeit, aus einem biologisch wirksamen und interessanten Peptid-Aptamer ein entsprechendes Peptidmimetikum abzuleiten. Zum einen kann es sich dabei um peptidische Strukturmimetika handeln, bei welchen die biochemischen und biophysikalischen Nachteile der natürlichen Peptid-Aptamere durch chemische Modifikationen überwunden werden. Zum anderen kann es sich um nicht-peptidische Mimetika handeln, welche die dreidimensionale Struktur des nativen Peptides nachahmen und so beispielsweise wichtige katalytische Domänen des Zielpeptides inhibieren [Breinbauer et al., 2002; Liu et al., 2002; Rich et al., 2002]. In diesem Fall können die Peptidsequenzen als Leitstrukturen zur Etablierung ganzer niedermolekularer Bibliotheken dienen. Diese niedermolekularen chemischen Substanzen haben zusätzliche Vorteile aufgrund ihrer höheren Stabilität und ihrer Bioverfügbarkeit [Breinbauer et al., 2002; Klebe et al., 2000; Leung et al., 2000].

Ergänzend ist noch zu erwähnen, daß es bereits eine ganze Anzahl von gut charakterisierten, oral verfügbaren Peptid-Mimetika gibt, die allerdings zu anderen Zwecken als der Krebstherapie eingesetzt werden. Hierzu zählen vor allem die Gruppe der β -Lactam-Antibiotika (z.B. Ampicillin, Cefadroxil) und die der ACE-Inhibitoren ("angiotensin-converting enzyme"), wobei letztere zur Behandlung von Bluthochdruck eingesetzt werden [Rubio-Aliaga et al., 2002; Latham et al., 1999; Amidon et al., 1994].

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Die Behandlung einer Leukämie ist für den Patienten immer mit sehr starken Nebenwirkungen verbunden. Die momentan zur Therapie verfügbaren Chemotherapeutika haben nur eine sehr geringe Selektivität bezüglich ihrer toxischen Wirkung auf leukämische Knochenmarkzellen, weshalb in letzter Konsequenz auch immer die gesunden Knochenmarkzellen abgetötet werden. Die Patienten entwickeln deshalb meist eine schwere und lang anhaltende Knochenmarkinsuffizienz, die eine intensive Supportivtherapie erfordert. Bei Patienten über 60 Jahren kommt es aufgrund der intensiven Behandlung häufig zu Infektionen, Blutungen und Organversagen, welche oft zum Tod führen. Das Ziel alternativer Behandlungsansätze ist es deshalb immer, ein Therapeutikum zu entwickeln, das sich spezifisch gegen die leukämischen Blasten richtet, ohne dabei die gesunden Knochenmarkzellen anzugreifen.

Die Translokation t(8;21) und das daraus resultierende Fusionsprotein AML1/ETO liegt bei 12% aller Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie (AML) vor. AML1/ETO führt über eine transkriptionelle Repression der AML1-Zielgene zu einem Differenzierungsblock in den myeloischen Blasten und trägt so zur Entstehung der Leukämie bei. Wie in Kapitel 1.2.1 beschrieben, reicht die Expression von AML1/ETO allein nicht aus, um eine Leukämie auszulösen. Bei der Suche nach weiteren transformierenden Faktoren haben Untersuchungen der hämatopoetischen Zelllinie TF-1 gezeigt, daß eine AML1/ETO-Expression zu einer verlängerten STAT5-Aktivität führt. Da eine starke Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs mit einer verstärkten Proliferation von Zellen einhergeht, wurde ein Peptid entwickelt, welches die STAT5-Aktivität hemmen soll. Dieses war in der Lage, spezifisch die Proliferation in AML1/ETO-transformierten Zellen, nicht aber normaler Zellen zu hemmen. Im Rahmen der Arbeit sollte untersucht werden, über welchen Mechanismus das STAT5-antagonistische Peptid zu einer Wachstumshemmung in den AML1/ETO-transformierten Zellen führt.

Im Einsatz solcher Peptid-Aptamere liegt ein großes Potential für zukünftige Therapieansätze in der Behandlung von Leukämien. Weitere Peptide, die in der Lage sind, die transformierenden Eigenschaften von AML1/ETO aufzuheben, könnten aus synthetischen, hochkomplexen Peptid-Bibliotheken identifiziert werden. Um solche Peptid-Bibliotheken effizient und schnell nach ETO-inhibierenden Peptiden zu durchsuchen, muß allerdings ein spezifisches Selektionssystem vorhanden sein. Im Rahmen der Arbeit sollen hierfür ein transientes und ein stabiles Selektionssystem in einer humanen Zelllinie aufgebaut und genau charakterisiert werden. Solche ETO-inhibierenden Peptide könnten dann für eine spezifische, „molekulare“ Therapie der AML mit der t(8;21) verwendet werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Agarosegel-Apparatur	Life Technologies, Karlsruhe
Analysenwaage, R 160 P-D1	Sartorius, Göttingen
Auslaufpipetten (2, 5, 10, 25 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Autoklav	Integra Biosciences, Baar (CH)
Autoradiographie-Film (Hyperfilm™ MP)	Amersham Pharmacia, Little Chalfont (UK)
Brutschrank, CO ₂ -begast	Heraeus, Hanau
Cellophane, GelAir Support	BioRad, München
FACScan (Durchflußzytometer)	Becton Dickinson, Heidelberg
Filmentwicklungseinrichtung	Optimax, MS Laborgeräte
Fluoreszenzmikroskop	Nikon, Düsseldorf
GelAir Dryer	BioRad, München
Gel-Fotografier-Einrichtung	BioRad, München
Gewebeschalen für die Zellkultur	Greiner, Frickenhausen
Heizblock	Techne, Princeton (NJ)
Kryocontainer	Nalgene, Rochester (NY)
Kryoröhrchen	Nalgene, Rochester (NY)
Lichtmikroskope	Zeiss, Göttingen
	Leica, Wetzlar
PCR-Cycler, T-Gradient Thermoblock	Biometra, Göttingen
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
pH-Meßgerät	Knick, Berlin
Pipetten	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen
Pipettierhilfe (elektrisch)	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Polypropylen-Röhrchen (14ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Power Supplies	Life Technologies, Karlsruhe
	BioRad, München
PVDF-Membran	Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg;
	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (15 und 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
SDS-Gelkammer (Mini Protean 3)	BioRad, München

Speedvac	Bachofer, Reutlingen
Spektrophotometer	BioRad, München
Sterilbank, LaminAir, HLB 2448	Heraeus, Hanau
Sterilfilter (0,22 und 0,45 µm)	Millipore, Eschborn
Vortexer	Janke & Kunkel, Staufen
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Whatman-Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
Zählkammern	Hycor Biomedical, Garden Grove (CA)
Zellkulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellkulturplatten	Greiner, Frickenhausen
	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellschaber	Costar, Wiesbaden

Zentrifugen

Tischzentrifugen	Beckman mit den Rotoren JA-20, JA-10
	Eppendorf Centrifuge 5415 C
	Heraeus Biofuge 13
	Heraeus Labofuge 400 R
	Heraeus Megafuge 1.0, 1.0 R
Ultrazentrifuge	Beckman L8-80 M mit den Rotoren VTi 50, Vti 60 und Vti 80

2.1.2. Chemikalien und Biochemikalien; Medien und Zusätze für die Zellkultur

1-Brom-3-chlor-propan	Sigma, Taufkirchen
7-Amino-Actinomycin (7-AAD)	Sigma, Taufkirchen
Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid (Rotipherese® Gel 30)	Roth, Karlsruhe
Agarose (#T846.3)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma, Taufkirchen
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Aprotinin	Sigma, Taufkirchen
Benzamidin	Sigma, Taufkirchen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Taufkirchen
Brilliant Blue R (Coomassie Blau)	Roth, Karlsruhe

Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Butanol	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Chloramphenicol	Sigma, Taufkirchen
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Chloroquin	Sigma, Taufkirchen
Compound 48/80, Trihydrochlorid	Calbiochem, Schwalbach
D609, Kaliumsalz	Calbiochem, Schwalbach
Desoxynucleotide (dNTP's)	New England Biolabs, Frankfurt/Main
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen
Dithiothreitol (DTT)	Serva, Heidelberg
DNeasy Tissue Kit	Qiagen, Hilden
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies, Karlsruhe
Enhanced chemiluminescence (ECL)	Pierce, Rockford (IL)
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Taufkirchen
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma, Taufkirchen
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Formalin	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom-Seromed, Berlin
G418 (G418)	Life Technologies, Karlsruhe
Ganciclovir, Cymeven [®]	Roche, Mannheim
Gelatine	Sigma, Taufkirchen
Glucose	Merck, Darmstadt
Glutathion Sepharose	Sigma, Taufkirchen
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycogen	Roche, Mannheim
Hank's gepufferte Salzlösung (HBSS)	Sigma, Taufkirchen
HEPES	Roth, Karlsruhe
IL-3 (rh)	R&D Systems, Wiesbaden
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma, Taufkirchen
Jetstar (Plasmid-DNA Präparation-Kit)	Genomed, Bad Oeynhausen
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe

LB Broth Base (Lennox L Broth Base)	Life Technologies, Karlsruhe
LB-Agar (Lennox L Agar)	Life Technologies, Karlsruhe
Leupeptin	Roche, Mannheim
L-Glutamin	Life Technologies, Karlsruhe
Lysozym	Serva, Heidelberg
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Manganchlorid	Sigma, Taufkirchen
Methanol	Roth, Karlsruhe
MOPS (3-Morpholinopropansulfonsäure)	Roth, Karlsruhe
MTS, CellTiter 96 [®]	Promega, Mannheim
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumbutyrat	Biomol, Hamburg
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Nonidet P-40	Serva, Heidelberg
Penicillin-Streptomycin	Life Technologies, Karlsruhe
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Phenylmethansulfonyl-Fluorid (PMSF)	Sigma, Taufkirchen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Taufkirchen
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	BioWhittaker, Verviers (Belgien)
Polybren	Sigma, Taufkirchen
Protaminsulfat	Sigma, Taufkirchen
Protease-Inhibitoren Cocktail (complete [™])	Roche, Mannheim
Protein-A/G-Agarose	Santa Cruz, Heidelberg
Protein-A-Sepharose	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Puromycin	Sigma, Taufkirchen
QIAEX II (DNA-Extraktion aus Agarosegel)	Qiagen, Hilden
RetroNectin	Takara Shuzo, Shiga (JP)
RotiLoad1-Auftragspuffer	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium	Life Technologies, Karlsruhe
RT-Kit	Perkin Elmer, Weiterstadt
Rubidiumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
Streptavidin, immobilisiert	Boehringer, Mannheim
Streptavidin-AP Konjugat	Boehringer, Mannheim

Sucrose	Sigma, Taufkirchen
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Roth, Karlsruhe
TGF- β (rh)	R&D Systems, Wiesbaden
Trichostatin A (TSA)	Biomol, Hamburg
Tri-Reagent	Life Technologies, Karlsruhe
Tris	Sigma, Taufkirchen
Tris-HCl	Sigma, Taufkirchen
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypanblau	Sigma, Taufkirchen
Trypsin-EDTA	Life Technologies, Karlsruhe
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
U-73122	Calbiochem, Schwalbach
Vitamin D ₃ (1 α , 25(OH) ₂ D ₃)	R&D Systems, Wiesbaden
Wasser	Sigma, Taufkirchen
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactopyranosid)	Sigma, Taufkirchen
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe

2.1.3. Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP)	New England Biolabs, Frankfurt/Main
AmpliTaq-DNA-Polymerase	Perkin Elmer, Weiterstadt
DNase (RNase-frei)	Promega, Mannheim
Klenow-Fragment (DNA-Polymerase I)	New England Biolabs, Frankfurt/Main
MuLV Reverse Transkriptase	Perkin Elmer, Weiterstadt
Pfu Turbo DNA-Polymerase	Stratagene, Amsterdam (NL)
RNase A	Sigma, Taufkirchen
RNasin (RNase-Inhibitor)	Promega, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt/Main
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt/Main
T7 Polymerase	Promega, Mannheim

2.1.4. Antikörper

Anti-Abl	Stephan Feller, Universität Würzburg
Anti-CrkL (Kaninchen, monoklonal)	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-ETO Ab-1 (Kaninchen, polyklonal)	Calbiochem, Schwalbach
Anti-Flag [®] M2 (Maus, monoklonal)	Sigma, Taufkirchen
Anti-Gal4 DBD (RK5C1; Maus, monoklonal)	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Grb2 (Maus, monoklonal)	BD Transduction Laboratories, Heidelberg
Anti-Kaninchen IgG Peroxidase	BD Transduction Laboratories, Heidelberg
Anti-Maus IgG Peroxidase	BD Transduction Laboratories, Heidelberg
Anti-PI3-Kinase (Maus, monoklonal)	BD Transduction Laboratories, Heidelberg
Anti-PLC γ (Maus, monoklonal)	BD Transduction Laboratories, Heidelberg
Anti-STAT5a (Kaninchen, polyklonal)	Zymed Laboratories, München
Anti-VSV Glykoprotein (P5D4; Maus, monoklonal)	Sigma, Taufkirchen
Anti-Ziege IgG Peroxidase	BD Transduction Laboratories, Heidelberg

2.1.5. Marker und Größenstandards

BenchMark Prestained Protein Ladder	Life Technologies, Karlsruhe
SmartLadder	Eurogentec, Seraing (Belgien)

2.1.6. Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide wurden von der Firma INTERACTIVA Biotechnologie GmbH, Ulm, synthetisiert.

2.1.7. Peptidsynthese

Um die STAT5-Aktivität in AML1/ETO-transformierten Zellen zu hemmen, wurden kurze, zellgängige Peptide synthetisiert (Kap.1.7). Die Peptide besitzen ein 8 Aminosäuren umfassendes Motiv um das C-terminale Tyrosin 694, welches im Phosphopeptid phosphoryliert und im Kontrollpeptid dephosphoryliert ist. Darüber hinaus ist dieses STAT5-Bindungsmotiv an eine 18 Aminosäuren umfassende Sequenz der Homeodomäne des Transkriptionsfaktors Antennapedia (unterstrichen), welche die Aufnahme der Peptide in die Zelle ermöglicht [Derossi et al., 1994,1998]. Um das Peptid mit Streptavidin immobilisieren zu können (Kap.2.2.5.5), ist es zusätzlich noch mit einem N-terminalen Biotin-Marker versehen .

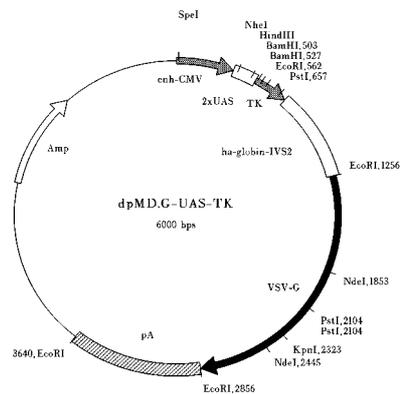
Phosphopeptid	Biotin- <u>GGRQIKIWFQNRRMKWKK</u> -AVDGY ⁶⁹⁴ (phos)VKPQ
Kontrollpeptid	Biotin- <u>GGRQIKIWFQNRRMKWKK</u> -AVDGY ⁶⁹⁴ VKPQ
	Eurogentec, Seraing (Belgien)

2.1.8. Eukaryotische Expressionsvektoren

MA142-IRES/GFP	Dorothee von Laer, Frankfurt/Main
pBabePuro	Alexander Maurer, Frankfurt/Main
pcDNA3	Invitrogen, Karlsruhe
pCMX-Gal4	Thorsten Heinzel, Frankfurt/Main
pCMX-Gal4ETO	Daniela Hildebrand, Frankfurt/Main
pGLK-2xUAS-TK-luc	Thorsten Heinzel, Frankfurt/Main
pfgU3-TkNeo	Harald Melchner, Frankfurt/Main
pMD.G	D. Trono, Genf (CH)

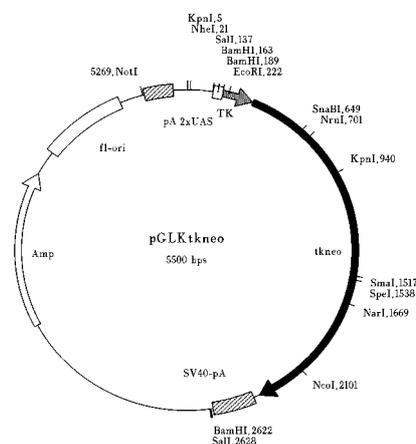
Das Reporterkonstrukt ΔpMD.G

Bei der Konstruktion des VSV-G-Reporterkonstrukts (Abb. 3.7) wurden die Promotorsequenzen des CMV-Promotors im Ausgangsplasmid pMD.G entfernt und durch Gal4-DNA-Bindungssequenzen (2xUAS) und einen TK-Promotor ersetzt. CMV ENH = Enhancer-Sequenzen des CMV-Promotors (Cytomegalievirus); 2xUAS = zwei Gal4-DNA-Bindungsstellen; TK = Thymidin-Kinase-Promotor; ha-globin-IVS2 = humanes β-Globin-Intron; VSV-G = Glykoprotein G des Vesikulären Stomatitisvirus; pA = poly A-Signal; Amp = Ampicillin-Resistenzgen (β-Lactamase).



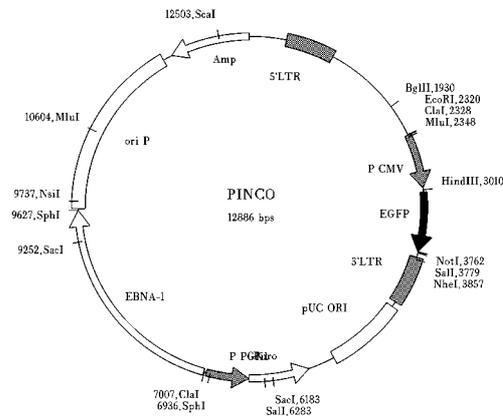
Das Reporterkonstrukt pGLK-tkneo

Bei der Konstruktion des pGLK-tkneo-Reporterplasmids wurde das Luziferasegen durch das tkneo-Fusionsgen ersetzt. Die Konstruktion ist in Kapitel 3.2.2.2 beschrieben. 2xUAS = zwei Gal4-DNA-Bindungsstellen; TK = Thymidin-Kinase-Promotor; tkneo = Fusionsgen aus der Wildtyp-Thymidinkinase des Herpes-Simplex-Virus (HSV) und Neomycin-Phosphotransferase II; SV40pA = polyA-Signal aus dem Simian Virus 40; Amp = Ampicillin-Resistenzgen (β-Lactamase); f1-ori = Replikationsursprung.



Der retrovirale Vektor PINCO

Die 5'- und 3'-LTR ("long terminal repeats") stammen aus dem Moloney-Maus-Leukämie-Virus. P CMV = CMV-Promotor; EGFP = "enhanced green fluorescence protein"; pUC ORI = pUC-Replikationsursprung; Puro = Puromycin-Resistenzgen; P PGK1 = PGK1-Promotor; EBNA-1 = Epstein-Barr-Kernantigen aus dem EBV- (Epstein-Barr-Virus-) Genom; ori P = ori P Replicon aus dem EBV-Genom; Amp = Ampicillin-Resistenzgen [Grignani et al., 1998b].



2.1.9. Bakterienstämme (*Escherichia coli*)

One Shot™ (TOP 10F')

Invitrogen, Karlsruhe

Genotyp: F'*{lacI^q TN10(Tet^R)}* *mcrA*, Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), Φ 80/*lacZ* Δ M15, Δ *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *araD139* Δ (*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL*, *endA1*, *nupG*.

Stbl2™

Life Technologies, Karlsruhe

Genotyp: F *mcrA* Δ (*mcrBC-hsdRMS-mrr*) *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi* *supE44* *relA1* λ' Δ (*lac-proAB*)

XL1-Blue

Stratagene, Amsterdam (NL)

Genotyp: *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac* [F' *proAB lacI^qZ* Δ M15 Tn10 (Tet^R)]

2.1.10. Medien für die Bakterienkultur

5-fach LB-Flüssigmedium

Zur Herstellung von 5fach LB-Flüssigmedium wurden 100 g LB Broth Base pro Liter dH₂O eingewogen und autoklaviert. Vor Gebrauch wurden 100 ml 5fach LB-Medium mit dH₂O auf 500 ml aufgefüllt und je nach Bedarf das gewünschte Antibiotikum zugesetzt.

LB-Agar

Zur Herstellung von LB-Agar wurden 32 g LB-Agar pro Liter dH₂O eingewogen und autoklaviert. Nach Abkühlung auf ca. 50°C wurde nach Bedarf das gewünschte Antibiotikum hinzugegeben und der Agar in Petrischalen gegossen. Nach dem Trocknen waren die LB-Agar-Schalen für mehrere Wochen bei 4° C lagerbar.

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Arbeiten mit *E. coli* und Präparation von Plasmid-DNA

2.2.1.2. Herstellung kompetenter Bakterienstämme nach der Rubidiumchlorid-Methode

Um DNA mit hoher Effizienz in *E.coli* einzubringen, muß die Zellmembran für Makromoleküle permeabel gemacht werden. Dazu wurden die Bakterien mit Calciumchlorid (CaCl_2) [Dagert et al., 1979] und Rubidiumchlorid (RbCl_2) [Kushner et al., 1978] inkubiert. Aus nicht vollständig bekannten Gründen werden die chemisch behandelten Zellen "kompetent", d.h., sie nehmen bei einem Hitzeschock ($37\text{-}43^\circ\text{C}$) die Plasmid-DNA auf.

Für die Herstellung der kompetenten Bakterien wurde zuerst ein Klon des gewünschten Stammes, der zuvor auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert wurde, in 5 ml LB-Medium überführt und über Nacht unter Schütteln vermehrt. Mit 1 ml der Übernachtskultur wurden 500 ml LB-Medium beimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis die Kultur eine $\text{OD}_{595\text{nm}}$ von 0.4-0.6 erreicht hatte. Die Kultur wurde dann 20-30 min auf Eis abgekühlt, und alle weiteren Arbeitsschritte wurden ebenfalls auf Eis und mit vorgekühlten Arbeitsmaterialien durchgeführt. Nach einer 10minütigen Zentrifugation bei $2900 \times g$ und 4°C wurde das Bakterienpellet in 150 ml TFB-I-Puffer (15% [v/v] Glycerin, 10 mM Calciumchlorid, 30 mM Calciumacetat, pH 5.8, 100 mM Rubidiumchlorid, 20 mM Manganchlorid) resuspendiert und weitere 15 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden erneut zentrifugiert, wobei das Pellet in 20 ml TFB-II-Puffer (15% [v/v] Glycerin, 10 mM MOPS pH 7, 10 mM RbCl_2 , 75 mM CaCl_2) aufgenommen und die Bakterien sofort in 100 μl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert wurden.

2.2.1.3. Transformation kompetenter Bakterienstämme

Für die Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA wurden 50 μl Bakterien auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit der jeweiligen DNA vermischt. Für eine Retransformation von Plasmid-DNA wurden 1-10 ng und im Fall einer Ligation die Hälfte des Ligationsansatzes eingesetzt. Die Bakterien wurden 30 min auf Eis inkubiert und dann für 45 sec einem Hitzeschock bei 42°C unterzogen. Die Bakterien wurden weitere 2 min auf Eis abgekühlt, bevor sie auf einer LB-Agar-Platte ausgestrichen wurden [Hanahan et al., 1983]. Um eine Selektion der positiven Transformanden zu erreichen, wurden

entsprechend dem Resistenzgen des Plasmids Antibiotika-haltige LB-Agar-Platten verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 12-24 h bei 37°C wurden die Kolonien von der Platte gepickt und in 5 ml LB-Flüssigmedium unter Schütteln (200 rpm, 37°C) über Nacht vermehrt.

2.2.1.4. Analytische Isolierung von Plasmid-DNA

Die Plasmid-Präparation zur Analyse einzelner Bakterienklone aus kleinen Kulturvolumina erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mit anschließender Isopropanol-Fällung [Birnboim et al., 1983]. Von den 5 ml-Übernachtskulturen wurden 2 ml in Eppendorf-Gefäße überführt und 30 sec bei 7800 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen. Die Bakterien-Pellets wurden in je 100 µl TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA) resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert, bevor die Membranen durch die Zugabe von 200 µl alkalischen Lysispuffers (200 mM NaOH, 1% [w/v] SDS) und einer weiteren Inkubationszeit von 5 min aufgebrochen wurden. Im nächsten Schritt wurden der Zelldebris und das SDS mit 150 µl 3 M KAc-Puffer (pH 4.8) präzipitiert und durch eine 15 minütige Zentrifugation bei 4°C und 13200 x g sedimentiert. Die Überstände, in denen sich die niedermolekulare DNA befand, wurden in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Die Plasmid-DNA wurde durch die Zugabe von 260 µl 100%igem Isopropanol und einer Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 13200 x g gefällt. Nach einmaligem Waschen des DNA-Pellets mit 70%igem Ethanol wurde es getrocknet und in 25 µl TE resuspendiert.

2.2.1.5. Präparative Isolierung von Plasmid-DNA

Um größere Mengen (300 µg-500 µg) an reiner Plasmid-DNA zu gewinnen, wurden DNA-Affinitätssäulen (Jetstar, Genomed) verwendet. Hierfür wurden 250 ml selektives LB-Medium mit 2 ml einer Vorkultur angeimpft und über Nacht kultiviert. Die Bakterien wurden 15 min bei 2900 x g zentrifugiert und nach dem Prinzip der alkalischen Lyse aufgebrochen. Anschließend wurde das Bakterienlysat gemäß den Angaben des Herstellers mit einem 3.1 M KAc-Puffer neutralisiert und 20 min bei 20000 x g zentrifugiert. Die Plasmid-DNA wurde mit dem Überstand auf die äquilibrierten Säulen gegeben, gewaschen, eluiert und mit Isopropanol ausgefällt. Nach einmaligem Waschen wurde das DNA-Pellet luftgetrocknet und in 50-200 µl Wasser gelöst.

2.2.1.6. Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Über die Messung der optischen Dichte (OD) in einem Photometer wird die DNA- oder RNA-Konzentration bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine OD_{260nm} von 1 entspricht einer Konzentration von 50 ng/ μ l DNA und 40 ng/ μ l RNA. Außerdem wurde das Verhältnis der OD_{260nm} zu OD_{280nm} gemessen, wobei der Quotient eine Aussage über eine eventuelle Proteinkontamination der DNA-Lösung erlaubt. Bei einer proteinfreien DNA-Lösung liegt dieser Wert zwischen 1.8 und 2.

Die Konzentrationsbestimmung kleinerer DNA-Mengen wurde anhand eines Mengenstandards auf einem Agarosegel durchgeführt. Hierfür wurde ein kleiner Anteil der zu bestimmenden DNA-Lösung (z.B. nach einer Gelextraktion) zusammen mit einem bestimmten Volumen an DNA bekannter Konzentration (SmartLadder, Eurogentec) auf ein Agarosegel gegeben und die DNA-Konzentration über den Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der Banden unter UV-Licht abgeschätzt.

2.2.1.7. Anlegen von Glycerin-Stocks

Von einer Bakteriensuspension kann zum Zweck der Lagerung bei -80°C eine Glycerinkultur angelegt werden. Hierfür wurde ein Aliquot der Übernachtskultur in einem Kryo-Röhrchen mit dem gleichen Volumen 80% (v/v) Glycerin gemischt und anschließend bei -80°C eingefroren.

2.2.2. Enzymatische Modifikation von DNA

2.2.2.1. DNA-Restriktionsspaltung

Zur Analyse von Plasmiden und zur Erzeugung von DNA-Fragmenten für die Klonierung wurden Restriktionsendonukleasen vom Typ-II verwendet, welche doppelsträngige DNA spezifisch innerhalb der Erkennungssequenz spalten. Dabei entstehen abhängig vom Enzym entweder glatte ("blunt") oder überhängende Enden ("sticky ends") [Fuchs et al., 1983].

Für eine Restriktion wurden je μ g Plasmid-DNA 2-10 U des entsprechenden Restriktionsenzym eingesetzt und unter Berücksichtigung der vom Hersteller vorgegebenen Puffer und Inkubationstemperaturen für 60-90 min geschnitten. Bei Doppelrestriktionen wurde ein für beide Enzyme kompatibler Puffer verwendet. Da die

Effizienz und Spezifität der Restriktionsspaltung durch das in der Enzymlösung vorhandene Glycerol negativ beeinflusst werden, betrug die eingesetzte Enzymmenge weniger als 1/10 des Gesamtvolumens des Restriktionsansatzes. Für einen analytischen Verdau wurde 1 µg und für einen präparativen Verdau 4-8 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Im Anschluß konnten bei Bedarf hitzesensitive Enzyme durch eine 10minütige Inkubation bei 70°C inaktiviert und die DNA über Phenol/Chloroform-Extraktion oder über ein Agarosegel aufgereinigt werden.

2.2.2.2. Auffüllen von überhängenden DNA-Enden mit DNA-Polymerase (Klenow Fragment)

Überhängende 5'-Enden können durch eine Aufpolymerisationsreaktion des Klenow-Fragments (große Untereinheit der DNA-Polymerase I) in Gegenwart eines Überschusses an dNTPs zu glatten Enden aufgefüllt werden [Jacobsen et al., 1974]. Das Klenow-Fragment verfügt neben der Polymeraseaktivität auch über eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, so daß mit einem Überschuß an Klenow-Enzym auch 3'-überhängende Nukleotide abgebaut und somit geglättet werden können.

Für eine Auffüllreaktion wurde die zuvor geschnittene DNA in dem entsprechenden Reaktionspuffer auf eine Konzentration von 50 ng/µl eingestellt und mit 33 µM dNTPs supplementiert. Nach Zugabe des Klenow-Enzyms [1 U/µg DNA] inkubierte der Ansatz 15 min bei 25°C, wobei das Enzym anschließend durch die Zugabe von EDTA [10 mM] und 10 min bei 75°C inaktiviert wurde. Um die DNA bei Bedarf mit einem weiteren Enzym zu schneiden, wurde diese durch Phenol/Chloroform-Extraktion oder über ein Agarosegel aufgereinigt.

2.2.2.3. Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Um die Religation eines Vektors bei der Ligation ohne den Einbau eines Inserts zu vermindern, wurden vorhandene kompatible Enden zuvor dephosphoryliert. Hierfür wurde das Enzym Alkalische Phosphatase (CIP) verwendet, welches die Phosphatreste an den 5'-Enden des Vektors abspaltet [Mossner et al., 1980].

Die Reaktion wurde direkt im Anschluß an die Restriktion durchgeführt, wobei 0.5 U CIP je µg Vektor-DNA zugegeben und der Ansatz 60 min bei 37°C inkubiert wurde. Die Enzymaktivität wurde durch Zugabe von 5 mM EDTA und einer 10 minütigen Inkubation

bei 75°C inaktiviert. Die DNA konnte anschließend durch Phenol/Chloroform Extraktion oder über ein Agarosegel aufgereinigt werden.

2.2.2.4. Ligation

Zur Ligation eines Vektors mit einer Insert-DNA wurde die T4-DNA-Ligase verwendet, welche sowohl glatte als auch überhängende DNA-Enden über eine Phosphodiester-Bindung zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer freien 3'-OH-Gruppe miteinander verknüpfen kann [Weiss et al., 1968].

Für eine Ligation wurden zwischen 10-50 ng Vektor-DNA und ein 3-10 facher molarer Überschuss an Insert-DNA im entsprechendem Ligasepuffer mit 400 U T-Ligase in einem Reaktionsvolumen von 15 µl eingesetzt. Um die Effizienz des Restriktionsverdaus zu überprüfen, wurde zusätzlich eine Selbstligations-Kontrolle durchgeführt und anhand der nachfolgenden Transformation kontrolliert. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C oder für mindestens 4 h bei Raumtemperatur.

2.2.2.5. Auftrennung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Agarose-Gelelektrophorese

Aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen im Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat wandern DNA-Moleküle im elektrischen Feld zur Anode und können so in einem Agarosegel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden [McDonnell et al., 1977; Southern et al., 1979]. Je nach erwarteter Fragmentgröße wurden 0.7-2%ige Agarosegele eingesetzt. Die Agarose wurde in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat pH7.8, 5 mM EDTA) in einem Mikrowellenherd erhitzt, bis sie vollständig gelöst war, nach dem Abkühlen mit 0.5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in einen Gelträger mit entsprechendem Probenkamm gegossen. Anschließend wurde das erstarrte Gel in einer horizontalen Elektrophorese-Kammer mit TAE-Puffer überschichtet und der Probenkamm entfernt. Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden mit der entsprechenden Menge an 5 fach-Auftragspuffer (20% [w/v] Ficoll 400, 100 mM EDTA, 0.025 % [w/v] Xylencyanol, 0.025% [w/v] Bromphenolblau) versetzt, bevor sie auf das Agarosegel aufgetragen und die Fragmente in einem elektrischen Feld aufgetrennt wurden. Die Größen- und Mengenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgte über einen Größenstandard. Auf einem

Transilluminator wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente mit Hilfe von UV-Licht (366 nm) ausgewertet und zur Dokumentation digital photographiert.

Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das Kit "Qiaex® II" der Firma Qiagen verwendet. Die DNA wurde zunächst mit dem jeweiligen Restriktionsenzym geschnitten und über ein Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurde das gewünschte DNA-Fragment aus dem Gel ausgeschnitten, und die darin befindliche DNA wurde nach den Angaben des Herstellers aus der Agarose isoliert. Der Agaroseblock wurde dazu in Anwesenheit einer Silica-Lösung im Wasserbad bei 55°C aufgeschmolzen. Das Prinzip der Extraktion beruht darauf, daß die DNA in Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze an das Silica-Material bindet und nach zwei Waschschritten durch Lösungen mit geringen Salzkonzentrationen wie TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA) oder Wasser wieder von den Silica-Partikeln eluiert werden kann.

Reinigung von DNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion

Mit Hilfe der Phenol-Chloroform-Extraktion kann DNA aus einer Lösung ausgefällt und von vorhandenen Proteinen getrennt werden [Hoff-Olsen et al., 1999]. Hierfür wurde das gleiche Volumen an Phenol/Chloroform zur vorliegenden DNA-Lösung zugegeben und geschüttelt. Durch eine 2 minütige Zentrifugation bei 13200 x g kam es zu einer Phasentrennung, wobei sich die ausgefallenen Proteine (z.B. Restriktionsenzyme) in der organischen Phase befanden. Die DNA-haltige wäßrige Phase wurde mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt, durch vortexen gemischt und erneut abgenommen. Die Fällung der DNA erfolgte durch die Zugabe von 1/10 Vol. 3 M NaAc, pH 7, 20 µg Glycogen und 0.7 Vol. Isopropanol. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 4°C und 13200 x g wurde die sedimentierte DNA zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in einem entsprechenden Volumen an Wasser oder TE aufgenommen.

2.2.3. Arbeiten mit genomischer DNA

2.2.3.1. Präparation genomischer DNA aus 293-Zellen

Zur Präparation genomischer DNA aus adhärennten Zellen wurde der "DNeasyTMTissue Kit" von Qiagen verwendet. Es wurden maximal 5×10^6 293-Zellen nach Angaben des Herstellers lysiert und auf eine Silicagel-Säule gegeben. Die DNA bindet unter den vorgegebenen Pufferbedingungen effizient an das Silicagel und kann durch einen Zentrifugationsschritt von den restlichen Zellbestandteilen getrennt werden. Nach zwei weiteren Waschschritten wurde die DNA mit 200 μ l TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA) von der Säule eluiert und bei 4°C gelagert.

2.2.3.2. Amplifizierung von DNA-Sequenzen durch semiquantitative PCR

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) lassen sich definierte DNA-Abschnitte *in vitro* vervielfältigen [Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1985]. Hierbei wird der zu amplifizierende Bereich durch zwei kurze, synthetische Oligonukleotid-Einzelstränge, den sogenannten Primern definiert, welche an die komplementäre Sequenz der denaturierten, einzelsträngigen DNA-Matrize binden. Durch eine hitzebeständige DNA-Polymerase (z.B. Taq-Polymerase) werden die gebundenen Primer in Gegenwart freier Desoxynukleotid-Triphosphate (dNTP's) am 3'-Ende verlängert. Ein Reaktionszyklus wird mehrfach (20-35 mal) wiederholt, wobei sich unter optimalen Bedingungen die Anzahl der amplifizierten DNA-Abschnitte bei jedem Zyklus verdoppelt. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten: Im ersten Schritt wird die DNA durch Hitzebehandlung in Einzelstränge aufgetrennt (Denaturierung), im zweiten erfolgt die Hybridisierung der sequenzspezifischen Primer (Annealing) und im dritten die Auffüllreaktion zum Doppelstrang durch die DNA-Polymerase (Elongationsschritt).

Um eine Aussage über die Kopienzahl einer spezifischen DNA-Sequenz in einer PCR-Probe machen zu können, wurden für eine Standardkurve Proben mit Plasmid-DNA mit bekannter Kopienzahl der jeweiligen DNA-Sequenz unter identischen Bedingungen mitgeführt. Nach der Gelelektrophorese konnten die Bandenintensitäten mit Hilfe eines Analyseprogramms (QuantityOne, BioRad) bestimmt werden. Die Bandenintensitäten (y-Achse) wurde gegen den Logarithmus der Kopienzahlen (x-Achse) aufgetragen. Über eine lineare Regression wurde eine Standardkurve erstellt, anhand welcher die Kopienanzahl der zu testenden Probe definiert wurde.

2.2.3.3. Bestimmung der Kopienanzahl stabil in 293-Zellen integrierter pCMX-Gal4-ETO und pGLK-tkneo Plasmid-Sequenzen

Die Anzahl der in das Genom der 293-Zellklone stabil integrierten DNA-Plasmide, pCMX-Gal4-ETO und pGLK-tkneo wurden anhand einer semiquantitativen PCR abgeschätzt. Zunächst wurden die PCR-Bedingungen für die externen Standardkurven des jeweiligen Plasmids so optimiert, daß keine unspezifischen PCR-Produkte entstanden und die Kopienzahlbestimmung während der exponentiellen Phase der Produktamplifikation durchgeführt wurde. Zusätzlich wurde eine β -Aktin-Kontrolle mitgeführt, um die Qualität der genomischen DNA zu überprüfen. Für die Amplifikation der spezifischen Gal4-ETO-, tkneo- und β -Aktin-Sequenzen wurden folgende Primer-Paare (Interactiva, Biotechnologie GmbH/ Ulm) verwendet:

pCMX-Gal4-ETO

Vorwärts-Primer: 24-mer	5'-CTC CGC TGA CTA GGG CAC ATC TGA-3'
Rückwärts-Primer: 24-mer	5'-AGT TCG CCT CCT CCC GTT TTC GTT-3'
Produktlänge	924 bp
Annealing-Temperatur	58.8°C

MX5-tkneo

Vorwärts-Primer: 18-mer	5'-GAA GCC ACG GAA GTC CGC-3'
Rückwärts-Primer: 18-mer	5' CAC GGC CGT CCC CGA AAG-3'
Produktlänge	696 bp
Annealing-Temperatur	58.8°C

tkneo (RT-PCR)

Vorwärts-Primer: 24-mer	5'-GTG CTG GGG GCT TCC GAG ACA ATC-3'
Rückwärts-Primer: 19-mer	5' GCC ACG ACC GCG CGC ACT G-3'
Produktlänge	499 bp
Annealing-Temperatur	63°C

β -Actin

Vorwärts-Primer: 23-mer	5'-ATG ATA TCG CCG CGC TCG TCG TC-3'
Rückwärts-Primer: 26-mer	5'-TTC TCG CGG TTG GCC TTG GGG TTC AG-3'
Produktlänge	390 bp
Annealing-Temperatur	58.8°C

Eine PCR-Reaktion wurde mit 1 µg der zu testenden genomischen DNA eines 293-Zellklons durchgeführt, was einer Anzahl von 1.5×10^5 293-Zellen entspricht. Um die PCR der Standardkurven unter möglichst identischen Bedingungen durchzuführen, wurde die Plasmid-DNA (pCMX-Gal4-ETO, pGLK-tkneo) mit 1 µg genomischer DNA von 293wt-Zellen vermischt. Die Standardkurve wurde in Doppelbestimmungen und mit fünf verschiedenen Plasmid-DNA-Verdünnungen durchgeführt, die 9, 3, 1, 0.33 und 0.11 Plasmid-Kopien je Zelle entsprachen. Hierfür wurden folgenden Plasmidmengen an pCMX-Gal4-ETO bzw. pGLK-tkneo eingesetzt:

Kopien	Gesamtzahl /1 µg genomischer DNA	pg pCMX-Gal4-ETO	pg pGLK-tkneo
27	4.05×10^6	29.35	24.57
9	1.35×10^6	9.78	8.19
3	4.5×10^5	3.26	2.73
1	1.5×10^5	1.1	0.91
0.33	4.95×10^5	0.36	0.30
0.11	1.64×10^4	0.12	0.10

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Volumen von je 50 µl durchgeführt:

Reagenz	Volumen	Konzentration/Menge
DNA-Vorlage	25 µl	1 µg bzw. 1 µg + Plasmid-DNA
Vorwärts-Primer (10 pmol/µl)	1.25 µl	250 nM
Rückwärts-Primer (10 pmol/µl)	1.25 µl	250 nM
dNTP's (5 mM)	2 µl	0.2 mM
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0.5 µl	2.5 U/ 50 µl
10fach Puffer inkl. 15mM MgCl ₂	5 µl	1fach Puffer (1.5 mM MgCl ₂)
dH ₂ O	15 µl	-

Die PCR wurde nach folgendem PCR-Programm durchgeführt:

5 min	94°C	
1 min	94°C	} 28 Zyklen
1 min	58.8°C	
2 min	72°C	
10 min	72°C	

Die PCR-Ansätze wurden nach der Reaktion in einem 1%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, wobei je Ansatz 25 µl (die Hälfte) des PCR-Produkts auf das Gel aufgetragen wurden. Anschließend wurden die Bandenintensitäten mit einer digitalen Kamera auf einem Transilluminator unter UV-Licht dokumentiert. Die Bandenintensitäten wurden zusätzlich mit einem Analyseprogramm (QuantityOne, BioRad) quantifiziert und mit Hilfe eines Statistik-Programms (GraphPad Prism) ausgewertet. Die Bandenintensitäten (y-Achse) wurde gegen den Logarithmus der Kopienzahlen (x-Achse) aufgetragen. Anhand der ermittelten Standardgeraden ($r^2=0.97-0.98$) konnte eine Aussage über die Kopienanzahl der verschiedenen Klone für die Integration von Gal4-ETO und des Selektionsmarkers tkneo gemacht werden.

2.2.4. Arbeiten mit RNA

2.2.4.1. Isolierung von Gesamt-RNA

Die RNA wurde mit Hilfe des "Tri-Reagent" (Gibco) isoliert, wobei für je 6×10^6 Zellen 1 ml Tri-Reagent eingesetzt wurde. Hierfür wurden das Medium von den entsprechenden Monolayer entfernt und die Zellen sofort mit Tri-Reagent überschichtet. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Kulturplatte gelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt und weitere 5 min auf Eis inkubiert. Zur Phasentrennung wurden die Proben mit 0.1 Vol. 1-Brom-3-chlor-propan versetzt und 10 min auf Eis inkubiert, bevor sie 15 min bei $13200 \times g$ und 4°C zentrifugiert wurden. Anschließend wurde die RNA-haltige mit der wässrigen Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 0.5-fachen Vol (bezogen auf das Vol des Tri-Reagent) Isopropanol bei $13200 \times g$ und 4°C gefällt. Das RNA-Pellet wurde im letzten Schritt zweimal mit 800 µl 75%igem Ethanol gewaschen und in DEPC- H_2O (0.1% [w/v] DEPC in H_2O), gelöst.

2.2.4.2. DNase Verdau

DNA-Kontaminationen in RNA-Päparationen wurden durch DNase-Verdau entfernt. Hierfür wurde eine RNase-freie DNase mit den entsprechenden Puffern des Herstellers Promega in folgenden Konzentrationen verwendet.

20 µg	RNA
20 µl	10x Reaktionspuffer
20 U	DNase
ad 200 µl	DEPC-H ₂ O

Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C wurden 20 µl Stopplösung zugegeben und die DNase bei 65°C für 10 min inaktiviert. Da der Reaktionspuffer MgSO₄ enthält, muß bei nachfolgenden RT-PCR Reaktionen beachtet werden, daß sich die Mg²⁺-Konzentration durch die Zugabe von 1 µl der behandelten RNA-Lösung in einem 50 µl RT-Ansatz um 0.2 mM erhöht.

2.2.4.3. Reverse Transkription (RT-Reaktion)

Mit Hilfe der RT-PCR ist es möglich, die Transkription bestimmter Gene oder cDNAs auf RNA-Ebene nachzuweisen. Im ersten Schritt, der RT-Reaktion, wird eine mRNA-Sequenz in eine einzelsträngige cDNA umgeschrieben, die in der folgenden PCR als Matrize für die Synthese der komplementären DNA-Sequenzen dient. Bei der RT-PCR dienen Oligo d(T)₁₆ Oligomere, die mit den poly-A-Enden der mRNA-Sequenzen hybridisieren, als Startpunkt für die Reverse Transkriptase. Ein RT-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Reagenz	Volumen	Konzentration/Menge
Gesamt-RNA	10 µl	1 µg/ 40 µl
RNase-Inhibitor (20 U/µl)	2 µl	1U/ µl
Oligo d(T) ₁₆ (50 µM)	2 µl	2.5 µM
dNTP's (5 mM)	8 µl	1 mM
10fach Puffer	4 µl	1x
MgCl ₂ (25mM)	4.8 µl	3 mM
MuLV-RT (50U/µl)	2 µl	2.5 U/µl
DEPC-H ₂ O	ad 40 µl	-

Die RT-Reaktion wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

10 min	20.0°C
15 min	42.0°C
5 min	99.0°C
5 min	4.0°C

2.2.4.4. RT-PCR

Für eine PCR (siehe 2.2.3.2.) wurden 5 µl des RT-Ansatzes verwendet, wobei sich der PCR-Ansatz wie folgt zusammensetzte:

Material	Volumen	Konzentration/Menge
cDNA	5 µl	-
Forwärts-Primer (10 pmol/µl)	1.25 µl	250 nM
Rückwärts-Primer (10 pmol/µl)	1.25 µl	250 nM
dNTP's (5 mM)	2 µl	0.2 mM
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0.5 µl	2.5 U
10fach Puffer inkl. 15mM MgCl ₂	5 µl	1fach Puffer (1.5 mM MgCl ₂)
dH ₂ O	ad 45 µl	-

Die RT-PCR wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

5 min	94.0°C	
1 min	94.0°C	} 35 Zyklen
1 min	58.8°C	
2 min	72.0°C	
10 min	72.0°C	

Die PCR-Ansätze wurden nach der Reaktion in einem 1%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, wobei je Ansatz 25 µl (die Hälfte) des PCR-Produkts auf das Gel aufgetragen wurde. Anschließend wurden die Bandenintensitäten mit einer digitalen Kamera auf einem Transilluminator unter UV-Licht dokumentiert.

2.2.5. Arbeiten mit Proteinen

2.2.5.1. Herstellung von Zellysaten

Zur Herstellung von Zellysaten aus adhärennten Zellen wurde der Zellmonolayer einmal mit PBS gewaschen und mit kaltem PBS (4°C, 5 ml/T25, 10 ml/T75) vom Boden des jeweiligen Zellkulturgefäßes gelöst. Die durch Auf- und Abpipettieren resuspendierten Zellen wurden in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen überführt und 5 min bei 4°C und 437 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Zellpellet im entsprechenden Lysispuffer (1x10⁶ Zellen in 50 µl;s.u.) einschließlich Proteaseinhibitoren (0.5 mM PMSF und Protease-Inhibitoren Cocktail [complete™: ½ Tablette/5ml Lysispuffer]) gründlich resuspendiert. Auch Suspensionszellen wurden in einem 15 ml-Falcon-Röhrchen bei 836 x g und 4°C pelletiert und vor der Lyse nochmals in 5 ml kaltem PBS gewaschen, bevor das Zellpellet in Lysispuffer resuspendiert wurde. Zur vollständigen Lyse der Zellen wurden die Proben weitere 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Zellysat für 5 min bei 13200 x g und 4°C zentrifugiert, der proteinhaltige Überstand in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C gelagert oder direkt verwendet.

Lysispuffer	Material
NETN-Puffer	20 mM Tris, pH 8; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 10% [v/v] Glycerin; 0.5% [v/v] Nonidet P-40
Luc-Lysis-Puffer	10 mM EDTA, 100 mM DTT, 50% [v/v] Glycerin, 5% [v/v] TritonX-100, 125 mM Tris, (pH 7.8 mit H ₃ PO ₄)

2.2.5.2. Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Zur Expression der verschiedenen GST-SH2-Fusionsproteine (GST = Glutathion-S-Transferase) wurde je eine Bakterienkolonie aus einer entsprechenden Glycerinkultur (Stephan Feller, Julius-Maximilians-Universität, Würzburg) auf einer Ampicillin-haltigen (100 µg/ml) LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Eine 5 ml-Übernachtskultur wurde in 300 ml LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin überführt und unter Schütteln bei 200 rpm und 37°C bis zu einer OD_{595nm} von 0,7 – 0,8 kultiviert. Anschließend wurde durch die Zugabe von 0.5 mM IPTG in den entsprechenden pGEX-Vektoren die Expression des Fusionsproteins induziert, wobei die Bakterien weitere 4 ½ h unter

Schütteln und bei 30°C kultiviert wurden. Dann wurden die Bakterien zentrifugiert (2900 x g, 10 min, 4°C) und das Pellet für mindestens 30 min bei -80°C eingefroren. Die gefrorenen Bakterien wurden in 20 ml LysS-Puffer (50 mM Tris, pH 7.8; 0.4 M NaCl; 0.5 mM EDTA; 10% [v/v] Glycerin; 0.1% [v/v] Nonidet P-40) einschließlich Inhibitoren (5 mM Mercaptoethanol; 0.5 mM PMSF; 10 µg/ml Leupeptid; 10 µg/ml Aprotinin; 10 µg/ml Benzamidin) und Lysozym (0.2 mg/ml) resuspendiert, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei RT inkubiert. Durch Auf- und Abpipettieren wurde die Suspension solange gemischt, bis sie viskos wurde. Anschließend inkubierte das Bakterienlysat weitere 15 min auf Eis, wobei es alle 5 min durch kurzes Schütteln vermischt wurde. Das Lysat wurde dann in einer vorgekühlten Ultrazentrifuge zentrifugiert (150'000 g, 30 min, 4°C, VTi 60-Rotor). Die nachfolgenden Arbeitsschritte fanden auf Eis bzw. bei 4°C statt, außerdem wurden alle weiteren Gebrauchslösungen bei 4°C vorgekühlt. Nach der Ultrazentrifugation wurde der Überstand in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt. Um die Ausbeute an GST-Fusionsprotein zu überprüfen, wurden zu je 1 ml des Überstandes 100 µL Glutathion-Agarose (50%ige Suspension) hinzugegeben. Das Gemisch wurde 1 h auf einem Drehrad inkubiert. In dieser Zeit konnten die Fusionsproteine über ihren GST-Anteil an die Glutathion-Agarose binden und so später abzentrifugiert werden. Das Pellet wurde fünfmal mit je 1 ml 0.5 x LysS-Puffer gewaschen und anschließend in 50 µl Laemmli-Puffer 5 min bei 95°C aufgekocht, bevor es auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt wurde. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend mit Hilfe einer Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.

2.2.5.3. Quantitative Protein-Bestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford beruht auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Blue G-250 an Proteine und der damit verbundenen Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 nm zu 595 nm [Bradford et al., 1976]. Die Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs ist proportional zur Proteinkonzentration. Für eine Standardkurve wurden 980 µl Bradfordreagenz mit 20 µl einer BSA-Lösung mit bekannten Mengen von 0-20 µg vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur erfolgte die photometrische Messung der Proben bei 595 nm. Um den Proteingehalt verschiedener Zellysate zu bestimmen, wurden diese parallel zur Eichkurve mit dem Bradfordreagenz inkubiert und gemessen, so daß die Proteinkonzentration anhand der erstellten Eichkurve ermittelt werden konnte.

Wie in Kap. 3.1.3 beschrieben, wurde die Expressionshöhe von PLC γ in AML1/ETO-transformierten Zelllinien untersucht. Die Proteingehalte der verwendeten Lysate wurde anhand der in Abb. 2.1 dargestellten Bradford-Eichgeraden bestimmt.

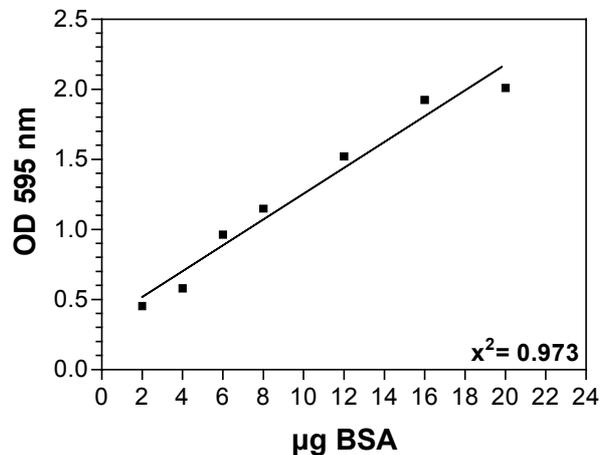


Abb. 2.1. Bradford-Eichgerade. Anhand der Eichkurve wurde die Proteinkonzentration verschiedener Lysate bestimmt, die zum Vergleich der PLC γ -Expressionshöhe in AML1/ETO-transformierten Zellen verwendet wurden (Kapitel. 3.1.3).

2.2.5.4. Coimmunpräzipitation ("Co-IP")

Für Coimmunpräzipitationen mit Zelllysaten wurden die entsprechenden Zellen in NETN-Puffer lysiert (siehe 2.2.5.1.) und 5 min bei 13200 x g und 4°C zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde für die Immunpräzipitation eingesetzt, wobei zu 200 µl Lysat 1 µg Primärantikörper (z.B. anti-PLC γ , anti-STAT5a) gegeben wurde. Nach einer Inkubation von 1 h bei 4°C wurden die gebildeten Immunkomplexe durch die Zugabe von 40 µl Protein-A/G-Agarose gebunden, und anschließend wurde das Lysat für eine weitere Stunde bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Durch eine kurze Zentrifugation konnte die Protein-A/G-Agarose mit den gebundenen Proteinen pelletiert werden. Die Immunkomplexe wurden fünfmal mit NETN-Puffer gewaschen, bevor die präzipitierten Proteine durch 3minütiges Aufkochen in Auftragspuffer (Roti Load) von der Protein-A/G-Agarose eluiert und auf ein SDS-Gel aufgetragen wurden. Im Anschluß daran wurde ein Western Blot und eine immunologische Detektion mit Antikörpern durchgeführt (siehe Abschnitte 2.2.5.6 und 2.2.5.7).

2.2.5.5. "Pull-down-Assays"

Identifizierung möglicher SH2-Domänen als Interaktionspartner des STAT5-Phosphopeptids mittels "Pull-down-Assay"

Zur Untersuchung möglicher Interaktionspartner des STAT5-Phosphopeptids wurden die isolierten SH2-Domänen von Fer, Abl, Crkl, CrK, Fyn, Src, Grb, PLC γ -N, PI3K.p85-C, SHP2-N und SHP2-C als GST-Fusionsproteine in Bakterien exprimiert und aufgereinigt (2.2.5.2.). Für das "Pull-down"-Experiment wurden je 500 μ l der verschiedenen GST-SH2-Lysate entweder mit 20 μ M des Phosphopeptids oder mit 20 μ M des nicht-phosphorylierten Kontrollpeptids versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Das Peptid kann spezifisch über das phosphorylierte Tyrosin, welches in einem STAT5-charakteristischen Sequenz-Motiv (YxxP) eingebettet ist, mit SH2-Domänen interagieren. Bindet das Phosphopeptid an eine SH2-Domäne, wird dieser Komplex mit Hilfe von Streptavidin über den Biotin-Marker des Peptids immobilisiert (Abb.2.2). Hierfür wurden zu den verschiedenen Ansätzen 60 μ g Streptavidin hinzugegeben und 40 min auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert. Um zu zeigen, daß die Bindung des Phosphopeptids an eine SH2-Domäne spezifisch ist, wurde der "Pull-down" zusätzlich mit einem unphosphorylierten Kontrollpeptid durchgeführt, welches somit nicht spezifisch mit SH2-Domänen interagieren kann. Als Ladekontrolle wurden parallel 500 μ l des GST-SH2-Lysats mit 50 μ l Gluthathion-Agarose inkubiert, die später ebenfalls auf das Gel aufgetragen wurden.

Im nächsten Schritt wurden die Streptavidin-SH2- und Gluthathion-GST Komplexe 30 sec bei 13200g abzentrifugiert und 5 mal mit 1 ml LysS-Puffer (50 mM Tris, pH 7.8; 0.4 M NaCl; 0.5 mM EDTA; 100 μ M NaVa₃10% [v/v] Glycerin; 0.1% [v/v] Nonidet P-40) gewaschen, bevor das Pellet in 25 μ l Auftragspuffer (Roat Load) 5 min bei 95°C aufgeköcht wurde. Die von den Streptavidin-"Beads" eluierten SH2-Proteine wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und anschließend mit Coomassie-Brilliant Blau gefärbt.

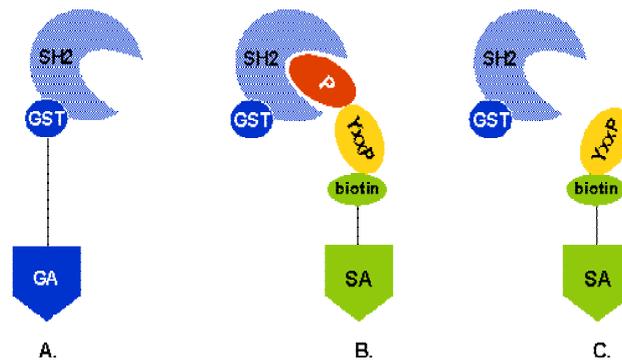


Abb. 2.2. Prinzip der "Pull-down"-Experimente. (A) GST-"Pull-down": Die verschiedenen SH2-Domänen wurden als GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert. Die isolierten GST-SH2-Domänen können über den GST-Anteil mit Hilfe von Glutathion-Agarose angereichert werden. **(B) Phosphopeptid-"Pull-down"**: Interagiert das Phosphopeptid (gelb) spezifisch über sein STAT5-spezifisches Phosphotyrosin (rot) mit einer GST-SH2-Domäne, so kann der Komplex über den Biotinanteil des Phosphopeptides (grün) präzipitiert werden. Die präzipitierten Proteinkomplexe können auf ein SDS-Gel geladen und mit Coomassie-Blau angefärbt werden. **(C) Kontrollpeptid**: Im Kontrollpeptid liegt das Phosphotyrosin im Unterschied zum Phosphopeptid nicht phosphoryliert vor. Somit kann keine spezifische Interaktion mit der GST-SH2-Domäne stattfinden. SH2 = Src-Homologie-Domäne-2; G = GST = Glutathion S-Transferase; GA = Glutathion-Agarose-"Bead"; P = Phosphotyrosin; YxxP = STAT5-Sequenz-Motiv des Peptids; biotin = Biotin-"Tag", SA = Streptavidin-"Bead".

Identifizierung von Proteinen der Signalkaskade als potentielle Interaktionspartner des STAT5-Phosphopeptids mittels "Biotin-Pulldown Assay"

Um eine Interaktion des STAT5-Phosphopeptids mit der SH2-Domäne eines Proteins der Signalkaskade (STAT5a, PLC γ , PI3K) nachzuweisen, wurden Pulldown-Experimente mit Zelllysaten von Kasumi-1 und JK-1-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden 150 μ l des jeweiligen Zelllysats mit 20 μ M des Phospho-Peptids oder des Kontrollpeptides 20 min auf Eis inkubiert. Bindet das Phosphopeptid spezifisch an eine SH2-Domäne, kann der ganze Komplex aus Signalprotein und Phosphopeptid über den Biotinmarker des Peptids immobilisiert werden. Hierfür wurden zu den verschiedenen Ansätzen je 18 μ g Streptavidin hinzugegeben und 40 min auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die pelletierten Streptavidin/Phosphopeptid/Protein-Komplexe dreimal mit je 1 ml NETN-Puffer (20 mM Tris, pH 8; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 10% [v/v] Glycerin; 100 μ M NaVa₃, 0.5% [v/v] Nonidet P-40) gewaschen, in 15 μ l Laemmli-Puffer aufgenommen und 5 min bei 95°C gekocht. Die vom Streptavidin eluierten Signalproteine wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und durch Western Blot auf eine Trägermembran (PVDF) übertragen, um eine immunologische Detektion der Signalproteine durchzuführen (siehe 2.2.5.6.).

2.2.5.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot

In der SDS-Gelelektrophorese können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dabei werden die Proteine in Anwesenheit reduzierender Agenzien (DTT und β -Mercaptoethanol) und SDS aufgekocht, wodurch ihre natürliche Ladung durch die negative Ladung des SDS maskiert wird. Die meisten Proteine binden SDS in einem konstanten Gewichtsverhältnis. Pro gebundenem SDS-Molekül tragen jeweils zwei negative Ladungen zur Gesamtladung bei, so daß es zu einem Ausgleich von Ladungsdifferenzen zwischen unterschiedlichen Proteinen und einer negativen Nettoladung kommt. Deshalb wandern mit SDS komplexierte Moleküle bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese entsprechend ihres Molekulargewichts (MW) zur Anode.

In dieser Arbeit wurde zur Auftrennung von Proteinen das Laemmli-System mit Tris-Glycin-Puffern verwendet. Die Gele setzten sich aus einem Trenngel (Tris-Glycin-Puffer, pH 8.8; 5–20% Acrylamid) und einem Sammelgel (Tris-Glycin-Puffer, pH 6.8; 3–4% Acrylamid) zusammen. Die Acrylamid-Konzentration des Trenngels richtete sich nach den Molekulargewichten (MW) der aufzutrennenden Proteine:

MW	Acrylamid
< 30 kDa	15 %
30 – 50 kDa	12 %
50 – 100 kDa	10 %
> 100 kDa	8 %

Zunächst wurde das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet, welches nach dem Auspolymerisieren des Gels wieder vollständig entfernt wurde. Um ein besseres Trennergebnis zu erhalten, wurde das Trenngel noch mit einem Sammelgel überschichtet. Anschließend wurde das Gel in die Gelkammer eingebaut und diese mit SDS-Laufpuffer (25 mM Tris-Base; 192 mM Glycin; 0.1% [w/v] SDS) aufgefüllt. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben mit der entsprechenden Menge an Auftragspuffer (Roti Load) versetzt und für 3 min bei 95°C gekocht, bevor sie auf das SDS-Gel aufgetragen wurden. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer Spannung von 100 V, die nach dem Eintritt der Proteine in das Trenngel auf 150 V erhöht wurde. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde ein Größenstandard (BenchMark, Life Technologies) mitgeführt.

Western Blot

Die Western-Blot-Methode ermöglicht es, Proteine aus einem SDS-Gel quantitativ auf eine inerte Membran zu übertragen, um sie so für Antikörper zugänglich zu machen. Dazu wurde das SDS-Gel nach erfolgter Auftrennung der Proteine luftblasenfrei auf eine Polyvinylidendifluorid- (PVDF) Membran gelegt, die zuvor kurz in Methanol aktiviert wurde. Das SDS-Gel und die PVDF-Membran wurden beiderseits mit je zwei Lagen Whatman-Papier versehen, die vorher in Transferpuffer (25 mM Tris-Base; 192 mM Glycin; 20% [v/v] Methanol) getränkt wurden. In dieser Anordnung wurde das sog. "Western-Blot-Sandwich" in eine Mini-Trans-Blot-Kammer eingebaut, die mit gekühltem Transferpuffer gefüllt wurde. Der Transfer erfolgte für 2 h bei 5 mA/ cm² unter ständiger Kühlung.

2.2.5.7. Immunologischer Nachweis der Proteine

Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran zunächst zum Absättigen unspezifischer Bindungen für 1 h bei RT oder Ü/N bei 4°C in Blockierlösung (PBS, 0.1% [v/v] Tween 20, 5 % [w/v] Magermilchpulver) inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in einer frischen Blockierlösung, wobei die Menge des jeweiligen Antikörpers abhängig von den Angaben des Herstellers gewählt wurde. Die optimierten Konzentrationen der verschiedenen Antikörper und deren entsprechende Inkubationszeiten sind in folgender Tabelle zusammengefaßt:

Antikörper	Konzentration	Inkubationszeit
Anti-Crk-L	0.8 µg/ml	3 h
Anti-ETO Ab-1	1.6 µg/ml	15-18 h
Anti-Flag [®] M2	10 mg/ml	45 min
Anti-Gal4 DBD	1.6 µg/ml	15-18 h
Anti-Grb2	0.25 µg/ml	3 h
Anti-HA	0.4 mg/ml	15-18 h
Anti-PI3-Kinase	0.1 µg/ml	3 h
Anti-PLCγ	1 µg/ml	3 h
Anti-STAT5a	0.1 µg/ml	3 h
Anti-VSV G	8.1 µg/ml	2 h

Nach der Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper wurde die PVDF-Membran 3–5 mal je 5 min mit PBST (PBS, 0.1% [v/v] Tween 20) gewaschen und im nächsten Schritt

45 min mit dem entsprechenden sekundären Antikörper inkubiert. Dieser wurde unmittelbar vor Gebrauch 1:10.000 in Blockierlösung verdünnt. Nach Inkubation mit dem Zweitantikörper wurde die Membran erneut 3–5 mal je 10 min mit PBST gewaschen, bevor die gebildeten Immunkomplexe durch Zugabe von ECL-Lösung (ECL : "enhanced chemiluminescens") detektiert wurden. Durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase kommt es zu einer Oxidation des in der ECL-Lösung enthaltenen Luminols, wodurch Chemilumineszenz erzeugt wird. In einer Expositionskassette wurde ein photosensitiver Film auf die Membran gelegt, auf dem nach der Entwicklung die detektierten Proteine als schwarze Banden erkennbar waren. Sollte dieselbe Membran anschließend mit einem weiteren Antikörper hybridisiert werden, so wurden die bereits auf der Membran vorhandenen Antikörper durch eine 20-minütige Inkubation in einem 0.1 M Glycin-Puffer (pH 2.9) inaktiviert. Vor der Hybridisierung mit einem weiteren Antikörper wurde die Membran erneut in einer Blockierlösung (PBST, 5% [w/v] Milchpulver) blockiert.

2.2.5.8. Ponceau Rot Färbung

Um den Transfer der Proteine aus dem SDS-Gel auf die PVDF-Membran abschätzen zu können, wurden diese auf der Membran reversibel mit Ponceau Rot (0.1% [w/v]) angefärbt. Hierfür wurde die Membran für wenige Minuten mit der Färbelösung inkubiert bis das komplette Profil der transferierten Proteine sichtbar war. Das Detektionslimit liegt bei 1-2 µg Protein. In weiteren Inkubationsschritten mit PBS wurde die Färbung der Membran wieder rückstandlos entfernt, bevor mit der Immunodetektion fortgefahren wurde.

2.2.5.9. Coomassie-Färbung

Die auf einem SDS-Gel aufgetrennten Proteine aus Zellysaten oder aufgereinigte GST-Fusionsproteine konnten mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt werden. Hierfür wurden die Gele 20 min in einer Coomassie-Lösung (0.25% [w/v] Brilliant Blue R; 40% [v/v] Methanol; 7% [v/v] Essigsäure) geschwenkt. Anschließend wurden sie so lange in Entfärbelösung (20% [v/v] Methanol, 7% [v/v] Essigsäure) gelegt, bis der Hintergrund wieder entfärbt war und die Proteine deutlich als blaue Banden erkennbar waren. Die Gele wurden anschließend in Cellophan eingehüllt und in einem Getrockner (GelAir Dryer, BioRad) innerhalb 1h getrocknet.

2.3. Zellbiologische Methoden

2.3.1. Kultivierung von adhärennten und Suspensions-Zelllinien

Die adhärennten Zelllinien (Kap. 4.2.3.) wurden in DMEM und die Suspensions-Zelllinien (Kap. 4.2.3.) in RPMI 1640 jeweils einschließlich 4 mM L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin und 10% hitzeinaktiviertem FCS (Δ FCS; 30 min, 56°C) kultiviert. Alle Zellen wurden im Zellkulturbrutschrank bei 5% CO₂ und 37°C gehalten.

Zum Passagieren der adhärennten Zellen wurde zunächst das Medium komplett entfernt. Die Zellen wurden einmal mit vorgewärmten (37°C) PBS (137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 1.5 mM KH₂PO₄) gewaschen und anschließend durch Zugabe von Trypsinlösung (0.05 % Trypsin; 0.55 mM EDTA, 137 mM NaCl in PBS) vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Hierfür wurden die Zellen solange bei 37°C mit der Trypsinlösung inkubiert, bis sie sich durch leichtes Klopfen gegen die Flasche vom Boden ablösten. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von Medium (DMEM; FCS/ Glutamin/ Penicillin/ Streptomycin) und dem darin enthaltenem Δ FCS gestoppt und die Zellen in einem geeignetem Verhältnis in eine neue Zellkulturflasche gesplittet.

Die Suspensionszellen wurden zum Splitten bei 437 x g und 4°C pelletiert und in frischem Medium (RPMI; FCS/ Glutamin/ Penicillin/ Streptomycin) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in einem geeignetem Verhältnis auf eine Zellkulturflasche mit frischem Medium (RPMI; FCS/ Glutamin/ Penicillin/ Streptomycin) verdünnt.

2.3.2. Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen

Von jeder Zelllinie wurden außerdem Reserven in flüssigem Stickstoff angelegt. Dazu wurden Aliquots mit je 5x10⁶/ml Zellen in 80% Medium, 10% Δ FCS und 10% (v/v) DMSO resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt und sofort bei -80°C eingefroren. Nach 24 h wurden die Kryoröhrchen in einen Stickstofftank umgelagert, wo sie für viele Jahre eingefroren bleiben können. Um die eingefrorenen Zellen möglichst schonend wieder aufzutauen, wurden diese zügig in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt. Nach dem Auftauen wurden die Zellen sofort im entsprechendem Kulturmedium aufgenommen und bei 437 x g und 4°C abzentrifugiert, das Medium verworfen und die Zellen nochmals in frischem Medium resuspendiert. Im letzten Schritt wurde die Zellsuspension auf eine Kulturflasche ausgesät und die Zellen je nach Wachstum nach ein bis zwei Tagen zum ersten Mal passagiert.

2.3.3. Zelllinien

293 und 293T

Die HEK-293 sind humane Nierenzelllinien, die aus primärem embryonalem Nierengewebe gewonnen und mit dem Adenovirus E1A-Genprodukt transformiert wurden. Die 293T-Zelllinie exprimiert zusätzlich das SV40 "large T"-Antigen (zusammen mit einem G418-Resistenzgen [DuBridge et al., 1987]) was die episomale Replikation von Plasmiden mit SV40-Replikationsursprung und entsprechendem Promotor ermöglicht [Graham et al.; 1977]. Die 293-Zelllinien lassen sich sehr effizient (70-90%) transfizieren, weshalb sie sich gut als Verpackungszelllinien zur Virusproduktion eignen. In Kultur wachsen sie adhärent und werden in DMEM (Δ FCS/ Glutamin/ Penicillin/ Streptomycin) gehalten. Die Verdopplungszeit der Zellen beträgt ca. 20 bis 24 h, und die konfluente Kultur wird alle drei bis vier Tage 1:5 bis 1:10 gesplittet.

Phoenix-gp

Die Phoenix-gp Zelllinie ist die zweite Generation der 293T-Verpackungszelllinie, welche zusätzlich zum "large T"-Antigen stabil die vom Moloney-Leukämievirus (MLV) abgeleiteten Gene *gag* und *pol* exprimiert. Die Expression der Proteine kann über einen Maus-CD8 α -Oberflächenmarker kontrolliert werden. Außerdem wurde ein Hygromycin-Markergen kotransfiziert, so daß zusätzlich eine Positivselektion der Phoenix-gp Zellen durchgeführt wurde. Zur Virusproduktion müssen die Verpackungszellen noch mit einem Vektor, der für ein Hüllprotein ("envelope") kodiert, und mit dem entsprechenden retroviralen Transgenvektor transfiziert werden. Die Kulturbedingungen sind dieselben wie die für die 293- und 293T-Zelllinien [Pear et al.; 1993]

NIH3T3

Hierbei handelt es sich um Maus-Fibroblasten, die aus "Schweizer-Albino"-Mausembryonen etabliert wurden. Die NIH3T3 Zellen wachsen adhärent, wobei ihr Wachstum durch "Zell-Zell"-Kontakt inhibiert wird. Charakteristisch ist, daß diese Zelllinie diese Kontaktinhibition durch die Expression eines einzigen Onkogens verliert und z.B. im Agar Kolonien bildet [Todaro et al., 1965]. Dies ist auch bei Expression des AML1/ETO-Fusionsproteins der Fall [Frank et al., 1999]. Der in Kap. 3.1.3 verwendete NIH3T3-AML1/ETO-Zellklon ist stabil mit einem retroviralen AML1/ETO-Konstrukt (MSCV)

transduziert, das zusätzlich für ein Neomycin-Resistenzgen kodiert. Die Zellen werden bei einer Verdopplungszeit von 40 h alle 2-4 Tage im Verhältnis 1:8 gesplittet.

Te671

Te671 ist eine humane Rhabdomyosarkomzelllinie. Die Zellen wachsen adhärent und werden auf Grund ihrer langen Verdopplungszeit (100 h) alle 5-8 Tage im Verhältnis 1:3 gesplittet [McAllister et al, 1977]. Die Te671 wurden bei der Etablierung des in Kap. 3.2.1 beschriebenen transienten Selektionssystems mit einer über Gal4-ETO regulierbaren Virusproduktion verwendet, da sie sich mit den VSV-G pseudotypisierten viralen Partikeln sehr leicht transduzieren lassen.

Kasumi-1

Kasumi-1-Zellen sind humane myeloische Leukämiezellen, die aus dem peripheren Blut eines 7jährigen Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (FAB M₂) gewonnen wurden. Die Zellen tragen die Translokation (8;21) und exprimieren das AML1/ETO-Fusionsgen. Die runden Zellen wachsen einzeln oder in kleinen Zellaggregaten in Suspension. Ihre Verdopplungszeit beträgt zwischen 48 und 72 h. Gesplittet werden die Zellen alle 3 Tage 1:2 bis 1:4, wobei die optimale Zelldichte bei 0.5×10^6 Zellen/ml liegt. [Asou et al, 1991].

TF-1

Die humane Zelllinie TF-1 wurde aus Knochenmarkszellen eines Patienten mit Erythroleukämie, die dem Typ AML-M6 zugeordnet wird, etabliert. Morphologisch ähneln TF-1 Zellen unreifen Erythroblasten. Die Suspensions-Zellen wurden in Gegenwart von 3 ng/ml rh-IL-3 kultiviert, da die Proliferation der TF-1-Zellen vom hämatopoetischen Wachstumsfaktor IL-3 abhängig ist. Zusätzlich lassen sich diese Zellen mit Erythropoietin in Richtung Erythrozyten ausdifferenzieren, während mit Phytohämagglutinin eine Differenzierung in Richtung Makrophagen erreicht wird [Kitamura et al., 1989]. Die Zellen haben eine Verdopplungszeit von 70 h und werden alle 3 Tage im Verhältnis 1:2 gesplittet.

Der in Kap. 3.1.3 beschriebene TF1-AML1/ETO-Zellklon wurde stabil mit einem retroviralen AML1/ETO-Konstrukt transduziert, das zusätzlich für ein Neomycin-

Resistenzgen kodiert. Die Expression von AML1/ETO führt in den TF1-Zellen zu einem für das Fusionsprotein charakteristischen Differenzierungsblock.

JK-1

JK-1-Zellen wurden von einem 62 Jahre alten Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie generiert. Der Patient befand sich in einer erythroiden Blastenkrise, so daß sich die JK-1-Zellen durch δ -Amino-Levulinsäure in Richtung Erythrozyten differenzieren lassen, was anhand des erythroiden Oberflächenmarkers Glykophorin A gemessen werden kann. Die JK-1-Zelllinie wird in Suspension kultiviert, wobei die Zellzahl zwischen $0.3 \cdot 10^6$ Zellen/ml liegen sollte. Die Verdopplungszeit liegt bei 50 h [Okuno et al., 1990].

U937

Die Promyelozyten Zelllinie wurde von einem 37-jährigen Patienten mit einem Lymphom etabliert. Die Zellen haben eine Verdopplungszeit von 30-40 Stunden. Gesplittet werden die U937 alle 2-3 Tage 1:2 bis 1:5.

Der in Kap. 3.1.3 beschriebene U937-Zellklon (freundlicherweise von M. Ruthard; Frankfurt/Main) ist mit einem retroviralen AML1/ETO-Konstrukt transduziert. Die AML1/ETO-Expression kann durch Zinkzugabe (Zn^{2+}) über einen Zink-abhängigen MT-1-Promotor induziert werden [Gelmetti et al., 1998; Puccetti et al., 2002]. Hierfür werden U937-Zellen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden ($6 \cdot 10^5$ - $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml) in Anwesenheit von $100 \mu M$ $ZnSO_4$ kultiviert. Der Expressionspeak wird nach 8 Stunden erreicht. Die AML1/ETO-Expression hat zur Folge, daß sich die U937 nur noch begrenzt mit Vitamin D_3 und TGF β differenzieren lassen. Den Anteil der differenzierten U937-Population kann mit einem CD14-Oberflächenmarker in einer FACS-Analyse (Kap. 2.3.7) bestimmt werden.

2.3.4. Gentransfer fremder DNA in eukaryotische Zellen

2.3.4.1. Calciumphosphat-Transfektion

Der Gentransfer fremder DNA in verschiedene 293-Zelllinien wurde mit Hilfe der Calciumphosphat-Transfektion durchgeführt. Bei dieser Technik entsteht ein feines DNA-Calciumphosphat-Präzipitat, das von den Zellen über Endozytose aufgenommen wird [Graham et al., 1973].

Die zu transfizierenden Zellen wurden 24 h vor der Transfektion auf einer gelatinisierten Zellkulturschale ausgesät. Dabei wurden für eine 10 cm-Kulturschale 4×10^6 Zellen und für eine 6-Napfplatte je Napf 8×10^5 Zellen eingesetzt. Vor der Transfektion wurde das Medium gegen frisches, Chloroquinhaltiges (25 μ M) [Kneuer et al., 2000; Ciftci et al., 2001] DMEM (FCS/ Glutamin/ Penicillin/ Streptomycin) ausgetauscht. Für das Präzipitat wurden in einem 14ml-Falcon-Röhrchen die DNA (25 μ g) und 250 mM CaCl_2 in 500 μ l dH_2O vorgelegt. Zu diesem Ansatz wurde 500 μ l 2x HBS (100 mM HEPES; 281 mM NaCl, 1.5mM Na_2HPO_4 , pH 7.12) langsam hinzugegeben und gleichzeitig durch Ausblasen einer 2ml-Pipette ca. 1 min aufgeschäumt. Das Präzipitat wurde vorsichtig tropfenweise auf den vorbereiteten Zellen verteilt. Nach 8stündiger Inkubation im Brutschrank erfolgte ein kompletter Mediumwechsel.

2.3.4.2. Generation stabil transfizierter Zellklone

Zur Etablierung stabil transfizierter 293-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion 3.5×10^6 Zellen auf eine gelatinisierte 10 cm-Kulturschale ausgesät. Von den Expressionsvektoren, die einen geeigneten Selektionsmarker enthielten, wurden 25 μ g der entsprechenden Plasmid-DNA in die 293-Zellen transfiziert (siehe 2.3.4.1). Vektoren ohne Selektionsmarker wurden im Verhältnis 1:10 mit einem Resistenzgen-haltigen vermittelnden Plasmid transfiziert.

24 h nach der Transfektion wurden die Zellen trypsiniert und je 2.5×10^6 Zellen auf eine T75-Kulturflasche ausgesät, so daß eine Konfluenz von ca. 50% erreicht wurde. Nach weiteren 24 h wurde das Selektionsmedium hinzugegeben. Die Antibiotika G418 und Puromycin wurden in Konzentrationen von 400 μ g/ml bzw. 1 μ g/ml eingesetzt. Um die abgestorbenen Zellen zu entfernen und die Selektion aufrecht zu erhalten, wurde alle zwei Tage ein Mediumwechsel vorgenommen. Die Selektion mit dem Nukleosid-Analoga Ganciclovir wurde in einer Konzentration von 100 μ M durchgeführt, wobei hier das Medium täglich gewechselt wurde.

Aus den resistenten Zellen entstanden nach 2-3 Wochen einzelne Klone, die mit Hilfe von Raschig-Ringen isoliert wurden. Hierfür wurde das Medium vollständig abgezogen, bevor die Raschig-Ringe, deren Ränder leicht eingefettet waren, zügig über (die zuvor mit einem Stift markierten) Klone gesetzt wurden. Anschließend wurden je 100 µl Trypsinlösung in die Ringe pipettiert, und die Klone wurden kurz darauf mit einer Pipettenspitze durch ein- bis zweimaliges Auf- und Abpipettieren abgelöst und in eine mit Medium gefüllte 24-Napf-Platte überführt. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die angewachsenen Klone in entsprechend größere Zellkulturgefäße überführt.

2.3.4.3. Transiente Transfektion zur Herstellung von Virusüberständen und Transduktion verschiedener 293-Zellen

Zur Herstellung viraler Partikel wurden 293T-Zellen einer niedrigen Passage (Passage 4 bis 10) auf einer gelatinisierten 10 cm-Kulturschale ausgesät. Damit die Zellen virale Partikel produzieren, müssen sie mit einem retroviralen Vektor, einem Verpackungskonstrukt und einem Pseudotypisierungskonstrukt transfiziert werden. Die entsprechenden Vektoren wurden im Verhältnis 20 µg, 13 µg und 7 µg je 10 cm-Kulturschale mit Hilfe der Calciumphosphat-Methode transfiziert (siehe 2.3.4.1).

Nach 8-stündiger Inkubation des Transfektionsansatzes im Brutschrank erfolgte ein Mediumwechsel, wobei der Virusüberstand, in Abhängigkeit von den entsprechenden Zielzellen in 5 ml DMEM oder RPMI (jeweils mit FCS/ Glutamin/ Penicillin/ Streptomycin) gesammelt wurde. Nach 48 h wurde der Virusüberstand geerntet und durch einen 0.45 µm-Filter filtriert, um abgelöste Zellen zu entfernen. Danach wurde er direkt zur Transduktion von Zielzellen eingesetzt, wobei zur Verbesserung der Transduktionsrate noch 4 µg/ml Polybren zugesetzt wurde. Hierbei handelt es sich um ein Polykation, welches die Affinität zwischen den viralen Partikeln und den Zellen erhöht [Guy J et al., 1995]. Der Virusüberstand wurde anschließend auf die entsprechenden Zielzellen gegeben, die 24 h zuvor mit einer Konfluenz von 75% ausgesät wurden. Nach 8 h Inkubation wurde der Virusüberstand wieder entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Mit der Analyse der transduzierten Zellen wurde zwischen Tag 2 und 4 begonnen.

2.3.4.4. Transiente Transfektion zur Herstellung von Virusüberständen in Abhängigkeit einer Gal4-ETO regulierten VSV-G Expression

Zur Etablierung des in Kapitel 3.2.1 beschriebenen transienten *In-vitro*-Selektionssystems zur Identifizierung AML1-ETO-inhibierender Peptide wurden 24 h vor der Transfektion 8×10^5 Phoenix-gp Zellen pro Vertiefung einer gelatinisierten 6-Napf-Platte ausgesät. Die Zellen wurden in vierfachen Ansätzen mit je 200 μ l eines DNA-Präzipitats transfiziert, das aus 2.25 μ g der für das Hüllprotein kodierenden Konstrukte Δ pMD.G (Δ CMV-2xUAS-TK-VSV-G) oder pMD.G, 3.75 μ g des retroviralen Vektors PINCO und 0.25 μ g-0.005 μ g des Repressors pCMX-Gal4-ETO bzw. pCMX-Gal4 enthielt. Im Gegensatz zum Vektor Δ pMD.G befindet sich im Kontrollvektor pMD.G keine Gal4-Bindungsstelle vor der für das VSV-G kodierenden Sequenz. Um immer gleiche Mengen an Plasmid-DNA zu transfizieren, wurde die DNA-Menge in allen Ansätzen mit dem Vektor pcDNA3 auf eine bestimmte Konzentration aufgefüllt.

Um zu zeigen, daß Gal4-ETO die Expression des VSV-G im Konstrukt Δ pMD.G reprimiert, wurde der Histon-Deacetylase-Inhibitor Trichostatin A (TSA) verwendet, der nach 8 stündiger Inkubation der Zellen mit dem DNA-Präzipitat in einer Konzentration von 100 nM beim Medienwechsel zugegeben wurde.

Die viralen Partikel wurden in 1 ml DMEM je 6-Napf gesammelt, 48 h nach der Transfektion geerntet und durch einen 0.45 μ m-Filter filtriert. Zur Transduktion von Te671 wurden dem geerntetem Virusüberstand 4 μ g/ml Polybren hinzugefügt. Danach wurde je 1 ml des vorbereiteten Überstandes vorsichtig zu den 24 h zuvor ausgesäten Te671 (6×10^5 Zellen/6-Napf) gegeben. Die Transfektionseffizienz der transfizierten Phoenix-gp Zellen wurde nach 48 h und die Transduktionseffizienz der zugehörigen Te671-Zellen nach 5 Tagen anhand der EGFP-Expression ("Enhanced Green Fluorescence Protein") mittels Durchflußzytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting; FACS; siehe 2.3.7.) ermittelt.

2.3.4.5. Titerbestimmung auf adhärennten Zellen mittels FACS-Analyse

Da im verwendeten Pinco-Vektor zusätzlich über einen CMV-Promotor das EGFP exprimiert wurde, konnten sowohl Transfektions- als auch Transduktionseffizienz anhand der EGFP-Expression durch FACS-Analyse bestimmt werden (Kap. 3.2). Um eine Aussage über die Infektiösität des Virusüberstandes treffen zu können, muß die Transduktionrate unter 20% liegen. Anhand der ermittelten Effizienz konnte der Titer nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Titer [TU/ml]} = \frac{\text{Anteil transduzierter Zellen [\%]}}{100 \%} \times \text{Zellzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Die "Zellzahl" bezieht sich auf die Zahl der Zellen zum Zeitpunkt der Zugabe des Virusüberstandes, der "Verdünnungsfaktor" auf den Virusüberstand. Der Titer wird in "Transducing Units per ml" [TU/ml] angegeben.

2.3.5. Zell-Proliferations-Test

2.3.5.1. Wachstumskinetik von 293-Zellklonen unter verschiedenen Selektionsmedien

Zur Analyse der in Kapitel 3.2.2 beschriebenen stabil transfizierten 293-Zellklone wurde deren Wachstumsverhalten unter verschiedenen Selektionsbedingungen untersucht. Hierfür wurden je Bedingung zwei Ansätze mit je 6×10^3 - 8×10^3 Zellen in 1 ml DMEM (FCS/ Glutamin/ Penicillin/ Streptomycin) auf eine gelatinisierte 24-Napf-Platte ausgesät. Nach 8 h wurde ein erster Medienwechsel durchgeführt, wobei für den entsprechenden Test eine Vorinkubation mit 1 mM Butyrat erfolgte. Weitere 8 h später konnte mit der Selektion begonnen werden. Dem Medium (FCS/ Glutamin/ Penicillin/ Streptomycin) wurden 1 mM Butyrat, 400 µg/ml G418, 100 µM GCV oder die Kombination aus einem der beiden Selektionsmedien und Butyrat zugegeben. Um den Einfluß der einzelnen Komponenten später miteinander vergleichen zu können, wurden außerdem die entsprechenden 293-Zellen während des Tests ausschließlich in DMEM (FCS/ Glutamin/ Penicillin/ Streptomycin) kultiviert. Ein Medienwechsel unter G418-Selektionsbedingungen erfolgte alle 2-3 Tage, unter GCV-Selektionsbedingungen täglich.

Die Zellzahl der einzelnen Ansätze wurde alle 2-3 Tage mittels Trypan-Blau-Auszählung in einer Zählkammer bestimmt und dokumentiert. Hierfür wurde das Medium abgezogen und die Zellen 1 mal mit 1 ml PBS gewaschen, bevor sie unter 100 µl Trypsinlösung abgelöst und in 500 µl DMEM resuspendiert wurden. Je Bedingung wurden immer zwei 24-Näpfe trypsinisiert und je zweimal ausgezählt.

2.3.5.2. MTS-Assay

Mit Hilfe des MTS-Reagenzes kann die Anzahl lebender Zellen bestimmt werden, wobei das Reagenz vom im Stoffwechsel lebender Zellen produzierten NADPH oder NADH reduziert wird. Durch die Reduktion entsteht aus der MTS-Tetrazolium-Komponente ein lösliches, gefärbtes Formazan-Produkt, dessen Konzentration photometrisch bei 490 nm gemessen werden kann und direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen ist.

Zur Analyse der in Kapitel 3.3.2 beschriebenen stabil transfizierten 293-Zellklone wurde deren Wachstumsverhalten unter verschiedenen Selektionsbedingungen charakterisiert. Mit Hilfe des MTS-Assays wurde eine große Anzahl der Klone in einer Endpunktmessung untersucht. Hierfür wurden 1×10^3 Zellen in 100 μl je 96-Napf ausplattiert, wobei die Kulturplatten zuvor gelatinisiert wurden. Die Selektionsbedingungen waren dieselben wie in Abschnitt 2.3.6.1. beschrieben. Nach 12-14 -Tagen wurde die Auswertung vorgenommen, wobei je Napf 100 μl des MTS-Reagenzes zugegeben wurde. Anschließend wurde die Platte für 2 h im Brutschrank inkubiert, bis die Proben auf der Platte mit Hilfe eines ELISA-Readers bei 490 nm gemessen werden konnten.

2.3.6. Durchflußzytometrie (FACS-Messung)

Durchflußzytometer sind opto-elektronische Meßsysteme, die optische Signale unterschiedlicher Qualität wie Lichtstreuung und Fluoreszenzsignale erfassen. Mit Hilfe dieser Methode können individuelle Zellparameter einer signifikanten Anzahl von Zellen innerhalb von wenigen Sekunden erfaßt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die intrazelluläre Expression des EGFP einer Zellpopulation sowohl quantitativ als auch qualitativ gemessen.

Für jede FACS-Markierung wurden mindestens 1×10^5 Zellen je Messung eingesetzt. Die Probe wurde hierfür in ein FACS-Röhrchen gegeben und 5 min mit $437 \times g$ bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Zellpellet wurde einmal mit 3 ml FACS-Puffer (PBS, 1% [v/v], ΔFCS , 0.1% [w/v] NaN_3) gewaschen. Anschließend wurden sie mit 200 μl der FACS-Fixierlösung (PBS, 1% (v/v) Formaldehyd) versehen und konnten bis zur Messung bei 4°C aufbewahrt werden.

2.4. Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

Zur Auswertung und graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde das Statistik-Programm „Prism“ verwendet (GraphPad, San Diego: www.graphpad.com/welcome.htm).

3. Ergebnisse

3.1. Ein STAT5 antagonistisches Peptid führt zum Wachstumsarrest in AML1/ETO-transformierten Zellen

Vorversuche zeigten, daß die Expression von AML1/ETO in TF-1-Zellen zu einer verstärkten Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT5 führt (Kap. 1.7). In hämatopoetischen Zellen ist dieser Transkriptionsfaktor an der Regulation proliferativer, apoptotischer und differenzierender Signale beteiligt. Die STATs liegen im Zytoplasma als inaktive Transkriptionsfaktoren vor. Nach Bindung über ihre SH2-Domäne an Phosphotyrosin-Motive aktivierter Zytokinrezeptoren werden sie von assoziierten JAKs (Januskinasen) spezifisch an einem Tyrosin im C-terminalen Bereich phosphoryliert [Barber et al., 2001]. Die phosphorylierten STAT-Moleküle bilden über eine reziproke Interaktion zwischen dem Phosphotyrosin im C-terminalen Bereich und der SH2-Domäne Homo- und Heterodimere. Die Dimere werden anschließend in den Kern transloziert, wo sie die Transkription spezifischer Gene aktivieren [Ehret et al., 2001; Hoey et al., 1998; Ihle et al., 1996]. Eine konstitutive Aktivierung des STAT5-Signalweges ist mit einer Reihe verschiedener Leukämieerkrankungen assoziiert [Spiekermann et al., 2002; Lin et al., 2000; Mizuki et al., 2000].

In Kolonieassays konnte das Wachstum der AML1/ETO-transformierten TF-1-Zellen durch ein Phosphopeptid gehemmt werden. Dieses Peptid besteht aus einem 8 Aminosäuren umfassenden Motiv um das C-terminale Tyrosin 694 des STAT5-Proteins (AVDGY(**phos**)VKPQ). Über den phosphorylierten Tyrosinrest soll das Peptid kompetitiv an die SH2-Domäne eines STAT5-Moleküls binden. Dadurch würden dessen reziproke Dimerisierung mit einem weiteren STAT-Molekül und der Transport in den Zellkern verhindert werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Wirkmechanismus des Phosphopeptids geklärt werden.

3.1.1. Phosphopeptid-"Pull-down"-Experimente mit isolierten SH2-Domänen unterschiedlicher Signalmoleküle

In „Pull-down“-Experimenten wurde untersucht, ob das beschriebene Phosphopeptid mit STAT5 oder mit isolierten SH2-Domänen aus weiteren Signalproteinen (z.B. PI3.K oder PLC γ) interagiert. Die Bindungsspezifität eines solch kurzen Phosphopeptids wird vor allem von den direkt auf das Phosphotyrosin folgenden Aminosäuren beeinflusst [Marengere et al., 1994; Birge et al., 1993; Songyang et al., 1993]. Songyang et al. haben

bezüglich der SH2-Bindungsspezifität Untersuchungen mit einer degenerierten Phosphopeptid-Bibliothek durchgeführt. In Kooperation mit Dr. Stephan Feller von der Universität Würzburg wurde basierend auf der Arbeit von Songyang et al. eine Vorauswahl an zu testenden SH2-Domänen getroffen. Die verschiedenen SH2-Domänen wurden als GST-Fusionsproteine exprimiert und aus *E. coli* aufgereinigt, bevor sie in den „Pull-down“-Versuchen mit dem Phosphopeptid eingesetzt wurden.

Fand eine Interaktion zwischen dem Phosphopeptid und einer SH2-Domäne statt, so konnte der Komplex aus biotinyliertem Phosphopeptid und der SH2-Domäne mit Hilfe von Streptavidin immobilisiert werden (Abb. 3.1B). Dabei muß das Peptid spezifisch über das phosphorylierte Tyrosin, welches in einem STAT5-charakteristischen Sequenzmotiv eingebettet war (YxxP), an eine SH2-Domäne binden. Die Spezifität der Bindung wurde mit einem biotinylierten Kontrollpeptid überprüft, welches sich lediglich durch die nicht vorhandene Phosphorylierung des Tyrosins unterscheidet und somit nicht spezifisch mit einer SH2-Domäne interagieren kann (Abb. 3.1C).

Als Ladekontrolle wurden die SH2-GST-Fusionsproteine mit Glutathion-Agarose angereichert, die den GST-Anteil des Proteins bindet (Abb. 3.1A). Die Proben wurden anschließend auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt.

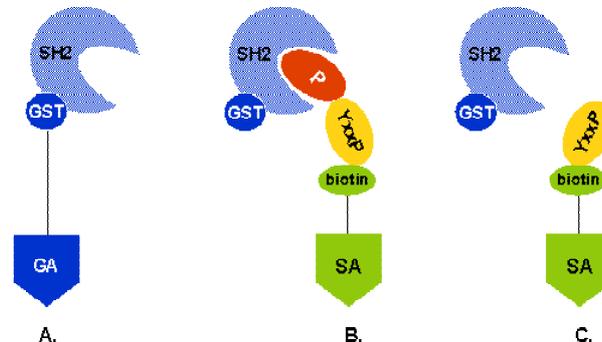


Abb. 3.1. Prinzip der "Pull-down"-Experimente. (A) GST-"Pull-down": Die verschiedenen SH2-Domänen wurden als GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert. Die isolierten GST-SH2-Domänen können über den GST-Anteil mit Hilfe von Glutathion-Agarose angereichert werden. (B) Phosphopeptid-"Pull-down": Interagiert das Phosphopeptid (gelb) spezifisch über sein STAT5-spezifisches Phosphotyrosin (rot) mit einer GST-SH2-Domäne, so kann der Komplex über den Biotinanteil des Phosphopeptides (grün) präzipitiert werden. Die präzipitierten Proteinkomplexe können auf ein SDS-Gel geladen und mit Coomassie-Blau angefärbt werden. (C) Kontrollpeptid: Im Kontrollpeptid liegt das Phosphotyrosin im Unterschied zum Phosphopeptid nicht phosphoryliert vor. Somit kann keine spezifische Interaktion mit der GST-SH2-Domäne stattfinden. SH2 = Src-Homologie-Domäne-2; G = GST = Glutathion S-Transferase; GA = Glutathion-Agarose-"Bead"; P = Phosphotyrosin; YxxP = STAT5-Sequenz-Motiv des Peptids; biotin = Biotin-"Tag", SA = Streptavidin-"Bead".

Die "Pull-down"-Experimente wurden mit den SH2-Domänen aus Fer, Abl, Crk, CrkL (Crk-"like"), Fyn, Src und Grb2 durchgeführt. Im Folgenden sind die SDS-Gele abgebildet, auf denen die Proben nach den „Pull-down“-Versuchen aufgetrennt und anschließend mit Coomassie-Blau angefärbt wurden. Als Ladekontrolle wurden die SH2-GST-Fusionsproteine mit Glutathion-Agarose angereichert und jeweils in der ersten Spur aufgetragen. Die Proben, in denen das unphosphorylierte Kontrollpeptid für das „Pull-down“-Experiment verwendet wurden, sind jeweils in der zweiten Spur zu sehen, während der "Pull-down" der verschiedenen GST-SH2-Fusionsproteine mit dem Phosphopeptid in der jeweils dritten Spur aufgetragen wurde.

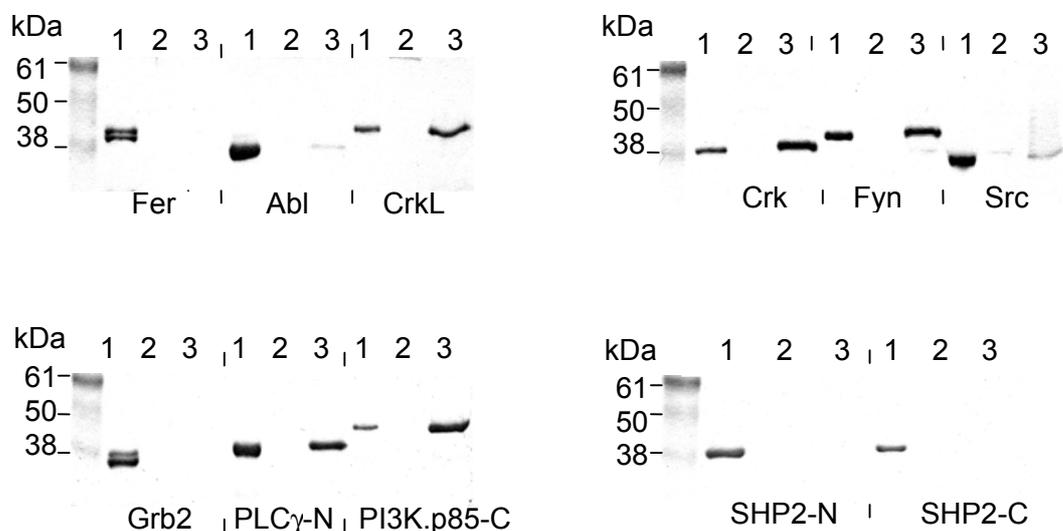


Abb. 3.2. Phosphopeptid-"Pull-down" mit verschiedenen GST-SH2-Fusionsproteinen. In „Pull-down“-Experimenten wurde untersucht, ob das beschriebene Phosphopeptid spezifisch mit SH2-Domänen aus weiteren Signalproteinen interagiert. Hierfür wurden die SH2-Domänen als GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert. Die isolierten GST-Fusionsproteine wurden 20 min mit dem Phospho- bzw. dem Kontrollpeptid [20 μ M] inkubiert und nach Immobilisierung mit Streptavidin auf einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt. Die präzipitierten Proteine wurden anschließend mit Coomassie-Blau gefärbt. Als Ladekontrolle wurden die verschiedenen GST-Fusionsproteine mit Glutathion-Agarose präzipitiert. In den Spuren von 1-3 sind jeweils folgende Proben aufgetragen: 1 = Ladekontrolle; 2 = "Pull-down" mit dem Kontrollpeptid; 3 = "Pull-down" mit dem Phosphopeptid.

Die Untersuchungen zeigten, daß das Phosphopeptid *in vitro* mit zahlreichen SH2-Domänen unterschiedlicher Signaltransduktoren interagieren konnte. Eine starke Interaktion fand mit den SH2-Domänen aus CrkL, Crk, Fyn, PI3K und PLC γ statt. Mit den SH2-Domänen aus Abl und Src ging das Peptid eine schwächere Bindung ein. Hierbei war ein Teil der Bindung zwischen dem Phosphopeptid und der SH2-Domäne aus Src

unspezifisch, da diese auch mit dem Kontrollpeptid präzipitiert wurde. Die Ergebnisse aus den "Pull-down"-Experimenten sind in Tab. 3.1 zusammengefaßt.

SH2-Domäne	Funktion des Proteins	kDa	Bindung
Fer	Tyrosinkinase	94	-
Abl	Tyrosinkinase, Proto-Oncogen	145	+
CrkL	Adapterprotein, Hauptsubstrat von BCR/ABL	36	+++
Crk	Adapterprotein	40	+++
Fyn	Tyrosinkinase, T-Zell-Rezeptor spezifisch	59	+++
Src	Tyrosinkinase, Proto-Oncogen	60	+
Grb2	Adapterprotein, Ras-Signalweg	25	-
PLC γ -N	Phospholipase C γ	148	+++
PI3K.p85-C	Kinase, phosphoryliert Inositol an 3' OH Gruppe	85	+++
SHP2-N	Phosphatase, spezifisch für hämatopoetische Zellen	60	-
SHP2-C			-

Tab. 3.1. Zusammenfassung der "Pull-down"-Experimente, die mit SH2-Domänen aus verschiedenen Signalproteinen durchgeführt wurden. In „Pull-down“-Experimenten wurde die Interaktion des Phosphopeptids mit verschiedenen als GST-Fusionsproteine exprimierten SH2-Domänen untersucht. Interagierte das Phosphopeptid mit einer GST-SH2-Domäne, konnte diese über den Biotinanteil des Peptides präzipitiert werden. Die präzipitierten Proteine wurden im SDS-Gel mit Coomassie-Blau gefärbt. Die angegebenen Proteingrößen beziehen sich jeweils auf die ganzen Signalproteine und nicht auf die isolierten SH2-Domänen. -:keine Bindung; +:schwache Bindung; +++: starke Bindung an das Phosphopeptid; N: N-terminale SH2-Domäne; C: C-terminale SH2-Domäne

3.1.2. Phosphopeptid-"Pull-down"-Experimente mit Lysaten aus Kasumi-1- und JK1-Zellen

Die Interaktion des Phosphopeptides konnte mit den als GST-Fusionsproteine exprimierten SH2-Domänen aus Abl, CrkL, PI3K und PLC γ gezeigt werden. Um zu zeigen, daß das Phosphopeptid auch mit den entsprechenden "vollständigen" Signalproteinen interagiert wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Da das Phosphopeptid aus STAT5 abgeleitet ist und dessen Dimerisierung inhibieren soll, wurde der Versuch auch für dieses Signalprotein durchgeführt. Durch den Einsatz des Phosphopeptids konnte das Koloniewachstum der Kasumi-1-Zellen im Agar spezifisch gehemmt werden, weshalb Lysate der Zellen für die "Pull-down"-Untersuchungen verwendet wurden. Die Kasumi-1-Zellen tragen die Translokation t(8;21) und exprimieren das AML1/ETO-Fusionsprotein. Um zu zeigen, daß das Phosphopeptid spezifisch mit einem Signalprotein der AML1/ETO-

exprimierender Zellen interagiert, wurden als Negativkontrolle Lysate von JK-1-Zellen verwendet. Die JK-1-Zellen stammen von einem Patienten mit einer CML und exprimieren das Bcr/Abl-Fusionsprotein. In dem Fusionsprotein ist die Kinaseaktivität der Abl-Kinase stark erhöht, was sich auch in der starken Phosphorylierung der Signalproteine widerspiegelt [Li et al., 2001; Carlesso et al., 1996; Sattler et al., 1996; Gotoh et al., 1994]. Durch die starke negative Ladung wird die Faltung der Proteine verändert, welche die Interaktion mit dem Phosphopeptid beeinflussen kann. Die starke Phosphorylierung in BCR/ABL-transformierten hämatopoetischen Zellen ist für STAT5 [Spiekermann et al., 2002], PLC γ , PI3.K [Gotoh et al., 1994], Grb2 [Li et al., 2001] und CrkL [ten Hoeve et al., 1994] beschrieben.

Für ein "Pull-down"-Experiment wurden die Zellysate der Kasumi-1 und JK-1-Zellen mit dem Phosphopeptid inkubiert. Die vorhandenen Komplexe wurden anschließend mit Streptavidin über das biotinylierte Peptid immobilisiert und auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Trägermembran wurden die mit dem Phosphopeptid präzipitierten Signalproteine mit Hilfe der entsprechenden Antikörper im Immunoblot identifiziert. In Abb. 3.3 sind die Western-Blot-Analysen der "Pull-down"-Versuche mit den Lysaten aus Kasumi-1- und der JK-1-Zellen abgebildet. In der ersten Spur wurde jeweils ein Teil der Zellysate als Ladekontrolle aufgetragen. Die "Pull-down"-Experimente, die mit dem Kontrollpeptid durchgeführt wurden, sind jeweils in der zweiten Spur zu sehen. In der dritten Spur sind die Proben aufgetragen, in denen die Lysate der Kasumi-1- und der JK-1-Zellen mit dem Phosphopeptid inkubiert wurden.

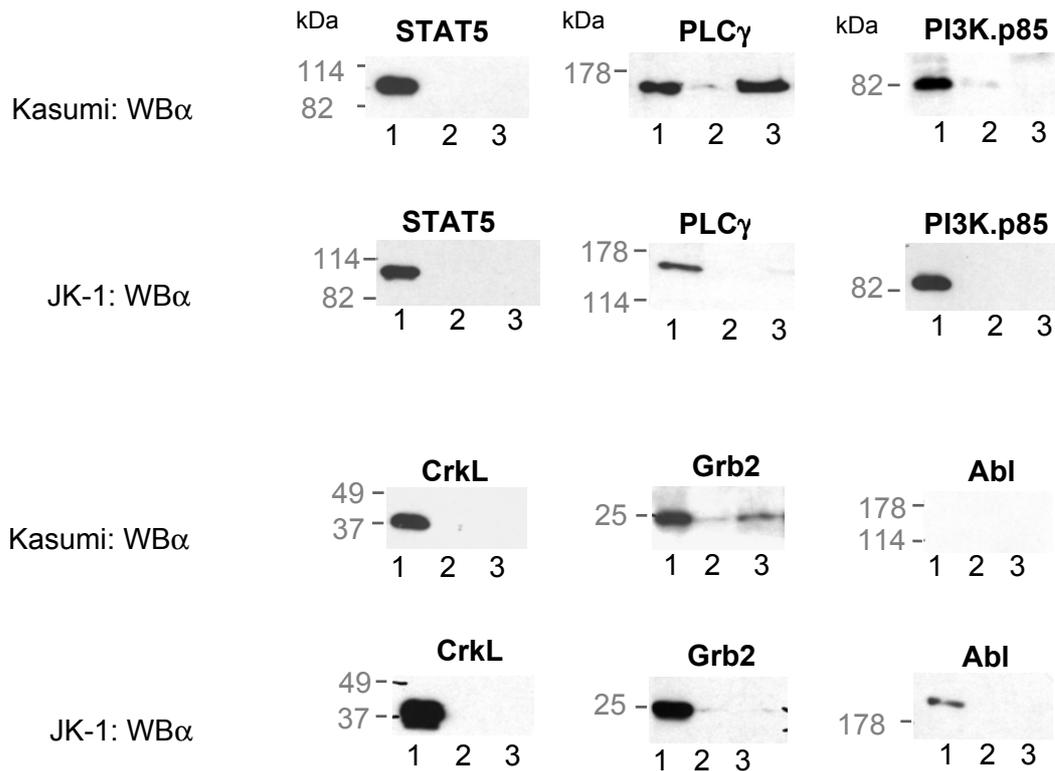


Abb. 3.3. Phosphopeptid-"Pull-down" mit Zellysaten aus Kasumi-1- und JK-1-Zellen und anschließendem Immunoblotting. In Western-Blot-Analysen wurde untersucht, mit welchen Signalproteinen das Phosphopeptid interagiert. Getestet wurden die Proteine, die zuvor in den „Pull-down“-Experimenten mit den isolierten SH2-Domänen mit dem Phosphopeptid präzipitiert werden konnten (CrkL, PI3.K, PLC γ und Abl). Außerdem wurde die Interaktion mit STAT5 (Phosphopeptid ist aus STAT5 abgeleitet) und Grb2 untersucht. Die Versuche wurden mit Zellysaten von Kasumi-1- und JK-1-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden die Kasumi-1- bzw. JK-1-Zellysate jeweils 20 min mit dem Phospho- oder dem Kontrollpeptid [20 μ M] inkubiert. Anschließend wurden vorhandene Proteinkomplexe mit Streptavidin immobilisiert. Die Proben wurden auf einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Trägermembran transferiert. Der Immunoblot wurde mit Antikörpern gegen STAT5, PLC γ , PI3.K, CrkL, Grb2 und Abl durchgeführt. In den Spuren 1-3 wurden jeweils folgende Proben aufgetragen: 1 = Ladekontrolle (Zellysat von Kasumi-1 oder JK-1); 2 = "Pull-down" mit dem Kontrollpeptid; 3 = "Pull-down" mit dem Phosphopeptid.

Die Western-Blot-Analysen zeigten, daß das STAT5-Protein mit dem Phosphopeptid weder aus dem Lysat der Kasumi noch dem der JK-1-Zellen präzipitiert wurde. Allerdings war eine sehr starke Interaktion des Peptides mit PLC γ der Kasumi-1-Zellen nachzuweisen. Diese Bindung war dagegen im JK-1-Zellysat nur sehr schwach. Die Interaktion der SH2-Domäne der Proteine CrkL und PI3K.p85 mit dem Phosphopeptid konnte weder mit den Lysaten der Kasumi-1- noch der JK-1-Zellen bestätigt werden. Die Interaktion des Phosphopeptides mit dem Adapterprotein Grb2 der Kasumi-1-Zellen ist sehr unspezifisch, da ein Anteil des Proteins auch mit dem Kontrollpeptid präzipitiert wurde.

3.1.3. Untersuchung der Expressionshöhe von PLC γ in AML1/ETO-transformierten Zelllinien

Die Immunoblot-Analysen haben gezeigt, daß PLC γ in den Kasumi-1-Zellen ein spezifischer Bindungspartner des Phosphopeptides ist. Da PLC γ eine zentrale Rolle in der Signalkaskade vieler extrazellulärer Stimuli spielt, ist dieses ein interessantes Zielprotein. Der Aktivierung der PLC γ über Proteinkinasen folgt die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu 1,4,5-trisphosphat (IP $_3$) und Diacylglycerol (DAG). Hierbei führt IP $_3$ zum Anstieg des intrazellulären Ca $^{2+}$ -Spiegels und DAG zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC). Somit stellt PLC γ mit der Produktion dieser „second messenger“ eines der frühesten Signale in der Signalkaskade der Zelle dar.

Die Überexpression von PLC γ führt zur Transformation von Maus-Fibroblasten [Smith et al., 1998; Whitehead et al., 1995]. Auch Studien, in denen eine erhöhte PLC γ Expression in Brust- und Kolonkarzinomen gefunden wurden, spiegeln die onkogenen Eigenschaften der Phospholipase C γ wieder [Lee et al., 1995; Arteaga et al., 1991]. Da sowohl die konstitutive Aktivierung als auch die Überexpression von PLC γ in Zellen transformierende Eigenschaften haben [Smith et al., 1998; DeMali et al., 1997; Whitehead et al., 1995], wurden Expressionsstärke und Phosphorylierungsgrad des PLC γ -Proteins in AML1/ETO-exprimierenden Zelllinien untersucht. In Immunoblot-Analysen wurden Lysate von AML1/ETO-transformierten Zelllinien und der entsprechenden Kontrollzellen bezüglich der Expressionshöhe von PLC γ miteinander verglichen (Abb. 3.4)

Verwendet wurden die Zellklone TF1-AML1/ETO und NIH3T3-AML1/ETO, die stabil mit einem retroviralen AML1/ETO-Konstrukt transduziert sind, das zusätzlich für ein Neomycin-Resistenzgen kodiert. Die Expression von AML1/ETO führt in der humanen Erythroleukämie-Zelllinie TF1, zu einem für das Fusionsprotein charakteristischen Differenzierungsblock nach Stimulation mit EPO. Die AML1/ETO-exprimierenden Mausfibroblasten-Zelllinie NIH3T3, bilden aufgrund der transformierenden Eigenschaften von AML1/ETO Kolonien im Agar (Daten nicht abgebildet) [Frank et al., 1999]. In dem stabilen U937-AML1/ETO-Zellklon kann die AML1/ETO-Expression über einen Zink-abhängigen Promotor durch Zinkzugabe (Zn $^{2+}$) induziert werden. Die Expression von AML1/ETO bewirkt in den humanen Leukämiezellen U937 ebenfalls einen Differenzierungsblock nach Induktion mit Vitamin D3 und TGF β [Puccetti et al., 2002; Gelmetti et al., 1998].

Für die Immunoblot-Analyse wurden je Zelllinie 8 μ g Protein (Bradford-Assay; Abb. 2.1) auf einem SDS-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine inerte Membran transferiert. Der Immunoblot wurde mit einem α -PLC γ -Antikörper durchgeführt. Das Ergebnis des

Western-Blots ist in Abb. 3.4 zu sehen. Es wurde keine deutlich erhöhte PLC γ -Expression in AML1/ETO-transformierten Zelllinien gefunden.

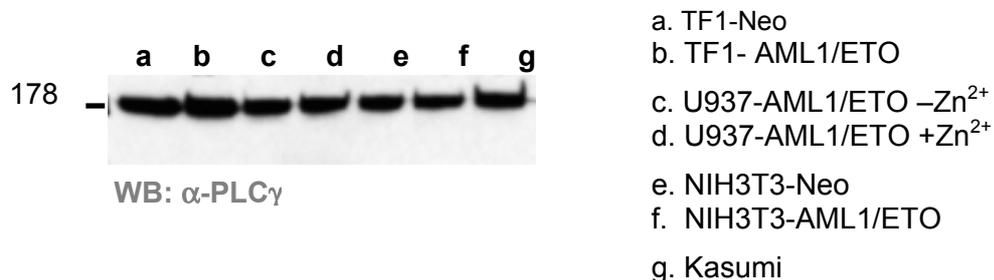


Abb. 3.4. Untersuchung der Expressionsstärke von PLC γ in AML1/ETO-transformierten Zellen. In einer Western-Blot-Analyse wurde die Expressionstärke von PLC γ verschiedener AML1/ETO-exprimierender Zelllinien untersucht. Die Zellklone TF1-AML1/ETO und NIH3T3-AML1/ETO sind stabil mit einem retroviralen AML1/ETO-Konstrukt transduziert, welches gleichzeitig für ein Neomycin-Resistenzgen kodiert. Die Zellklone TF1-Neo und NIH3T3 exprimieren nur das Neomycin-Resistenzgen. In den U937-AML1/ETO kann die Expression von AML1/ETO über einen Zink-abhängigen Promotor nach Zinkzugabe (+Zn²⁺) induziert werden. Die Zelllinie Kasumi-1 trägt die Translokation (8;21) und verfügt über eine endogene AML1/ETO-Expression. Für die Western-Blot-Analyse wurden je 8 μ g Protein auf einem SDS-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine inerte Membran transferiert. Der Immunoblot wurde mit einem α -PLC γ Antikörper durchgeführt.

3.1.4. Untersuchung des Phosphorylierungsstatus von PLC γ in Kasumi-1-Zellen

Neben der Expressionshöhe wurde der Phosphorylierungsstatus von PLC γ in AML1/ETO-exprimierenden Kasumi-1-Zellen untersucht. Die Lipase bindet über ihre SH2-Domäne an phosphorylierte Rezeptor-Tyrosinkinasen und wird über die Phosphorylierung der Tyrosinreste Y771 und Y783 durch die Kinase aktiviert [Carpenter et al., 1999]. Da PLC γ in der Signalkaskade BCR/ABL-positiver Zellen stark aktiviert ist [Gotoh et al., 1994], wurde das Phosphorylierungsmuster der Kasumi-1-Zellen mit dem der JK-1-Zellen verglichen, welche das BCR/ABL-Fusionprotein exprimieren. Hierfür wurden die Lysate auf einem SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Der Immunoblot wurde zuerst mit einem α -Phosphotyrosin-Antikörper durchgeführt. Nach der Entfernung des Antikörpers wurde dieselbe Membran mit einem α -PLC γ -Antikörper hybridisiert (Abb. 3.5). In den Lysaten der Kasumi-1-Zellen war keine konstitutive Phosphorylierung von PLC γ zu sehen (Abb. 3.5A). Im Vergleich dazu war in dem Lysat der JK-1-Zellen die Phosphorylierung verschiedener Proteine nachzuweisen (Abb. A). Mit Hilfe des α -PLC γ -Antikörpers wurde die Expression der PLC γ sowohl in den Kasumi-1- als auch in den JK-1 Zellen

nachgewiesen (Abb. 3.5B). Hierfür wurde dieselbe Membran nochmals mit dem α -PLC γ -Antikörper hybridisiert.

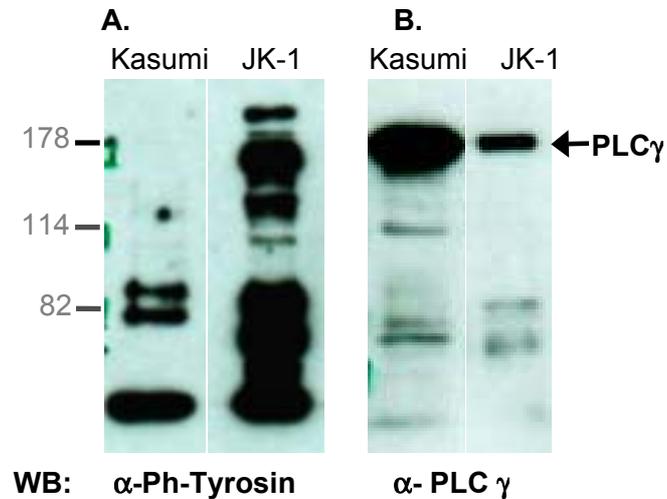


Abb. 3.5. Western-Blot-Analyse zur Untersuchung des Phosphorylierungsgrades von PLC γ in Kasumi-1-Zellen. Die Zellysate von Kasumi-1- und JK-1-Zellen wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und auf eine inerte Membran übertragen. In (A) ist der Immunoblot gegen das Phosphotyrosin zu sehen, wobei als Positivkontrolle das Lysat von JK-1 Zellen verwendet wurde. Der-selbe Blot wurde nach der Entfernung des α -Phosphotyrosin-Antikörpers mit einem α -PLC γ -Antikörper hybridisiert (B).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß PLC γ in den „Pull-down“-Experimenten als Zielprotein des Phosphopeptides identifiziert werden konnte. Die Interaktion mit PI3.K, Fyn und CrkL konnte lediglich mit den entsprechenden SH2-Domänen, die als GST-Fusionsproteine exprimiert wurden, gezeigt werden. Diese Signalproteine konnten jedoch nicht mit dem Phosphopeptid aus den Lysaten der Kasumi-1- und JK-1-Zellen präzipitiert werden. Außerdem wurde auch das STAT5-Protein aus Kasumi-1- und JK-1-Zellen nicht mit dem Phosphopeptid präzipitiert.

Da das identifizierte Zielprotein PLC γ in Kasumi-1-Zellen trotz der AML1/ETO-Expression weder überexprimiert noch konstitutiv phosphoryliert wird, ist es unwahrscheinlich, daß die Inhibition der Koloniebildung der AML1/ETO-transformierten TF-1-Zellen durch das untersuchte Phosphopeptid über den PLC γ -Signalweg vermittelt wird.

Ziel ist es, weitere Peptide zu finden, die in der Lage sind, die transformierenden Eigenschaften in AML1/ETO-exprimierenden Zellen zu blockieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen neue Selektionssysteme entwickelt werden, welche die Isolation ETO-inhibierender Peptide aus Peptid-Bibliotheken ermöglichen. In Kap. 3.2 werden die Etablierung und Charakterisierung zweier solcher *In-vitro*-Selektionssysteme beschrieben,

die für die gezielte Identifizierung von Wirkstoffen, welche die ETO-vermittelte transkriptionelle Repression aufheben, verwendet werden können.

3.2. Etablierung verschiedener *In-vitro*-Selektionssysteme zur Identifizierung ETO-inhibierender Peptide

3.2.1. Etablierung eines transienten Selektionssystems mit einer über Gal4-ETO regulierbaren Virusproduktion

3.2.1.1. Das transiente Selektionssystem

Durch den Einsatz des transienten Selektionssystems sollen ETO-inhibierende Peptide aus einer retroviralen Peptid-Bibliothek identifiziert werden. Prinzipiell basiert das System auf der Produktion viraler Partikel in einer Verpackungszelllinie. Die dafür verwendete Zelllinie Phoenix-gp [Pear et al.; 1993] ist stabil mit den für die retrovirale Replikation benötigten Genen *gag* (Strukturproteine) und *pol* (Integrase, reverse Transkriptase, RNaseH und Protease) transfiziert. Damit die Phoenix-gp-Zellen virale Partikel produzieren, werden sie mit einem Plasmid, das für ein Hüllprotein kodiert, und einem retroviralen Konstrukt (bestehend aus einem Markergen, das von den LTRs ("Long Terminal Repeats") flankiert wird) transfiziert. Mit dem geernteten Virusüberstand werden anschließend die gewünschten Zielzellen transduziert, wobei die Transduktionseffizienz anhand des Markergens bestimmt werden kann.

Die Besonderheit des "Screening"-Systems besteht darin, daß die Expression des Hüllproteins (*env*) unter der Kontrolle des Gal4-ETO-Proteins steht. Hierfür wurde ein Gal4-abhängiges Reporterkonstrukt kloniert, welches für das VSV-G-Hüllprotein (Glykoprotein-G aus dem Vesikulären Stomatitisvirus) kodiert. Das Reporterkonstrukt enthält zwei Gal4-DNA-Bindungsstellen (2XUAS; „upstream activating signal“) vor dem Thymidinkinase-Promotor (TK-Promotor), der die Expression des VSV-G-Hüllproteins ermöglicht. Die Expression des Hüllproteins wird zusätzlich durch Sequenzen des CMV-„Enhancers“, die sich vor den Gal4-DNA-Bindungsstellen befinden, angetrieben (Abb. 3.6, 3.7).

Werden das Reporterkonstrukt und der retrovirale Vektor "PINCO" (enthält als Markergen GFP; Kap. 2.1.8) mit dem Gal4-ETO-Konstrukt in eine Verpackungszelllinie kotransfiziert, so bindet das Gal4-ETO-Protein über seine Gal4-DNA-Bindungsdomäne (Gal4-DBD) an die Gal4-DNA-Bindungsstellen im Promotorbereich des Reporterkonstrukts, rekrutiert transkriptionelle Korepressoren und führt zur

transkriptionellen Repression des Hüllproteins. Da das Hüllprotein für die Virusproduktion essentiell ist, können keine viralen Partikel im Überstand geerntet werden (Abb. 3.6A). Das Hüllprotein stellt somit den limitierenden Faktor bei der Verpackung der viralen Partikel dar.

Wird die ETO-vermittelte transkriptionelle Repression z.B. durch ein Peptid aus der retroviralen Peptid-Bibliothek aufgehoben, kommt es zur Expression des Hüllproteins, und die retroviralen Sequenzen werden in virale Partikel verpackt. Mit dem geernteten Virusüberstand werden anschließend Zellen transduziert, wobei die transduzierten Zellen anhand des Markerproteins (GFP) identifiziert werden können. Im nächsten Schritt werden die gesuchten Peptidsequenzen mit Hilfe der PCR-Methode über die flankierenden retroviralen Sequenzen aus dem Genom der GFP-positiven Zelle identifiziert.

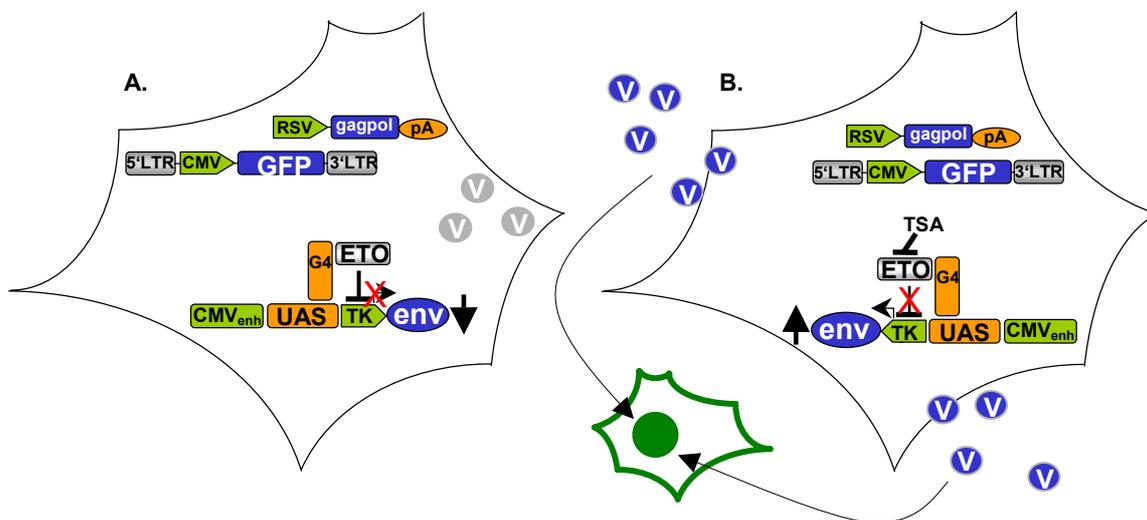


Abb.3.6. Eine über Gal-ETO regulierte Verpackung viraler Partikel. (A) Die Expression des VSV-G-Hüllproteins (*env*) steht unter der Kontrolle des Gal4-ETO-Proteins. Das Reporterkonstrukt enthält zwei Gal4-DNA-Bindungsstellen (2XUAS; „upstream activating signal“) vor dem Thymidinkinase-Promotor (TK-Promotor), der die Expression des VSV-G-Hüllproteins ermöglicht. Die Expression des Hüllproteins wird zusätzlich durch Sequenzen des CMV-„Enhancers“, die sich vor den Gal4-DNA-Bindungsstellen befinden, angetrieben. Werden das Reporterkonstrukt und das Gal4-ETO-Konstrukt mit dem retroviralen Vektor "PINCO" (enthält als Markergen GFP; Kap. 2.1.8) in eine Verpackungszelllinie kotransfiziert, so bindet das Gal4-ETO-Protein über seine Gal4-DNA-Bindungsdomäne (Gal4-DBD) an die Gal4-DNA-Bindungsstellen im Promotorbereich des Reporterkonstrukts und führt zur transkriptionellen Repression des Hüllproteins. Da das Hüllprotein für die Virusproduktion essentiell ist, können keine viralen Partikel im Überstand geerntet werden. **(B)** Zur Etablierung des Systems wurde der Histon-Deacetylase-Inhibitor TSA (Trichostatin A) verwendet, um die ETO-vermittelte Repression des Hüllproteins zu überwinden. TSA blockiert die Histon-Deacetylasen in dem von Gal4-ETO rekrutierten Korepressorkomplex, was zu einer transkriptionell aktiveren Chromatinstruktur führt. Die Expression des Hüllproteins hat zur Folge, daß die retroviralen Partikel mit dem für das Markergen GFP kodierenden Sequenz verpackt und in den Überstand abgegeben werden. Die mit dem gesammelten Virusüberstand transduzierten Zellen werden anhand des GFP-Markers identifiziert.

Um die ETO-inhibierenden-Viruspartikel so stark wie möglich anzureichern, müssen innerhalb einer Selektion mehrere Transduktionsrunden durchgeführt werden. Hierfür würden die Verpackungszellen, die mit dem Virusüberstand aus der ersten Transfektion der retroviralen Peptid-Bibliothek stabil transduzierten sind, erneut mit dem Reporterkonstrukt und dem Gal4-ETO-Plasmid transfiziert werden. Die tatsächlich positiven Peptide würden wiederum die transkriptionelle Repression von ETO aufheben und somit zur Expression des Hüllproteins und zur Verpackung viraler Partikel führen. Mit diesem Virusüberstand würden dann weitere Verpackungszellen entweder zur erneuten Selektion oder zur Identifizierung der viralen Peptidsequenzen transduziert werden.

Um die ETO-vermittelte transkriptionelle Repression des VSV-G-Gens aufzuheben, wurde bei der Etablierung des Selektionssystems unter anderem der Histon-Deacetylase-Inhibitor TSA (Trichostatin A) verwendet. Durch TSA werden die Histon-Deacetylasen in dem durch ETO rekrutierten Korepressorkomplex gehemmt [Yoshida et al., 1990], wodurch die Expression des Hüllproteins aktiviert wird (Abb. 3.6B). Mit dem geernteten Virusüberstand wurden Te671-Zellen transduziert, und der Anteil der GFP-positiven Zellen wurde in einer FACS-Messung bestimmt. Die Te671-Zelllinie wurde aufgrund ihrer leichten Transduzierbarkeit mit den VSV-G-pseudotypisierten Viruspartikeln verwendet.

3.3.1.2. Konstruktion des VSV-G-Reporterplasmids

Bei der Konstruktion des VSV-G-Reporterkonstrukts (Δ pMD.G) wurde zunächst der CMV-Promotor aus dem pMD.G-Vektor deletiert, so daß lediglich der "Enhancer"-Bereich im Vektor vorhanden blieb. Hierfür wurde der 250 bp große Promotorbereich mit den Restriktionsenzymen SnaBI und BamHI aus dem Plasmid pMD.G entfernt. In den geöffneten pMD.G-Vektor wurde anschließend ein Fragment aus zwei Gal4-DNA-Bindestellen und einem TK-Promotor ligiert. Dieses 300 bp große Fragment wurde hierfür aus dem Plasmid pGLK-2xUAS-TK isoliert. Im ersten Schritt wurden der Vektor über KpnI geöffnet und die überhängenden Enden mit Hilfe des Klenow-Fragments (große Untereinheit der DNA-Polymerase) aufgefüllt. Im zweiten Schritt wurde das Fragment mit BglIII aus dem Vektor isoliert und in das SnaBI/ BamHI-geschnittene Plasmid ligiert.

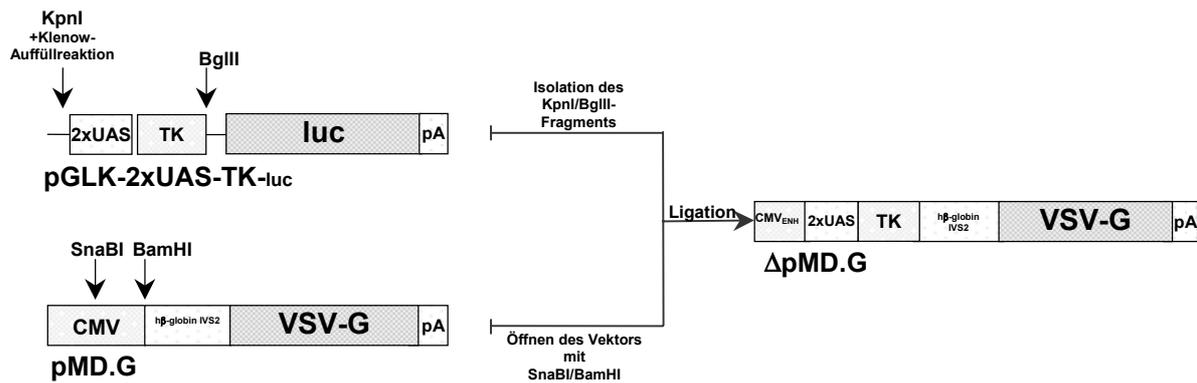


Abb. 3.7. Konstruktion des VSV-G-Reporterplasmids Δ pMD.G. Erläuterungen im Text. CMV-ENH = Enhancer-Sequenzen des CMV-Promotors (Cytomegalievirus); 2xUAS = zwei Gal4-DNA-Bindungsstellen; TK = Thymidin-Kinase-Promotor; h β -globin-IVS2 = humanes β -Globin-Intron; VSV-G = Glykoprotein G des Vesikulären Stomatitisvirus; pA = poly A-Signal; luc = Luziferasegen.

3.2.1.3. Kotransfektion des VSV-Reporterkonstrukts mit unterschiedlichen Mengen des Repressors Gal4-ETO

Zur Etablierung des transienten Selektionssystems mit einer über Gal4-ETO regulierbaren VSV-G Expression wurde das Reporterplasmid Δ pMD.G zusammen mit unterschiedlichen Mengen des Repressorplasmids Gal4-ETO in die Phoenix-gp-Zellen kotransfiziert. Mit dem 48 h später gesammelten Virusüberstand wurden Te671-Zellen transduziert, wobei die Transduktionsrate über die GFP-Expression in einer FACS-Messung bestimmt wurde. Anhand der Transduktionsrate konnte gleichzeitig die Anzahl der infektiösen Partikel im Überstand berechnet werden (Kap. 2.3.5.5). Die Transfektions- und Transduktionbedingungen für das Reporterkonstrukt und den retroviralen Vektor PINCO waren zuvor optimiert worden.

In den Experimenten wurde untersucht, in welchem Verhältnis der transkriptionelle Repressor Gal4-ETO kotransfiziert werden mußte, um die Produktion der Viruspartikel über die transkriptionelle Repression des VSV-G-Hüllproteins zu unterdrücken. Die verminderte Anzahl an infektiösen Partikeln spiegelt sich in einer verminderten Transduktionsrate wider.

Der retrovirale Vektor PINCO und das VSV-G-Reporterplasmid wurden hierfür zusammen mit 250 ng, 125 ng, 50 ng und 5 ng des Gal4-ETO-Plasmids in Phoenix-gp-Zellen kotransfiziert (Kap. 2.3.5.4). In einem weiteren Ansatz wurde als Kontrolle dazu lediglich die Gal4-DNA-Bindende-Domäne (Gal4-DBD) für die Kotransfektion der Phoenix-gp-Zellen verwendet. Die Gal4-DBD kann zwar an die Gal4-Bindungsstellen im

Reporterplasmid binden, hat aber im Vergleich zum transkriptionellen Repressor Gal4-ETO keinen Einfluß auf die Expression des Hüllproteins.

Sowohl der Anteil der transfizierten als auch der transduzierten Zellen wurde anhand der GFP-Expression in einer FACS-Messung bestimmt und als Balkendiagramm abgebildet. Die Ergebnisse aller durchgeführten Experimente sind in Abb. 3.8 zusammengefaßt.

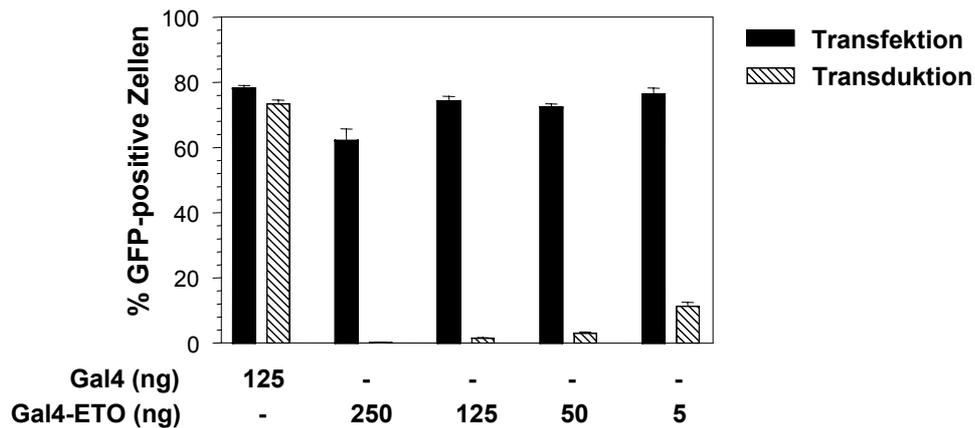


Abb. 3.8. Kotransfektion des VSV-Reporterkonstrukts mit unterschiedlichen Mengen des Repressors Gal4-ETO. Das VSV-G-Reporterkonstrukt wurde zusammen mit jeweils 250 ng, 125 ng, 50 ng und 5 ng Gal4-ETO-Plasmid und dem retroviralen Vektor PINCO in Phoenix-gp-Zellen transfiziert. Das VSV-G-Reporterkonstrukt und das PINCO-Plasmid lagen in allen Ansätzen in gleichen Anteilen vor. In einem weiteren Ansatz wurde als Kontrolle lediglich die Gal4-DBD kotransfiziert. Mit den 48 h später geernteten Virusüberständen wurden Te671-Zellen transduziert. Die Transfektionseffizienz (schwarze Balken) und die Transduktionseffizienz (schraffierte Balken) der entsprechenden Ansätze wurden anhand des Anteils der GFP-positiven Zellen in einer FACS-Messung definiert und sind als Balken dargestellt. In der Abbildung sind die Ergebnisse unabhängig durchgeführter Experimente zusammengefaßt. Gal4 = Gal4-DBD (n=16); 250 ng Gal4-ETO (n=4); 125 ng (n=12); 50 ng (n=12); und 5 ng (n=6). Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angeben.

Die Kotransfektion steigender Mengen des Gal4-ETO-Plasmides führte zu einer deutlichen verminderten Anzahl an produzierten viralen Partikeln, die anhand der gemessenen Transduktionseffizienz berechnet wurden. Das Ausmaß der Abnahme der Transduktionseffizienz stand im direkten Zusammenhang mit der kotransfizierten Menge des Gal4-ETO Konstrukts. Die stärkste Repression war nach Zugabe von 250 ng Gal4-ETO zu sehen. Hier betrug die Transduktionsrate der Te671 lediglich 0.2%. Nach Kotransfektion kleinerer Mengen an Gal4-ETO war der Anteil der transduzierten Zellen im Vergleich zur Gal4-DBD-Kontrolle immer noch stark herabgesetzt. Der Anteil an GFP-positiven Zellen lag nach der Transduktionen mit dem Virusüberstand nach Kotransfektion von 125 ng, 50 ng und 5 ng des Gal4-ETO Plasmids jeweils bei 1.5 %, 3.1% und 11.3%. Die entsprechende Anzahl der viralen Partikel je ml (TU/ml = "transducing units" /ml), die

noch nach Kotransfektion mit dem Gal4-ETO-Konstrukt erreicht wurde, ist in Tab. 3.2 zusammengefaßt.

In der Kontrolle wurde statt Gal4-ETO die Gal4-DNA-Bindende-Domäne (Gal4-DBD) mit dem VSV-Reporterkonstrukt kotransfiziert, wobei eine Transduktionseffizienz von 73% erreicht wurde. Somit lagen bei den Experimenten mit dem Gal4-ETO-Plasmid und dem Gal4-DBD-Plasmid vergleichbare Transfektionseffizienzen der Verpackungszelllinie vor. Dies bedeutet, daß die niedrigen Virustiter nicht auf eine verminderte Transfektionseffizienz zurückzuführen sind.

125 ng Gal4	78.2	3.3	73.5	4.3	-
ng Gal4-ETO	TF-Rate %	±SEM	TD-Rate %	±SEM	TU/ml
250	62.2	7.0	0.2	0.2	2x10 ³
125	74.3	5.0	1.5	0.9	1.5x10 ⁴
50	72.3	4.0	3.1	1.3	3.1x10 ⁴
5	76.4	4.8	11.3	3.3	1.13x10 ⁵

Tab. 3.2. Zusammenfassung der Ergebnisse nach Kotransfektion des VSV-Reporterkonstrukts mit unterschiedlichen Mengen des Repressors Gal4-ETO. Gal4-ETO wurde zusammen mit dem VSV-Reporterkonstrukt in Phoenix-gp-Zellen transfiziert. Die einzelnen Transfektionsraten (TF-Raten) sind prozentual angegeben. Die Transduktionsraten (TD-Rate), welche mit den entsprechenden Virusüberständen auf Te671-Zellen erreicht wurden, sind ebenfalls prozentual angegeben. Als Kontrolle wurde die Gal4-DBD kotransfiziert. Der Anteil GFP-positiver Zellen wurde jeweils 5 Tage nach der Transduktion in einer FACS-Messung bestimmt. Anhand der Transduktionsraten wurde die Anzahl der viralen Partikel je ml Virusüberstand (TU/ml) berechnet (Kap. 2.3.5.5). Für die Positivkontrolle Gal4 wurde kein Titer angegeben (-), da die Transduktionsrate nicht mehr im linearen Bereich lag.

Die Ergebnisse zeigen, daß schon sehr geringe Mengen des Gal4-ETO-Konstrukts ausreichen, um die Transduktionseffizienz deutlich zu inhibieren. In weiteren Experimenten mußte gezeigt werden, daß die niedrigen Transduktionsraten tatsächlich auf eine Gal4-ETO-vermittelte transkriptionelle Repression des VSV-G zurückzuführen sind. Außerdem wurde getestet, ob sich die ETO-vermittelte Repression des Hüllproteins wieder aufheben ließ. Hierfür wurde zum einen der HDAC-Inhibitor TSA verwendet, zum anderen wurden Wettbewerbsversuche mit der Gal4-DBD durchgeführt.

3.2.1.4. Die Koexpression von Gal4-ETO führt zur transkriptionellen Repression des Hüllproteins (VSV-G)

In einem Wettbewerbsversuch wurde untersucht, ob die stark herabgesetzten Transduktionseffizienzen nach Koexpression des Gal4-ETO-Proteins auf eine ETO-vermittelte transkriptionelle Repression des Hüllproteins zurückzuführen sind. Hierbei soll die ETO-vermittelte transkriptionelle Repression mit Hilfe der Gal4-DBD indirekt aufgehoben werden, die nach Überexpression um die Bindung des Gal4-ETO-Proteins an die UAS-Sequenz des Reporterkonstrukts konkurriert.

In dem Experiment wurde das Gal4-ETO- mit dem Gal4-DBD-Plasmid in den Verhältnissen 1:100, 1:10 und 1:4 kotransfiziert, wobei parallel das Gal4-ETO-Konstrukt ohne die Gal4-DBD in den entsprechenden Mengen eingesetzt wurde. Außerdem lagen die für die Virusproduktion erforderlichen Plasmide wie das VSV-G-Reporterkonstrukt und der retrovirale Vektor PINCO in den Ansätzen in gleichen Mengen vor. Um eine Aussage über die Transduktionseffizienzen in den Te671-Zellen machen zu können, müssen vergleichbare Transfektionseffizienzen der Verpackungszelllinie Phoenix-gp vorliegen. Diese sind für alle durchgeführten Ansätze in Abb. 3.8B zusammengefasst. Die durchschnittliche Transfektionsrate lag in diesem Experiment sowohl in den Ansätzen, in denen das Gal4-ETO-Plasmid allein kotransfiziert wurde (schwarze Balken), als auch in den Ansätzen, in denen die Gal4-DBD als Kompetitor eingesetzt wurde (schraffierte Balken), bei 85%.

In Abb. 3.8A ist der Anteil der GFP-positiven Zellen nach Transduktion in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Nach Kotransfektion von 5 ng, 50 ng und 125 ng des Gal4-ETO-Plasmids sank der Anteil GFP positiver Zellen nach Transduktion der Te671-Zellen mit dem geernteten Virusüberstand auf 6.7 %, 1.1 % bzw. 0.35 % ab. Wurde aber das Gal4-Konstrukt zusammen mit dem Gal4-ETO-Plasmid transfiziert, so konnte der Anteil der transduzierten Zellen bei einem Verhältnis von Gal4-ETO zu Gal4 von 1:100 von 6.65 % auf 49.1 % gesteigert werden. Dieser Anstieg lag bei einem 1:10-Verhältnis der genannten Plasmide bei 14.9 % (von 1.1 % auf 16 %) und bei einem 1:4-Verhältnis der Plasmide bei 7 % (von 0.35 % auf 7.4 %). Als Positivkontrolle wurde die Transduktionseffizienz der Ansätze herangezogen, bei denen zur Virusproduktion lediglich die Gal4-DBD verwendet wurde. Mit dem entsprechenden Virusüberstand wurden 77% der Te671-Zellen transduziert.

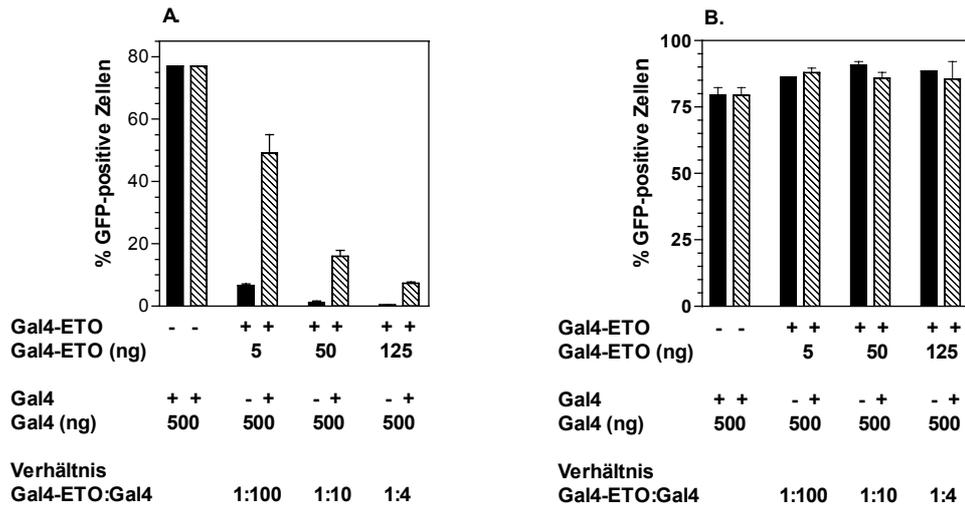


Abb. 3.9. Durch die Überexpression der Gal4-DBD wurde die ETO-vermittelte Repression des VSV-G-Hüllproteins in den Phoenix-gp-Zellen spezifisch aufgehoben. In (A) sind die Transduktionseffizienzen angegeben, welche mit dem Virusüberstand auf Te671-Zellen nach Transfektion der Verpackungszelllinie mit 5 ng, 50 ng und 125 ng des Gal4-ETO-Plasmids (schwarze Balken) erzielt wurden. Die schraffierten Balken repräsentieren die Transduktionseffizienzen, in denen die Gal4-DBD als Kompetitor eingesetzt wurde, um die ETO-vermittelte Repression des Hüllproteins aufzuheben. Die Phoenix-gp-Zellen wurden hierfür mit 5 ng, 50 ng und 125 ng Gal4-ETO-Plasmid zusammen mit 500 ng des Gal4-Konstrukts (schraffierte Balken) transfiziert. Dies entspricht einem Gal4-ETO:Gal4-Verhältnis von 1:100, 1:10 und 1:4. Mit den 48 h nach der Transfektion geernteten Virusüberständen wurden Te671-Zellen transduziert. Alle Ansätze wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. In (B) sind die entsprechenden Transfektionseffizienzen der Phoenix-gp-Zellen abgebildet. Alle Ansätze wurden jeweils in Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM abgebildet

Anhand der im FACS bestimmten Transduktionseffizienzen in den Te671-Zellen wurden zusätzlich die Virustiter berechnet. Die Anzahlen viraler Partikel je ml (TU/ml = "transducing units"/ml), die nach Kotransfektion mit dem Gal4-ETO-Konstrukt und nach der Kooperation mit der Gal4-DBD erreicht wurden, sind in Tab. 3.3 zusammengefasst.

Gal4	125		79.4	3.0	77.0	0	-
ng Gal4-ETO	ng Gal4	Gal4-ETO:Gal4	TF-Rate %	SEM	TD-Rate %	SEM	TU/ml
5			86.2	0.1	6.7	0.4	6.7×10^4
5	+ 500	1:100	88.9	1.7	49.1	5.8	$> 4.9 \times 10^5$
50			90.7	1.4	1.1	0.5	1.1×10^4
50	+ 500	1:10	85.8	2.3	16.0	1.9	1.6×10^5
125			88.5	0.2	0.35	0	3.5×10^3
125	+ 500	1:4	85.6	6.6	7.4	0.4	7.4×10^4

Tab. 3.3. Zusammenfassung der Ergebnisse des Wettbewerbsversuchs. Das Gal4-ETO-Plasmid wurde allein und zusammen mit der Gal4-Domäne und dem VSV-Reporterkonstrukt in Phoenix-gp-Zellen transfiziert. Die einzelnen Transfektionsraten (TF-Raten) sind prozentual angegeben. Die Transduktionsraten (TD-Rate), welche mit den entsprechenden Virusüberständen auf Te671-Zellen erreicht wurden, sind ebenfalls prozentual angegeben. Als Kontrolle wurde die Gal4-DBD allein kotransfiziert. Der Anteil GFP-positiver Zellen wurde jeweils 5 Tage nach der Transduktion in einer FACS-Messung bestimmt. Anhand der Transduktionsraten wurde die Anzahl der viralen Partikel je ml Virusüberstand (TU/ml) berechnet (Kap. 2.3.5.5). Für die Positivkontrolle Gal4 wurde kein Titer angegeben (-), da die Transduktionsrate nicht mehr im linearen Bereich lag. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben.

In Abb. 3.10 sind exemplarisch Auswertungen der FACS-Messungen der transduzierten Zellen dargestellt. Hierbei wurden die gemessenen Ereignisse auf der X-Achse nach Fluoreszenz-Intensität (GFP) und auf der Y-Achse nach ihrer Granularität aufgetrennt. Der prozentuale Anteil der GFP-positiven Zellen wurde anhand nicht-transduzierter Te671-Zellen definiert. In Abb. 3.10A sind von links nach rechts die Messungen der nach Transfektion von 125 ng, 50 ng und 5 ng Gal4-ETO transduzierten Te671-Zellen abgebildet. In den FACS-Bildern ist anhand der mittleren Fluoreszenz-Intensität zu sehen, daß auch nach Transfektion von 125 ng Gal4-ETO GFP-positive und somit transduzierte Zellen detektiert wurden. Dies bedeutet, daß bei einer späteren Selektion einer Peptid-Bibliothek entsprechend der transfizierten Menge an Gal4-ETO mit einem Hintergrund von mindestens 3.5×10^3 viralen Partikeln je ml Virusüberstand (siehe Tab. 3.3) gerechnet werden muß. In Abb. 3.10B sind die FACS-Auswertungen der Zellen gezeigt, die mit Virusüberstand transduziert wurden, der nach Kotransfektion des Repressors Gal4-ETO (125 ng, 50 ng und 5 ng) und der als Kompetitor eingesetzten Gal4-DBD (500 ng) in der Verpackungszelllinie produziert wurde. Außerdem ist die Kontrolle, in der lediglich die Gal4-DBD zusammen mit dem Reporterkonstrukt und dem PINCO-Vektor zur Virusproduktion transfiziert wurde, abgebildet (Abb. 3.10C).

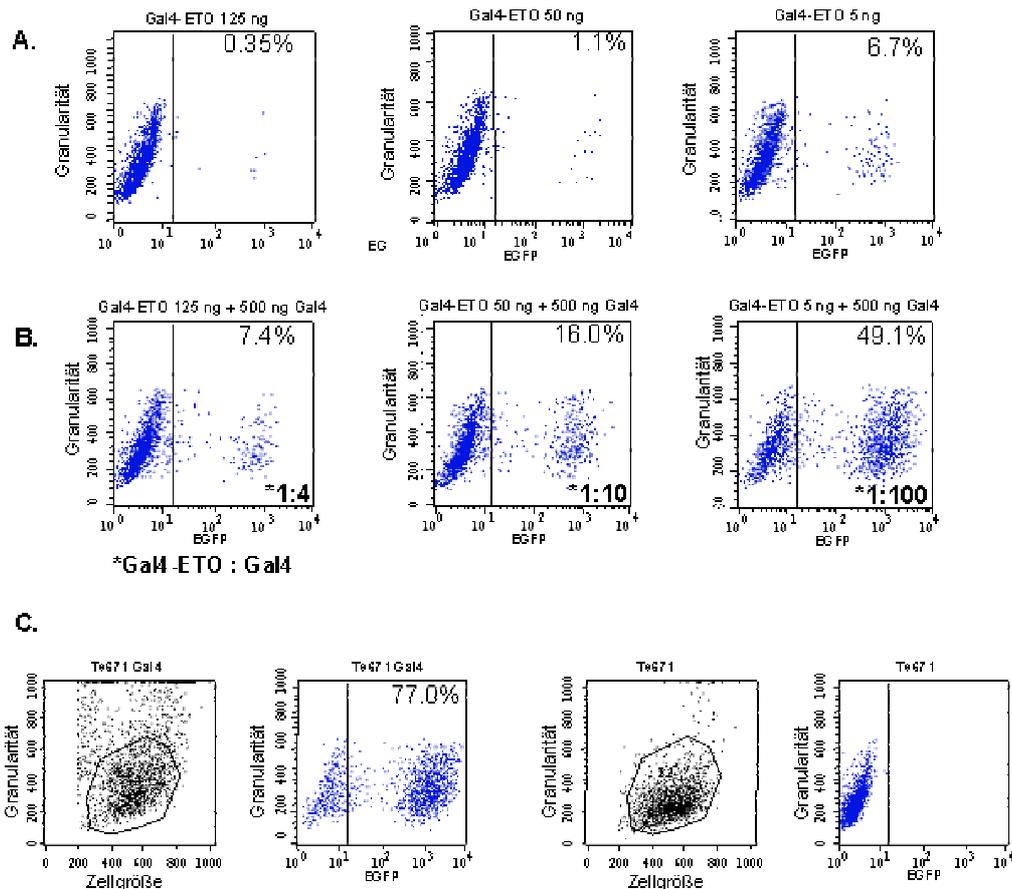


Abb. 3.10. FACS-Analyse der Te671-Zellen nach Transduktion mit Virusüberständen, die nach Transfektion mit einem über Gal4-ETO regulierten VSV-G-Reporterkonstrukt gewonnen wurden. Um die prozentualen Anteile der GFP-positiven Te671-Zellen zu bestimmen, wurden die gemessenen Ereignisse auf der X-Achse nach Fluoreszenz-Intensität (GFP) und auf der Y-Achse nach ihrer Granularität aufgetrennt. Die Anteile der GFP-positiven Zellen wurde über nicht-transduzierte Te671-Zellen definiert (**C. Te671**). In (**A**) sind von links nach rechts die Messungen der nach Transfektion von 125 ng, 50 ng und 5 ng Gal4-ETO transduzierten Te671-Zellen abgebildet. Die Koexpression des Repressors führt zu einem deutlich reduzierten Anteil an transduzierten Te671-Zellen. In (**B**) sind die FACS-Messungen gezeigt, in der die Gal4-DNA-bindende Domäne als Kompetitor von Gal4-ETO eingesetzt wurde. Die Gal4-DBD wurde im Überschuß in den Verhältnissen 1:4, 1:10 und 1:100 zum Repressor Gal4-ETO (125 ng, 50 ng und 5 ng Gal4-ETO) kotransfiziert. Die Konkurrenz des Repressors von den Gal4-DNA-Bindungsstellen im VSV-G-Reporterkonstrukt führt zu einem deutlichen Anstieg der GFP-positiven Te671-Zellen. In (**C**) sind die transduzierten Te671-Zellen nach Transfektion der Gal4-DBD alleine (Te671 Gal4) sowie untransduzierte Te671 abgebildet.

In der Western-Blot-Analyse der transfizierten Phoenix-gp-Zellen aus dem beschriebenen Kompletionsversuch konnte zusätzlich gezeigt werden, daß die Kotransfektion des Repressorplasmids Gal4-ETO mit dem VSV-G-Reporterkonstrukt zu einer stark erniedrigten VSV-G Expression führt. Die schwachen Signale der Proben von Phoenix-gp-Zellen, die mit 125 ng, 50 ng bzw. 5 ng Gal4-ETO-Plasmid transfiziert wurden, sind in Abb. 3.11 in der jeweils linken Spur zu sehen. Ein deutliches Signal wurde

hingegen für das VSV-G-Hüllprotein im Lysat der Phoenix-gp Zellen detektiert, welche für die Virusproduktion nur mit 500 ng des Gal4-Plasmids kotransfiziert wurden (Abb. 3.11; Gal4). Zum anderen ist in der Western-Blot-Analyse zu sehen, daß der erhöhte Anteil infektiöser Partikel nach der Überexpression der Gal4-DBD bei gleichzeitiger Anwesenheit des Gal4-ETO-Proteins auf eine vermehrte VSV-G-Expression zurückzuführen war. Die entsprechenden Proben sind nach Transfektion von 500 ng des Gal4-DBD-Plasmids zusammen mit 125 ng, 50 ng, 5 ng Gal4-ETO in der jeweils rechten Spur in der Abb. 3.11 (+) abgebildet. Die VSV-G-Expression korrelierte in den Phoenix-gp-Zellen mit den Transduktionsraten, die mit den produzierten Virusüberständen erzielt wurden. Der deutlichste Anstieg der VSV-G-Expression ist in dem Ansatz zu sehen, in dem die Gal4-DBD in einem 100fachen Überschuß eingesetzt wurde. Daß in allen Spuren die gleiche Proteinmenge eingesetzt wurde, zeigte die Hybridisierung des Blots mit einem α -PLC γ -Antikörper. Die Ergebnisse aus diesem Wettbewerbsversuch und der Western-Blot-Analyse zeigen, daß die Expression von Gal4-ETO in dem beschriebenen System spezifisch zur transkriptionellen Repression des Hüllproteins VSV-G führt. Die Expression des Hüllproteins stellt somit den limitierenden Faktor bei der Produktion der viralen Partikel dar.

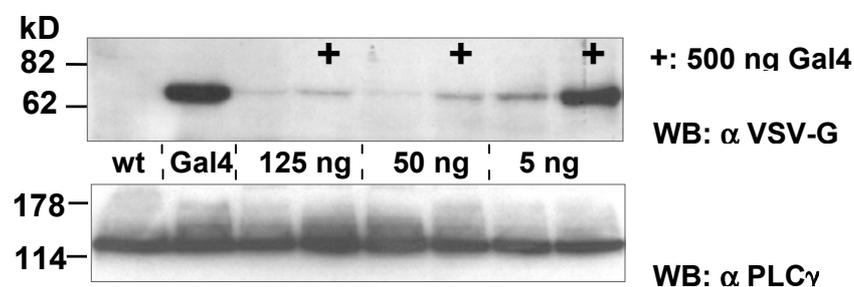


Abb. 3.11. Western-Blot-Analyse der transfizierten Phoenix-gp-Zellen des Wettbewerbsversuchs. In der Western-Blot-Analyse wird gezeigt, daß die Transfektion des Repressors Gal4-ETO (125 ng, 50 ng, 5 ng) zusammen mit dem Reporterkonstrukt zu einer stark verminderten VSV-G-Expression führt. Der Immunoblot wurde hierfür gegen das Hüllprotein VSV-G durchgeführt. Die ETO-vermittelte Repression kann bei gleichzeitiger Überexpression von Gal4 (125 ng+, 50 ng+, 5 ng+) partiell aufgehoben werden. Das stärkste Signal ist in dem Ansatz zu sehen, in dem Gal4 ohne den Repressor transfiziert wurde (Gal4). Um die aufgetragenen Proteinmengen vergleichen zu können, wurde dieselbe Western-Blot-Membran mit einem α -PLC γ -Antikörper hybridisiert. wt = untransfizierte Phoenix-gp; Gal4 = Transfektion der Gal4-DBD mit dem VSV-G-Reporterkonstrukt; 125 ng, 50 ng und 5 ng = entsprechende Menge des kotransfizierten Gal4-ETO Plasmids; die Ansätze, in denen 500 ng des Gal4-Konstrukts zusammen mit den entsprechenden Mengen des Gal4-ETO Plasmids transfiziert wurden, sind mit einem Plus-Zeichen (+) gekennzeichnet.

3.2.1.5. Die ETO-vermittelte transkriptionelle Repression kann durch Zugabe eines HDAC-Inhibitors aufgehoben werden

In einem weiteren Versuchsansatz sollte erneut gezeigt werden, daß die verminderten Virustiter auf eine ETO-vermittelte transkriptionelle Repression des Hüllproteins zurückzuführen sind. ETO reprimiert die Transkription durch Rekrutierung eines Korepressorkomplexes, der Histon-Deacetylasen enthält [Hildebrand et al., 2001]. Um diese zu hemmen wurde der Histon-Deacetylase (HDAC)-Inhibitor Trichostatin A (TSA) eingesetzt. Das TSA wurde mit dem Medienwechsel 8 h nach der Transfektion der Phoenix-gp-Verpackungszelllinie zugegeben. Sowohl die Transfektionsraten als auch die Transduktionsraten, die mit den entsprechenden Virusüberständen erzielt wurden, sind in Abb. 3.12 als Balkendiagramm dargestellt.

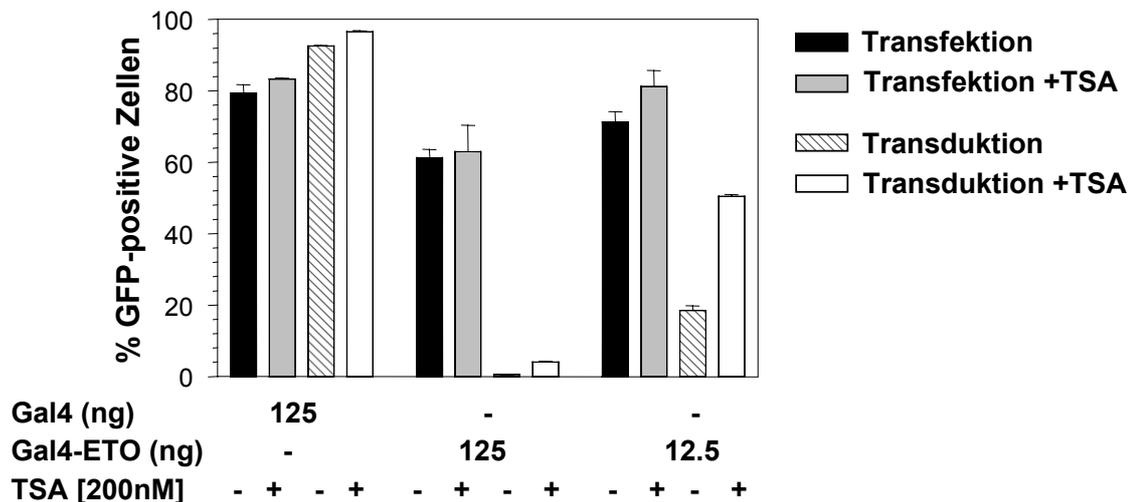


Abb. 3.12. Durch den HDAC-Inhibitor TSA kann die ETO-vermittelte transkriptionelle Repression des VSV-G-Hüllproteins partiell aufgehoben werden. Das VSV-G-Reporterkonstrukt wurde zusammen mit jeweils 125 ng und 12.5 ng Gal4-ETO-Plasmid und dem retroviralen Vektor PINCO in Phoenix-gp-Zellen transfiziert. Das VSV-G-Reporterkonstrukt und das PINCO-Plasmid lagen in allen Ansätzen in gleichen Anteilen vor. In einem weiteren Ansatz wurde als Kontrolle lediglich die Gal4-DBD kotransfiziert. Der Histon-Deacetylase-Inhibitor Trichostatin A (TSA) wurde eingesetzt, um die ETO-vermittelte transkriptionelle Repression des VSV-G-Hüllproteins aufzuheben. Durch den Inhibitor werden die Histon-Deacetylasen in dem von ETO rekrutierten Korepressorkomplex gehemmt. Das TSA [200 nM] wurde mit dem Medienwechsel 8 h nach Transfektion der Phoenix-gp zugegeben. Mit den 48 h später geernteten Virusüberständen wurden Te671 transduziert. Die Transfektions- und Transduktionseffizienzen (%), die ohne Zugabe von TSA und nach Zugabe des TSA erreicht wurden, sind als Balken dargestellt. Alle Ansätze wurden jeweils in Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM abgebildet.

Nach Kotransfektion von 12.5 ng des Gal4-ETO-Konstrukts wurde die Transduktionsrate durch die Zugabe des HDAC-Inhibitors TSA von 18.5% auf 50.5% gesteigert. Die transkriptionelle Repression, die durch die Kotransfektion von 125 ng des Gal4-ETO-Konstrukts vermittelt wurde, war ähnlich stark wie in den bereits in den Kapiteln 3.2.1.3 und 3.2.1.4 beschriebenen Versuchen. In diesem Fall konnte die Transduktionsrate bei einer vergleichbaren Transfektionsrate durch die Zugabe von TSA von 0.5% auf 4% gesteigert werden. Ohne das Repressorplasmid Gal4-ETO wurden Transduktionsraten von 93% (ohne TSA) bzw. 97% (mit TSA) erreicht. Durch TSA werden auch HDACs gehemmt, die nicht in dem von ETO rekrutierten Korepressorkomplex vorliegen. Dies führt zu einer leicht gesteigerten Expression aller für die Virusproduktion benötigten Gene, womit sich die leicht gesteigerte Transduktionsrate in den Ansätzen, in denen nur Gal4 transfiziert wurde, erklären läßt [Merezak et al., 2002; Tobias et al., 2000]. Daß durch TSA jedoch auch die ETO-vermittelte Repression des VSV-G spezifisch aufgehoben werden konnte, ist vor allem nach Kotransfektion von 12.5 ng Gal4-ETO zu sehen, da die Transduktionsrate durch TSA hier um das 2.7fache gesteigert wurde. Die anhand der FACS-Analyse berechneten Virustiter sind in Tab. 3.4 zusammengefaßt.

Gal4 125	79.4	2.4	92.7	0.1	-
Gal4 125 +TSA	83.3	0.26	96.6	0.3	-
ng Gal4-ETO	TF-Rate %	SEM	TD-Rate %	SEM	TU/ml
125	61.3	2.3	0.5	0.1	5x10 ³
125 +TSA	63.0	7.38	4.1	0.3	4.1x10 ⁴
12.5	71.3	3.0	18.5	1.2	1.8x10 ⁵
12.5 +TSA	81.2	4.4	50.5	0.5	>5.1x10 ⁵

Tab. 3.4. Zusammenfassung der Experimente, in denen der HDAC-Inhibitor TSA eingesetzt wurde, um die ETO-vermittelte transkriptionelle Repression des VSV-G-Hüllproteins aufzuheben. Das VSV-G-Reporterkonstrukt und der retrovirale Vektor PINCO lagen in allen Ansätzen in der gleichen Menge vor. Als Positivkontrolle wurde die Gal4-DBD transfiziert. Der Anteil GFP-positiver Zellen wurde 5 Tage nach der Transduktion in einer FACS-Messung bestimmt. Das TSA wurde in einer Konzentration von 200 nM 8 h nach der Transfektion zugegeben. Für die Positivkontrolle Gal4 wurde kein Titer angegeben (-), da die Transduktionsrate über 20% lag und somit nicht mehr im linearen Bereich ist. TF = Transfektionsrate; TD = Transduktionsrate; TU = "transducing units".

3.2.1.6. Einfluß von Gal4-ETO auf UAS unabhängige Promotorsequenzen

In den bisherigen Versuchen konnte gezeigt werden, daß die Koexpression von Gal4-ETO mit dem Reporterplasmid zur Repression des VSV-G-Proteins führt. Die VSV-G-Expression stellt in dem System den limitierenden Faktor bei der Produktion der viralen Partikel dar. In einem weiteren Versuch wurde überprüft, ob Gal4-ETO über unspezifische Effekte die Virusproduktion und somit den Titer negativ beeinflusst. Hierfür wurde der Repressor zusammen mit dem VSV-G-Ausgangsplasmid (pMD.G) in die Verpackungszelllinie transfiziert. Das pMD.G-Plasmid besitzt im Vergleich zum Δ pMD.G-Konstrukt keine Gal4-DNA-Bindungssequenzen (2xUAS). Dies bedeutet, daß Gal4-ETO nicht in der Nähe des Promotors binden und die Expression des VSV-G-Gens reprimieren kann. Im Unterschied zum Δ pMD.G-Konstrukt enthält der pMD.G-Vektor außerdem die kompletten Sequenzen für den CMV-Promotor. Im VSV-G-Reporterkonstrukt wurde der Promotorbereich durch die UAS-Sequenzen und einen TK-Promotor ersetzt (Abb. 3.7).

In dem Versuch wurden 125 ng des Gal4-ETO Konstrukts zusammen mit dem pMD.G-Plasmid und dem retroviralen Vektor PINCO in Phoenix-gp-Zellen kotransfiziert. Mit dem gesammelten Virusüberstand wurden Te671-Zellen transduziert. Die gemessenen Transfektions- und Transduktionsraten sind in Abb. 3.13 in einem Balkendiagramm abgebildet.

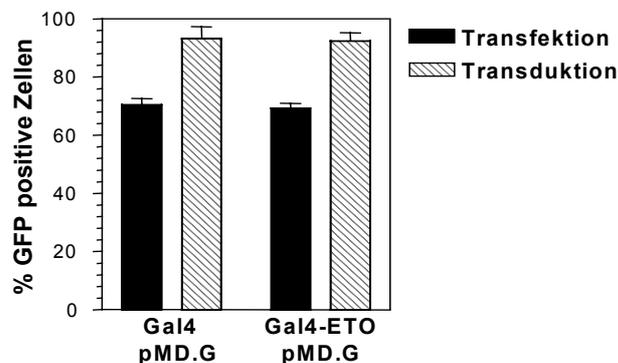


Abb. 3.13. Kotransfektion des Gal4-ETO Vektors mit dem pMD.G-Konstrukt. Um zu überprüfen, ob Gal4-ETO *per se* einen Einfluß auf die Virusproduktion hat, wurde der Repressor zusammen mit dem pMD.G-Plasmid zur Virusproduktion in Phoenix-gp-Zellen transfiziert. Das pMD.G-Plasmid besitzt im Vergleich zum Δ pMD.G-Reporterkonstrukt keine Gal4-DNA-Bindungssequenzen (2xUAS). Die Transfektionseffizienzen (schwarze Balken) und die Transduktionseffizienz (schraffierte Balken) wurden anhand des Anteils der GFP-positiven Zellen in einer FACS-Messung definiert. Die abgebildeten Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Doppelbestimmungen durchgeführt wurden. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM abgebildet.

In der Abbildung ist zu sehen, daß die Kotransfektion des Gal4-ETO-Plasmids die Virusproduktion in den Phoenix-gp-Zellen nicht negativ beeinflusst. Die Transduktionsrate (schraffierte Balken), die mit dem entsprechenden Virusüberstand auf den Te671-Zellen erreicht wurde, beträgt 95%. Bei vergleichbarer Transfektionsrate (schwarzer Balken) betrug die Transduktionseffizienz nach Kotransfektion der Gal4-DBD 97%.

Ziel war es, ein Selektionssystem zu etablieren, mit welchem ETO-inhibierende Peptide aus einer retroviralen Peptid-Bibliothek identifiziert werden können. Das in Kap. 3.2.1.1 beschriebene System basiert auf der Produktion viraler Partikel, die von der Expression des VSV-G-Hüllproteins abhängig ist. Hierfür wurde ein Gal4-abhängiges Reporterkonstrukt etabliert. Die Expression des VSV-G-Gens wird durch Gal4-ETO reprimiert, um bei einer späteren Selektion durch ein ETO-inhibierendes Peptid wieder aktiviert zu werden.

In den beschriebenen Ergebnissen wurde gezeigt, daß die Kotransfektion der Verpackungszellen mit dem Repressor Gal4-ETO zu stark verminderten Transduktionsraten führt. Die Repressionsstärke ist in dem Selektionssystem von der kotransfizierten Menge des Gal4-ETO-Plasmids abhängig. Die zu transfizierenden Mengen wurden so gewählt, daß die transkriptionelle Repression des VSV-G-Gens auf dem Reporterkonstrukt wieder aufgehoben werden konnte. Zur Etablierung des Selektionssystems wurden in unabhängigen Experimenten 5 ng, 50 ng, 125 ng und 250 ng Gal4-ETO-Plasmid transfiziert. Die Transduktionseffizienzen wurden hierbei im Mittel von 73% auf 11.3%, 3.1%, 1.5% und 0.2% reduziert.

Die ETO-vermittelte Repression des VSV-G-Gens konnte durch den HDAC-Inhibitor TSA teilweise aufgehoben werden. Die Ergebnisse des Kompetitionsversuchs und der dazugehörige Western-Blot-Analyse bestätigten, daß die reduzierten Transduktionsraten auf eine spezifisch durch Gal4-ETO verminderte VSV-G-Expression zurückzuführen sind. In diesem Versuch wurde die Gal4-DNA-Bindende-Domäne eingesetzt, um die Bindung von Gal4-ETO im VSV-G-Reporterkonstrukt zu verhindern und so die transkriptionelle Repression des VSV-Gens aufzuheben. Die Gal4-DBD wurde hierfür im Überschuß mit dem Repressor Gal4-ETO kotransfiziert. Die Transduktionsraten wurden bei den Verhältnissen 1:100 von 6.7% auf 49.1% (5 ng Gal4-ETO), 1:10 von 1.1% auf 16% (50 ng Gal4-ETO) und 1:4 von 0.35% im Mittel auf 7.4% (125 ng Gal4-ETO) erhöht. Die FACS-Messungen zeigten, daß die gleiche mittlere Fluoreszenz-Intensität in allen Ansätzen gleich stark war. Dies bedeutet, daß die mit wenigen viralen Partikeln transduzierten Zellen eindeutig detektiert werden können, was bei der Selektion einer Peptid-Bibliothek eine Voraussetzung ist. Allerdings verdeutlicht der Kompetitionsversuch zusätzlich, daß das System sehr stringent ist. Um die ETO-vermittelte Repression aufzuheben, muß der Kompetitor in einem hohen Verhältnis zu Gal4-ETO kotransfiziert werden. Ein ETO-

inhibierendes Peptid würde in einer Peptid-Bibliothek nicht in einem solch hohem Verhältnis vorliegen. Der Hintergrund an viralen Partikeln, die noch nach Kotransfektion von Gal4-ETO produziert werden, liegt abhängig von der transfizierten Plasmidmenge (125 ng - 5 ng) im Mittel zwischen 1.5×10^4 - 1.13×10^5 Partikeln je ml Virusüberstand (Tab. 3.2). Dies bedeutet, daß der Anteil der falsch-positiven Viruspartikel bei der Selektion einer Peptid-Bibliothek nach ETO-inhibierenden Peptiden zu hoch wäre und auch nicht durch mehrere Selektionsrunden vermindert werden könnte. Aufgrund der hohen Stringenz und des hohen Hintergrunds an falsch-positiven viralen Partikeln, die trotz der Kotransfektion des Gal4-ETO-Plasmids noch entstehen, wurde das Selektionssystem nicht zur Selektion einer Peptid-Bibliothek eingesetzt.

Um die beschriebenen Probleme zu lösen, wurde ein weiteres System zur Selektion ETO-inhibierender Peptide aus einer Peptid-Bibliothek etabliert (3.2.2). Hierbei handelt es sich um eine HEK-293-Zelllinie, die stabil mit einem Gal4-abhängigen Reporterkonstrukt (ein doppelter Selektionsmarker) und Gal4-ETO transfiziert ist.

3.2.2. Herstellung einer stabilen 293-Zelllinie mit einer über Gal4-ETO regulierten tkneo-Selektionskassette

3.2.2.1. Das stabile Selektionssystem

Die HEK-293-Zelllinie soll als Basis für ein *In-vitro*-Selektions-System dienen, mit welchem spezifisch ETO-inhibierende Peptide aus einer retroviralen Peptid-Bibliothek identifiziert werden können. Zu diesem Zweck sollen 293-Zellklone etabliert werden, die stabil mit einem Gal4-abhängigen Reporterkonstrukt, das für das Fusionsprotein tkneo kodiert, und einem Gal4-ETO-Plasmid transfiziert sind.

Das tkneo-Fusionsprotein besteht aus der Herpes Simplex-Thymidinkinase (HSV-TK) und der Neomycin-Phosphotransferase II (NPTII). Wird der doppelte Selektionsmarker in 293-Zellen exprimiert, so sind diese resistent gegen das Antibiotikum G418 und gleichzeitig sensitiv gegenüber dem Nucleosid-Analog Ganciclovir (GCV) (Abb. 3.14; oben). Die Expression der HSV-TK führt in den Zellen bei gleichzeitiger Anwesenheit von GCV zu deren Tod. Der Mechanismus basiert auf der Inhibierung der DNA-Synthese während der Replikation der Zelle. GCV wird durch das virale TK-Enzym zum GCV-Monophosphat phosphoryliert. Diese erste Phosphatgruppe ist die Voraussetzung für die weitere Phosphorylierung durch zelluläre Kinasen. Das triphosphorylierte GCV wird dann während der DNA-Synthese in zelluläre DNA eingebaut, was zum Strangabbruch und somit zum Tod der Zellen führt. Das Aminoglykosidantibiotikum G418 (Geneticin) bindet in

eukaryotischen Zellen an die 80S-Ribosomen und blockiert dadurch deren Proteinbiosynthese, so daß sich die Zellen nicht mehr weiter teilen können. Sind die Zellen mit einem Neomycin-Resistenzgen transfiziert, wird das G418 durch die exprimierte Neomycin-Phosphotransferase II phosphoryliert und inaktiviert; die Zellen werden resistent gegen G418.

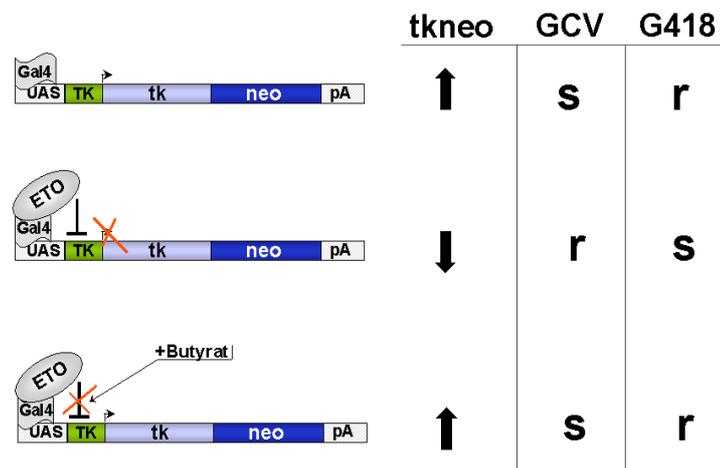


Abb. 3.14. Prinzip des über Gal4-ETO regulierten tkneo-Reporterkonstrukts. Zellen, die das Reporterkonstrukt enthalten, exprimieren das tkneo-Fusionsprotein und sind somit sensitiv gegen Ganciclovir (GCV) und resistent gegen G418. Das Gal4-ETO-Protein bindet über die Gal4-DNA-Bindungsstellen vor dem TK-Promotor und vermittelt die transkriptionelle Repression des tkneo-Gens. Die Zellen sind anschließend resistent gegen GCV und sensitiv für G418. Bei der Etablierung der stabilen Zelllinie wird die ETO-vermittelte Repression mit Hilfe des HDAC-Inhibitors Butyrat aufgehoben. Die Expression eines ETO-spezifischen Peptids soll dieselben Effekte besitzen; die 293-Zellen würden über eine G418-Selektion angereichert werden. Gal4 = Gal4-DBD; 2xUAS = zwei Gal4-DNA-Bindungsstellen; TK = Thymidinkinase-Promotor; tkneo = Fusionsgen, bestehend aus dem Herpes Simplex-Thymidinkinase- und dem Neo-Resistenzgen; pA = PolyA-Signal; s = sensitiv; r = resistent; GCV = Ganciclovir; G418 = Geneticin; ↑ = wird exprimiert; ↓ = wird nicht exprimiert.

Das Reporterkonstrukt enthält zwei Gal4-DNA-Bindungsstellen (2XUAS; „upstream activating signal“) vor dem Thymidinkinase-Promotor (TK-Promotor), der die Expression des tkneo-Fusionproteins ermöglicht. In den stabilen 293-Zellklonen bindet Gal4-ETO über den Gal4-Anteil an die DNA-Bindungsstellen vor dem TK-Promotor. Aufgrund der Interaktionen mit Korepressoren vermittelt der ETO-Anteil die transkriptionelle Repression des tkneo-Selektionsmarkers. Dies führt dazu, daß die Zelllinie sensitiv gegenüber G418 und resistent gegen GCV ist (Abb. 3.14; mitte). Die Gal4-ETO vermittelte GCV-Resistenz spielt vor allem bei der Etablierung der stabilen 293-Zellklone eine wichtige Rolle (Kap. 3.2.2.3).

Zur Identifizierung ETO-inhibierender Peptide aus einer retroviralen Peptid-Bibliothek soll ein etablierter Zellklon mit den entsprechenden viralen Partikeln transduziert werden.

Führt die Expression eines Peptides zur Aufhebung der ETO-vermittelten Repression, so kann eine positive Selektion mit G418 durchgeführt werden. Die entsprechende Peptid-Sequenz würde anschließend aus den G418-resistenten 293-Klonen isoliert werden. Um bei der Etablierung der stabilen 293-Zellklone zu testen, ob die Gal4-ETO-vermittelte transkriptionelle Repression des Fusionsproteins tkneo wieder aufgehoben werden kann, wurde der Histon-Deacetylase-Inhibitor Butyrat [Dangond et al., 1998; Krämer et al., 2001; Paul et al., 2001] eingesetzt. Butyrat inhibiert -wie TSA- die in dem von Gal4-ETO rekrutierten Korepressorkomplex enthaltenen Histon-Deacetylasen und verhindert so die transkriptionelle Repression des tkneo-Gens. Dies bedeutet, daß es wieder zur Expression des tkneo-Fusionsproteins und somit zu einer erneuten Resistenz gegenüber G418 kommt. Die Expression eines ETO-spezifischen Peptids sollte denselben Effekt besitzen (Abb. 3.14; unten).

Als Kontrolle soll eine 293-Mischpopulation etabliert werden, die neben dem tkneo-Reporterkonstrukt lediglich die DNA-Bindende-Domäne (Gal4-DBD) des Gal4-Proteins exprimiert. Die Gal4-DBD kann genau wie das Gal4-ETO-Protein an die Gal4-Bindungsstellen (2xUAS) binden, hat aber keinen Einfluß auf die über einen aktiven Thymidinkinase-Promotor (TK) angetriebene konstitutive Expression des tkneo-Fusionsproteins.

3.2.2.2. Konstruktion des tkneo-Reporterplasmids

Für die Konstruktion des tkneo-Reporterplasmids wurde zunächst das 2 kb große tkneo-cDNA-Fragment mittels Restriktionsverdau mit den Enzymen BglIII und NheI aus dem Vektor pfgU3-TkNeo isoliert. Das Fusionsgen wurde anschließend in den über BglIII und XbaI geöffneten Vektor pGLK-2xUAS-TK ligiert, wobei durch das Öffnen des Vektors gleichzeitig das für eine Luciferase codierende cDNA-Fragment von 1.7 kb entfernt wurde (Abb. 3.15).

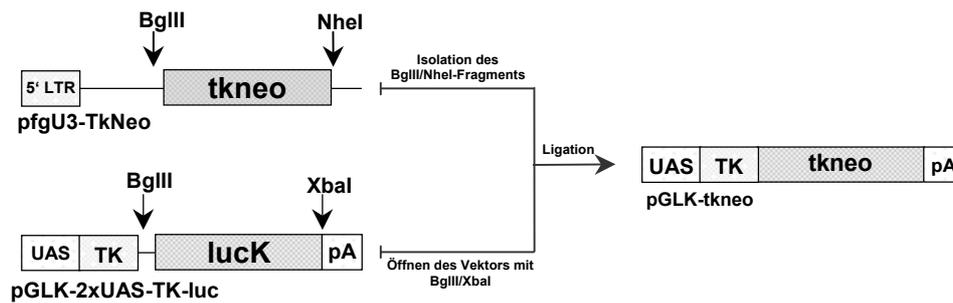


Abb. 3.15. Konstruktion des tkneo-Reporterplasmids. Erläuterungen im Text. 2xUAS = zwei Gal4-DNA-Bindungsstellen; TK = Thymidin-Kinase-Promotor; tkneo = Fusionsgen der Wildtyp-Thymidinkinase des Herpes-Simplex-Virus (HSV) und der Neomycin-Phosphotransferase II; SV40pA = polyA-Signal aus dem Simian Virus 40; LTR = „Long Terminal Repeat“; lucK = Luziferasegen.

3.2.2.3. Vorgehensweise zur Erstellung der stabilen 293-Zelllinie

Zur Erstellung der Zellklone (Fließschema in Abb. 3.17) wurden im ersten Schritt 4×10^6 293-Zellen mit $25 \mu\text{g}$ des Reporterkonstrukts pGLK-tkneo transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden je 3×10^6 der transfizierten 293-Zellen auf eine T75-Kulturflasche ausgesät und nach weiteren 24 h unter G418-Selektionsdruck gestellt. Die G418-Selektion wurde 21 Tage bei einer G418-Konzentration von $400 \mu\text{g/ml}$ durchgeführt. Die Bedingungen für die G418-Selektion wurden zuvor an 293-Wildtyp-Zellen ausgetestet.

In einem Wachstumsassay wurde die mit dem Reporterkonstrukt pGLK-tkneo stabil transfizierte 293-Mischpopulation auf ihre Sensitivität gegenüber GCV getestet. Hierfür wurden die 293-Zellen in 24-Napfplatten in Gegenwart von $10 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$ oder $100 \mu\text{M}$ GCV kultiviert, wobei als Kontrolle die nicht-transfizierten 293-Wildtyp-Zellen mitgeführt wurden. Die Zellzahlen wurden nach 3.5, 6.5 und 8.5 Tagen mittels Trypanblaufärbung ermittelt und im folgenden Diagramm zusammengefasst (Abb. 3.16):

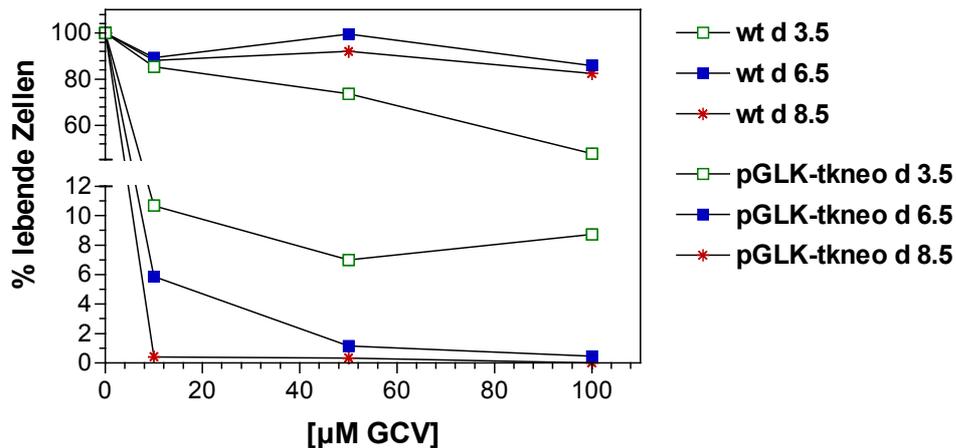


Abb. 3.16. Ganciclovir-Assay tkneo-exprimierender 293-Zellen. Bei der Herstellung der stabilen Zelllinie wurden im ersten Schritt 293-Zellen mit dem tkneo-Reporterkonstrukt transfiziert. In dem GCV-Assay wurde die Sensitivität der G418-resistenten 293-Zellpopulation getestet, um eine GCV-Konzentration zu definieren, bei der alle Zellen sterben. Für den Assay wurden 2×10^4 293-Zellen in 24-Napfplatten ausgesät. Sowohl die tkneo-exprimierenden als auch die 293wt-Zellen wurden in Gegenwart von 10 μM , 50 μM oder 100 μM ($n = 2$) GCV kultiviert. Die Zellzahlen wurden nach 3.5, 6.5 und 8.5 Tagen mittels Trypanblaufärbung ermittelt. GCV = Ganciclovir; wt = 293-Wildtypzellen; pGLK-tkneo = stabil mit dem Reporterkonstrukt transfizierte 293-Zellen; d = Tag.

Nach 3.5 Tagen konnte schon bei einer Konzentration von 10 μM GCV ein deutlicher Effekt auf das Wachstum der tkneo-exprimierenden Zellen beobachtet werden. Hier waren bereits 90% der Zellpopulation durch Ganciclovir abgetötet worden. Bei Konzentrationen von 50 μM und 100 μM zeigten bereits 92% bzw. 93% der tkneo-exprimierenden 293-Zellen eine Sensitivität gegenüber GCV. Bei diesen hohen Konzentrationen war allerdings auch ein wachstumsverzögernder Effekt der 293-Wildtypzellen zu sehen. Dieser Effekt lässt sich mit der Expression endogener Thymidinkinasen erklären, die jedoch eine weniger hohe Affinität zu Ganciclovir aufweisen [Black et al., 1996; Kokoris et al., 1999]. Ziel war es, eine Ganciclovir-Konzentration zu definieren, bei der alle tkneo-exprimierenden 293-Zellen durch Ganciclovir starben. Dies war nach 8.5 Tagen bei einer GCV-Konzentration von 100 μM der Fall.

Im nächsten Schritt wurde das Plasmid pCMX-Gal4-ETO in die G418-resistenten 293-pGLK-tkneo Mischpopulation transfiziert. Da das pCMX-Gal4-ETO-Plasmid nicht zusätzlich für einen Selektionsmarker kodiert, wurde ein Puromycin-Resistenzgen kotransfiziert. Das Plasmid pBabePuro wurde hierfür mit pCMX-Gal4-ETO im Verhältnis 1:10 kotransfiziert. Die Puromycinselektion wurde für 17 Tage bei einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durchgeführt. Die Selektionsbedingungen für Puromycin wurden zuvor auf 293-Wildtypzellen ausgetestet.

Die Expression des Gal-ETO-Fusionsproteins führt zur transkriptionellen Repression des tkneo-Selektionsmarkers, d.h. die 293-Zellklone verlieren die Sensitivität gegenüber GCV, weswegen im nächsten Schritt eine Positivselektion mit GCV vorgenommen wurde. Da es wichtig war, den Hintergrund an Zellklonen, die nicht aufgrund der ETO-vermittelten transkriptionellen Repression des tkneo-Gens eine Resistenz gegen das Ganciclovir aufwiesen, möglichst gering zu halten, wurde die Selektion bei 100 μ M GCV durchgeführt.

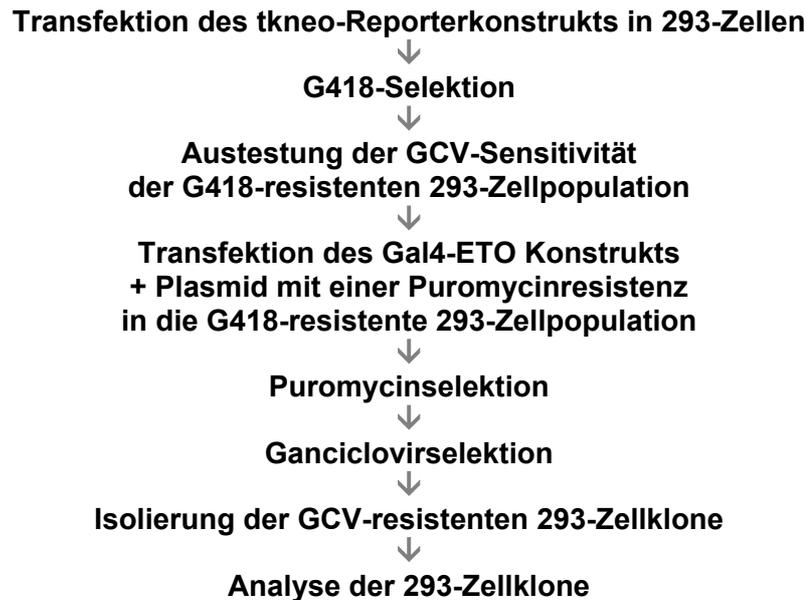


Abb. 3.17. Prinzip zur Etablierung der stabilen 293-Zelllinie mit einer über Gal4-ETO regulierten tkneo-Selektionskassette. Im ersten Schritt wurden 293-Zellen mit dem tkneo-Reporterkonstrukt transfiziert. Darauf folgte eine G418-Selektion der transfizierten 293-Zellen. Bevor die G418-resistente 293-Zellpopulation mit dem Repressor Gal4-ETO (+ Puromycin-Resistenzgen) transfiziert wurden, mußte die GCV-Sensitivität der 293-Population in einem GCV-Assay ausgetestet werden (Abb. 3.14). Auf die Transfektion von Gal4-ETO und dem Puromycin-Resistenzgen folgte die Puromycin-Selektion. Da Gal4-ETO die transkriptionelle Repression des tkneo-Gens vermittelt, wurde im nächsten Schritt nach 293-Zellen selektioniert, die resistent gegen GCV waren. Die GCV-resistenten 293-Zellklone wurden schließlich isoliert und in weiteren Versuchen (Wachstumskinetik, PCR, Western-Blot) getestet

In zwei unabhängigen Ansätzen wurden insgesamt 200 Ganciclovir-resistente 293-Zellklone isoliert, wobei 118 dieser Klone anwuchsen. Diese 118 G418-Klone wurden in MTT-Wachstums-Assays bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber G418 analysiert. Gleichzeitig wurde getestet, bei welchen Klonen sich die Gal4-ETO-vermittelte transkriptionelle Repression des Selektionsmarkers durch den Histon-Deacetylase-Inhibitor Butyrat wieder aufheben ließ, d.h. welche der G418-sensitiven 293-Zellklone bei gleichzeitiger Anwesenheit des Inhibitors und des G418 eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum zeigten.

Die Hälfte aller Klone (58 Klone) waren sensitiv gegen das Antibiotikum G418, wobei sich die Expression des doppelten Selektionsmarkers tkneo durch die Zugabe von Butyrat nicht wieder anschalten ließ. Dies bedeutet, daß diese Klone keine G418-Resistenz bei gleichzeitiger Anwesenheit von Butyrat entwickelten. 34 der untersuchten Zellklone waren weiterhin resistent gegen G418, und 21 der Klone ließen sich nicht in Anwesenheit von Butyrat kultivieren. Lediglich 5 (#20, #61, #157, #158, #163) der stabil transfizierten Zellklone waren sowohl sensitiv für G418 und entwickelten bei gleichzeitiger Anwesenheit von Butyrat eine Resistenz gegen das G418.

Ob das Wachstumsverhalten dieser Zellklone unter den verschiedenen Selektionsbedingungen auf eine Gal4-ETO-vermittelte transkriptionelle Repression des tkneo-Gens zurückzuführen war, wurde in weiteren Experimenten (Wachstumskinetik, PCR, Western-Blot) genauer charakterisiert.

3.2.2.4. Charakterisierung der etablierten Zellklone mit einer durch Butyrat regulierbaren tkneo-Expressions-kassette

3.2.2.4.1. Nachweis der stabilen Integration der Konstrukte pCMX-Gal4-ETO und pGLK-tkneo mittels PCR

Die 5 etablierten Zellklone (#20, #61, #157, #158, #163) wurden zusammen mit drei weiteren Klonen (#43, #138, #143), die lediglich G418-sensitiv waren, in PCR-Analysen untersucht. Hierbei wurde die stabile Integration der Plasmide pGLK-tkneo und pCMX-Gal4-ETO analysiert. Im ersten Schritt wurden die PCR-Reaktionen mit einer hohen Zyklenzahl durchgeführt, um eine qualitative Aussage zu erhalten, bevor die Anzahl der integrierten Plasmid-Kopien bei optimierter Zyklenzahl semiquantitativ bestimmt wurde. Die Reaktionen wurden in Doppelbestimmungen angesetzt, wobei genomische DNA aus 293wt-Zellen als Negativkontrolle verwendet wurde. Zur internen Kontrolle der verwendeten DNA-Mengen wurde parallel zu allen Ansätzen eine β -Actin-PCR durchgeführt.

In der PCR-Reaktion war nach 35 Zyklen ein deutliches Signal des PCR-Produkts für Gal4-ETO (Abb. 3.18) in den Proben der Klone #20 (A), #157 (A), #61 (C) und #143 (C) zu sehen. Das Gal4-ETO-Signal war hingegen für die Klone #163 (A), #43 (C) und #138 (C) nur sehr schwach. Für Klon #158 (Abb. 3.16A) konnte hingegen kein Gal4-ETO-Signal detektiert werden. In der entsprechenden tkneo-PCR (Abb. 3.16B/C) war in allen bis auf zwei Klonen (#43 und #143; C) ein starkes PCR-Signal des tkneo-Gens zu sehen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß von den 5 Klonen, die im Wachstumsassay G418-sensitiv und unter Butyrat G418-resistent waren, die Klone #20, #61, #157 und #163 sowohl für Gal4-ETO als auch für tkneo positiv sind. Im nächsten Schritt wurde die Kopienanzahl der Konstrukte Gal4-ETO und pGLK-tkneo in semiquantitativen PCR-Ansätzen bestimmt.

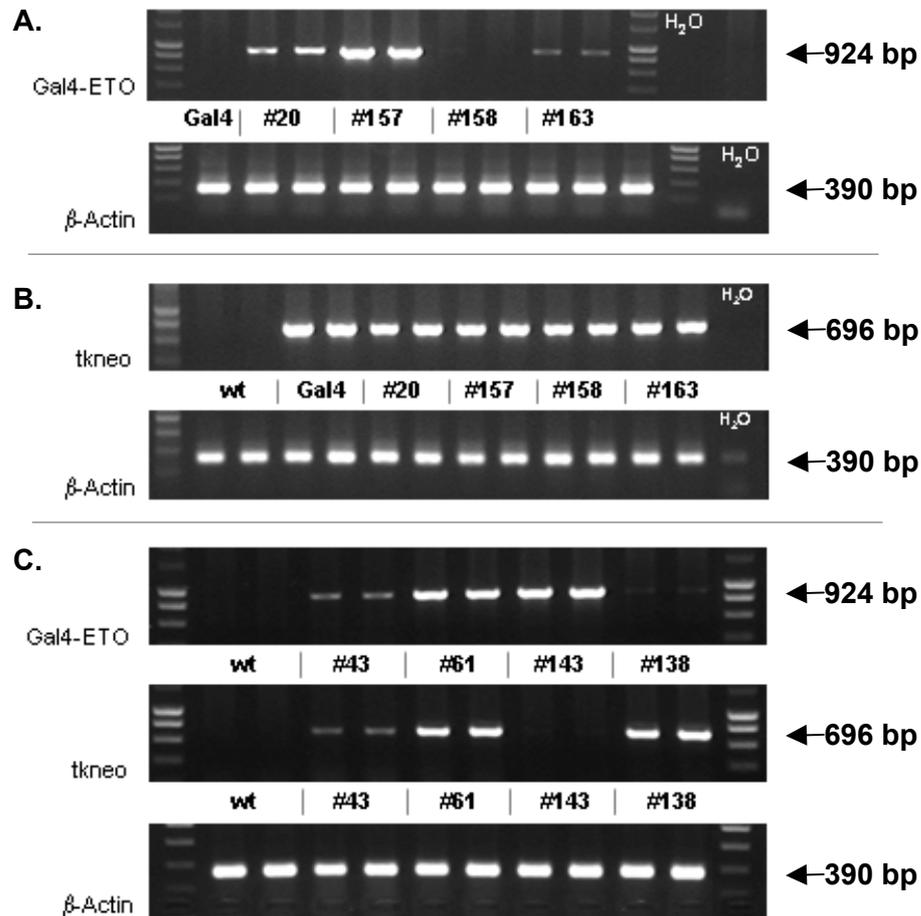


Abb. 3.18. PCR für Gal4-ETO und den Selektionsmarker tkneo mit genomischer DNA verschiedener Zellklone. In PCR-Ansätzen wurde die Integration der Konstrukte pGLK-tkneo und pCMX-Gal4-ETO in den Klonen #20, #61, #157, #158 und #163 untersucht. Die 5 Klone waren im Wachstumsassay G418-sensitiv und unter Butyrat G418-resistent. Außerdem wurden die Klone #43, #138 und #141 mitgeführt, welche im Wachstumsassay lediglich G418-sensitiv waren und unter Butyrat keine G418-Resistenz entwickelten. Die PCR wurde in doppelten Ansätzen über 35-Zyklen durchgeführt, wobei je Reaktion 1 μ g genomische DNA der entsprechenden Klone eingesetzt wurde. Zur internen Kontrolle der verwendeten DNA diente parallel zu allen Ansätzen eine β -Actin-PCR. wt = genomische DNA von nicht-transfizierten 293-Zellen (Negativkontrolle); Gal4 = genomische DNA aus stabil mit pGLK-tkneo und Gal4-DBD transfizierten 293-Zellen; Gal4-ETO = PCR mit Gal4-ETO-spezifischem Primerpaar; tkneo = PCR mit tkneo-spezifischem Primerpaar; β -Actin = PCR mit β -Actin-spezifischem Primerpaar.

3.2.2.4.2. Semiquantitative Bestimmung der stabil in das Genom integrierten pGLK tkneo- und pCMX-Gal4-ETO-Kopien mittels PCR

Mittels semiquantitativer PCR wurde die Kopienanzahl der integrierten Plasmide pCMX-Gal4-ETO und pGLK-tkneo je Zelle in den Klonen #20, #61, #157 und #163 bestimmt. Hierfür wurde die zu testende genomische DNA parallel zu der entsprechenden Plasmid-Standardreihe in einer PCR eingesetzt. Alle PCR-Reaktionen wurden in Doppelbestimmungen angesetzt. Nach der Gelelektrophorese wurden die Bandenintensitäten mit Hilfe des Analysenprogramms "QuantityOne" (BioRad; München) bestimmt. Die Kopienanzahl wurde anschließend anhand der Plasmid-Standardreihe definiert. Zur internen Kontrolle der verwendeten genomischen DNA wurde parallel in allen Ansätzen eine β -Actin-PCR mitgeführt.

In Abb. 3.19 sind die semiquantitativen PCR-Ansätze für das Plasmid pCMX-Gal4-ETO der Klone #20, #157 und #163 zu sehen. Die Auswertung ergab, daß Klon #157 1.34 Kopien des Gal4-ETO-Plasmids je Zelle enthält. Die Kopienanzahl lag bei Klon #20 bei 0.04 Kopien je Zelle und bei Klon #163 war die Integration des Plasmids nicht mehr nachweisbar. Die zugehörige semiquantitative PCR für das pGLK-tkneo-Konstrukt der Klone ist in Abb. 3.20 abgebildet. In Klon #20 wurden 1.46 Kopien, in Klon #157 1.63 Kopien und in Klon #163 1.69 Kopien des tkneo-Reporterkonstrukts je Zelle nachgewiesen. Die Ergebnisse der semiquantitativen PCR-Analyse von Klon #61 sind in Abb. 3.21 zu sehen. Anhand der Standardkurven wurden die Integrationen von 1.48 pCMX-Gal4-ETO-Plasmide/Zelle und von 2.07 pGLK-tkneo-Plasmide/Zelle bestimmt.

Allein in den Zellklonen #61 und #157 konnte die stabile Integration von mindestens einer Kopie sowohl des Reporterkonstrukts pGLK-tkneo als auch von pCMX-Gal4-ETO je Zelle nachgewiesen werden. Da die Integration des tkneo-Reporterkonstrukts ebenso wie die Expression des Repressors Gal4-ETO Voraussetzungen für das beschriebene Selektionssystem (Kap. 3.2.2.1) sind, wurde die weitere Charakterisierung ausschließlich mit den Klonen #61 und #157 durchgeführt. Die Ergebnisse der nicht-quantitativen sowie semiquantitativen PCRs sind in Tabelle 3.5 zusammengefaßt.

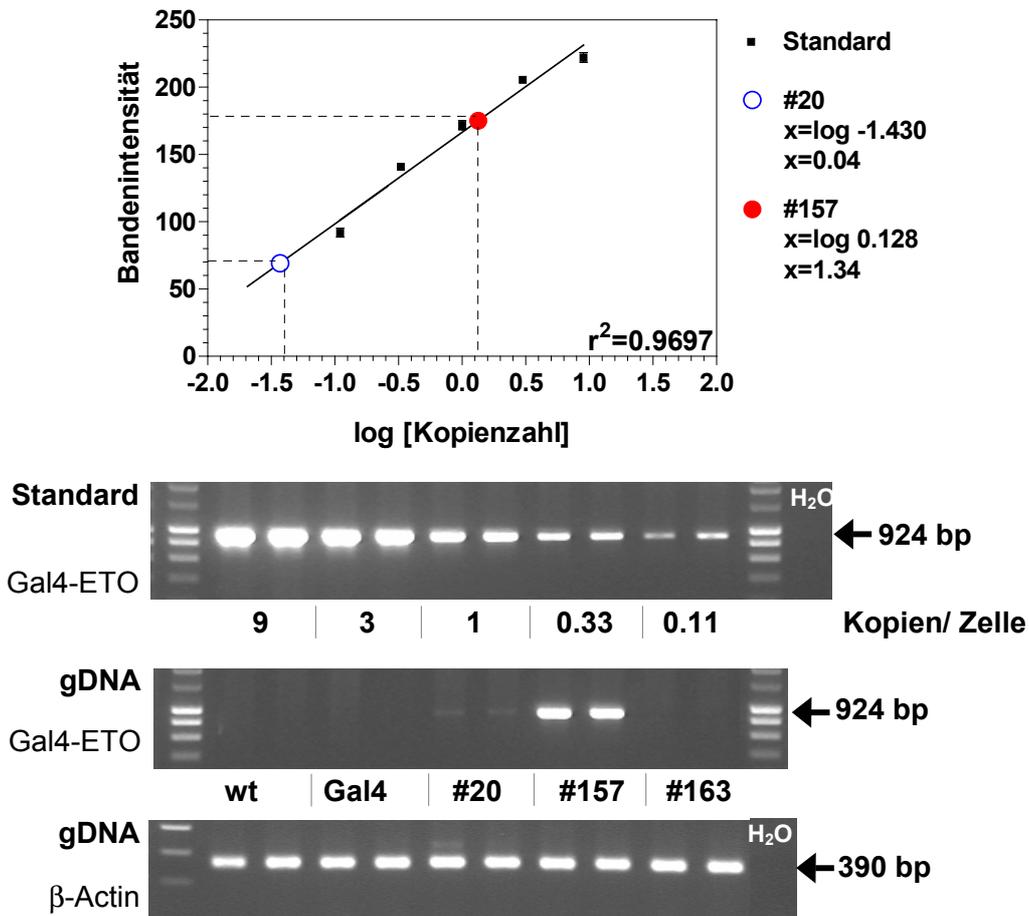


Abb. 3.19. Semiquantitative PCR für Gal4-ETO mit genomischer DNA der Klone #20, #157 und #163. In den PCR-Ansätzen wurde die Integration des Konstrukts pCMX-Gal4-ETO in den Klonen #20, #157 und #163 untersucht. Die PCR wurde in doppelten Ansätzen durchgeführt, wobei jeweils 1 µg genomische DNA eingesetzt wurde. Für die Standardreihe wurde pCMX-Gal4-ETO Plasmid-DNA in genomischer DNA von 293wt-Zellen verwendet. Die PCR wurde mit insgesamt 28 Zyklen durchgeführt. Die Werte der Bandenintensitäten sind nach der statistischen Auswertung als Mittelwerte \pm SEM abgebildet. Zur internen Kontrolle der verwendeten DNA wurde parallel zu allen Ansätzen eine β -Actin-PCR durchgeführt. wt = genomische DNA von nicht-transfizierten 293-Zellen (Negativkontrolle); Gal4 = genomische DNA aus stabil mit pGLK-tkneo und Gal4-DBD transfizierten 293-Zellen; Gal4-ETO = PCR mit Gal4-ETO-spezifischem Primerpaar; tkneo = PCR mit tkneo-spezifischem Primerpaar; β -Actin = PCR mit β -Actin-spezifischem Primerpaar; gDNA = genomische-DNA

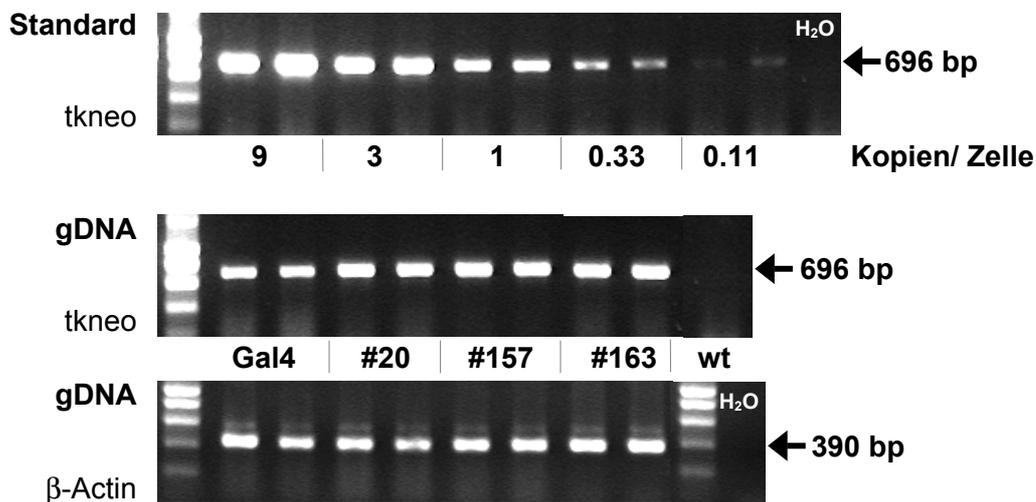
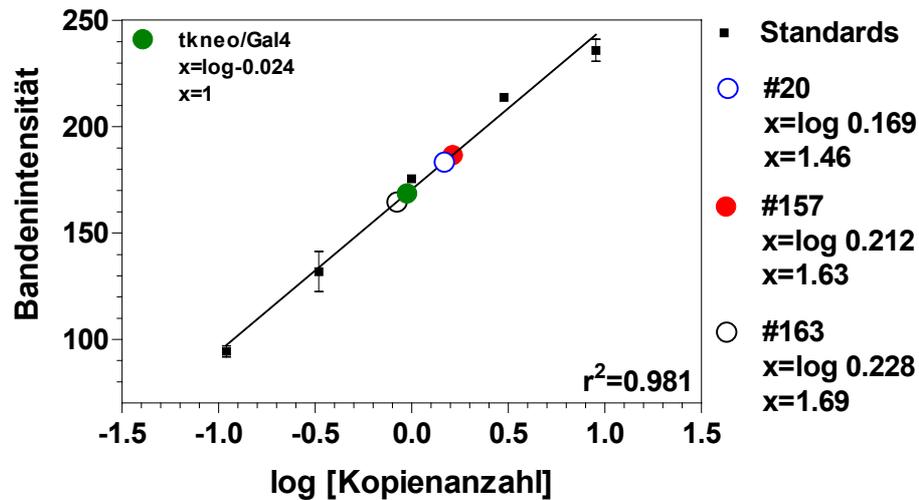


Abb. 3.20. Semiquantitative PCR für tkneo mit genomischer DNA der Klone #20, #157 und #163. In den PCR-Ansätzen wurde die Integration des Konstrukts pGLK-tkneo in den Klonen #20, #157 und #163 untersucht. Die PCR wurde in doppelten Ansätzen durchgeführt, wobei jeweils 1 µg genomische DNA eingesetzt wurde. Für die Standardreihe wurde pGLK-tkneo Plasmid-DNA in genomischer DNA von 293wt-Zellen verwendet. Die PCR wurde mit insgesamt 28 Zyklen durchgeführt. Die Werte der Bandenintensitäten sind nach der statistischen Auswertung als Mittelwerte \pm SEM abgebildet. Zur internen Kontrolle der verwendeten DNA diente in allen Ansätzen eine β -Actin-PCR. wt = genomische DNA von nicht-transfizierten 293-Zellen (Negativkontrolle); Gal4 = genomische DNA aus stabil mit pGLK-tkneo und Gal4-DBD transfizierten 293-Zellen; Gal4-ETO = PCR mit Gal4-ETO-spezifischem Primerpaar; tkneo = PCR mit tkneo-spezifischem Primerpaar; β -Actin = PCR mit β -Actin-spezifischem Primerpaar; gDNA = genomische-DNA.

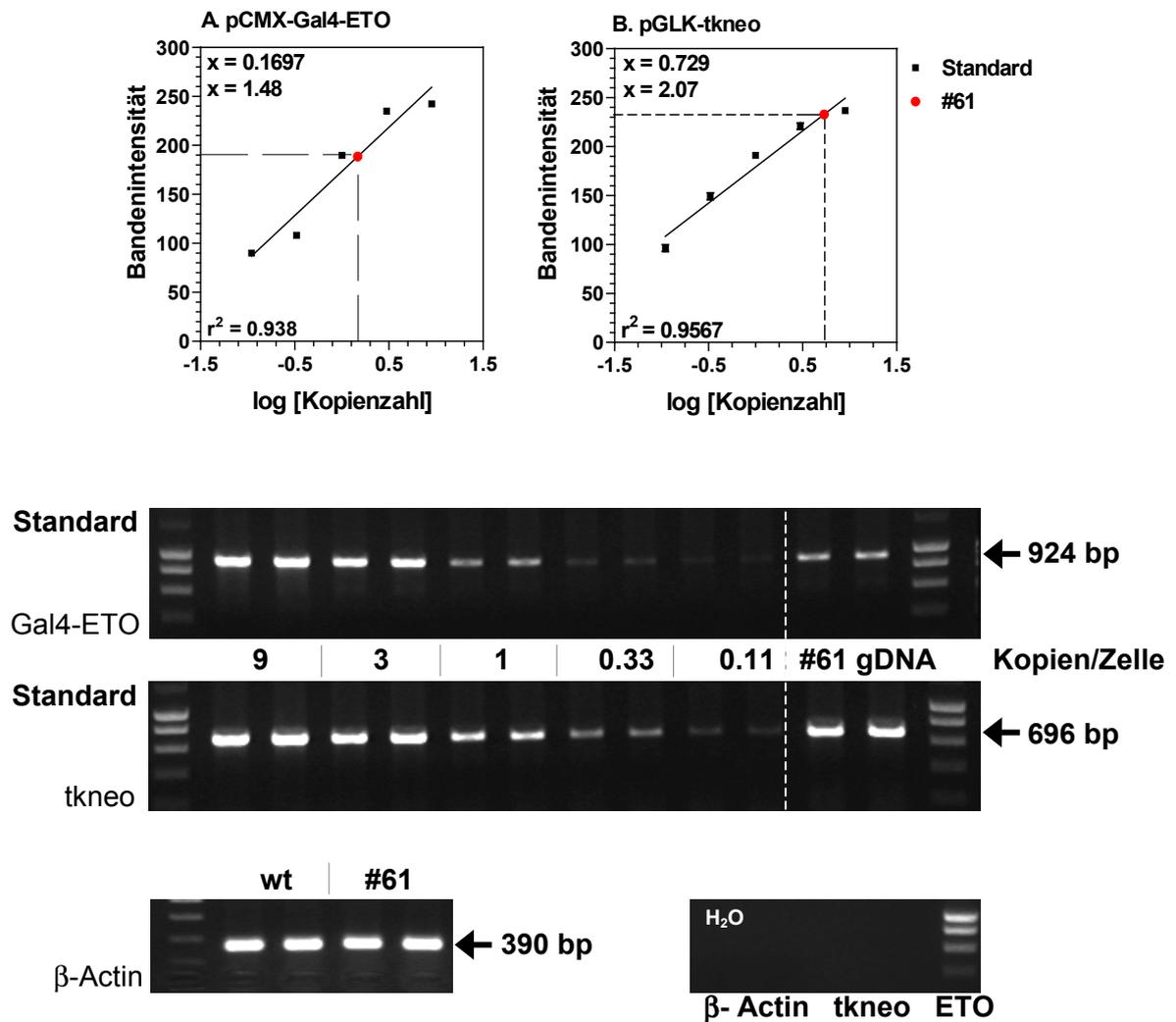


Abb. 3.21. Semiquantitative PCR für Gal4-ETO und pGLK-tkneo mit genomischer DNA des Klons #61. In den PCR-Ansätzen wurde die Integration des Konstrukts pCMX-Gal4-ETO und pGLK-tkneo des Klons #61 untersucht. Die PCR wurde in doppelten Ansätzen durchgeführt, wobei jeweils 1 µg genomische DNA eingesetzt wurde. Für die Standardreihe wurde pCMX-Gal4-ETO und pGLK-tkneo Plasmid-DNA in genomischer DNA von 293wt-Zellen verwendet. Die PCR wurde mit insgesamt 28 Zyklen durchgeführt. Die Werte der Bandenintensitäten sind nach der statistischen Auswertung als Mittelwerte \pm SEM abgebildet. Zur internen Kontrolle der verwendeten DNA diente in allen Ansätzen eine β -Actin-PCR. wt = genomische DNA von nicht-transfizierten 293-Zellen (Negativkontrolle); 293-Zellen; Gal4-ETO = PCR mit Gal4-ETO-spezifischem Primerpaar; tkneo = PCR mit tkneo-spezifischem Primerpaar; β -Actin = PCR mit β -Actin spezifischem-Primerpaar.

Klon #	PCR		Semiquantitative-PCR	
	Gal4-ETO	tkneo	Gal4-ETO	tkneo
20	++	+++	0.04	1.46
61	+++	+++	1.48	2.07
157	+++	+++	1.34	1.63
163	+	+++	-	1.69

Tab. 3.5. Zusammenfassung der nicht-quantitativen- und der semiquantitativen-PCRs. Um die Integration der Konstrukte pCMX-Gal4-ETO und pGLK-tkneo in den Zellklone #20, #61, #157 und #163 zu überprüfen wurden nicht-quantitative-PCRs (Abb. 3.16)) durchgeführt. Die Anzahl der integrierten Plasmide wurde anschließend in semiquantitativen-PCRs (Abb. 3.17-19)) bestimmt. + = Bandenintensität des jeweiligen PCR-Produkts: + = sehr schwaches Signal, ++ = deutliches Signal, +++ = sehr starkes Signal; die Zahlen 0.04 bis 2.07 entsprechen den Anzahlen der Plasmidkopien pro Zelle und Zellklon; - = kein Signal.

3.2.2.4.3. Nachweis der Gal4-ETO-Expression in den Klonen #61 und #157

Um die Expression der Gal4-ETO-mRNA in den Klonen #61 und #157 nachzuweisen, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Für die Reverse Transkription der mRNA wurde ein Oligo-dT₍₁₆₎-Primer verwendet. In Abb. 3.22 (+RT) sind die PCR-Produkte für Gal4-ETO von den Proben der Klone #61 und #157 zu sehen. Die PCR-Reaktionen wurden in einer Doppelbestimmung angesetzt. Zur internen Kontrolle der eingesetzten RNA-Mengen wurde parallel zu allen Ansätzen eine β -Actin-PCR durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde RNA von 293wt-Zellen verwendet. Um PCR-Signale durch eine DNA-Kontamination der RNA-Proben auszuschließen, wurden diese zusätzlich nach einem RT-Schritt, der ohne Reverse-Transkriptase durchgeführt wurde (-RT), in PCR-Reaktionen eingesetzt.

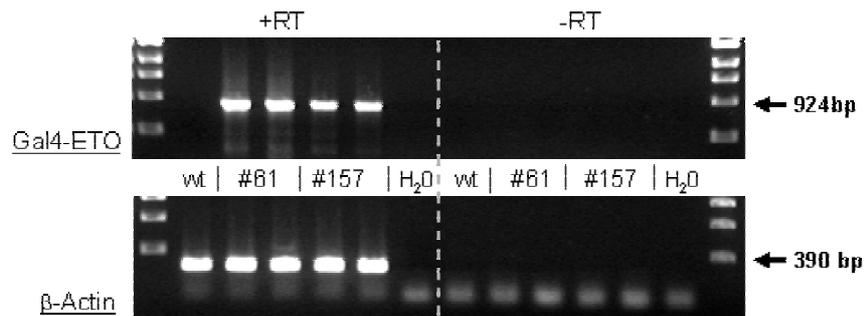
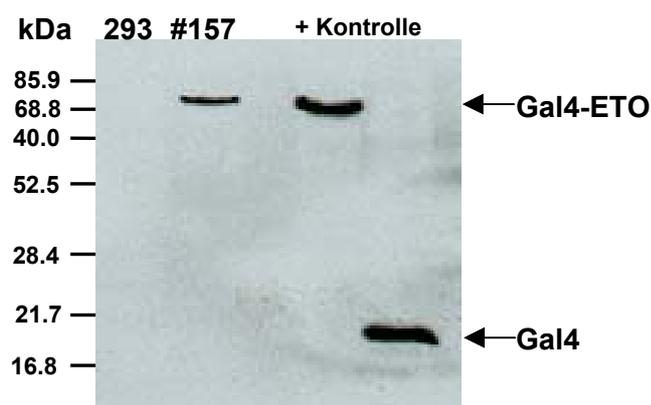


Abb. 3.22. Nachweis der Gal4-ETO-mRNA-Expression in den Klonen #61 und #157 mittels RT-PCR. Für die Reverse Transkription wurde jeweils 1 µg RNA eingesetzt. Die PCR-Analyse wurde für Gal4-ETO und zur internen Kontrolle der eingesetzten RNA-Mengen für β-Actin durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden 293wt-Zellen verwendet. Die PCR-Analysen wurden für die Klone #61 und #157 in Doppelbestimmungen durchgeführt. +RT : mit Reverse Transkriptase; -RT : ohne Reverse Transkriptase.

In einer Western-Blot-Analyse wurden die Ergebnisse der RT-PCR für Gal4-ETO weiter bestätigt. Während für Klon #61 die Expression von Gal4-ETO lediglich in der RT-PCR nachgewiesen werden konnte, wurde diese für Klon #157 zusätzlich in einer Western-Blot-Analyse gezeigt (Abb. 3.23). Die Immunodetektion wurde mit einem Antikörper gegen die Gal4-DBD durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden 293-Wildtypzellen (erste Spur) eingesetzt, und als Positivkontrolle (+Kontrolle) wurden Lysate von transient mit dem Plasmid pCMX-Gal4-ETO bzw. pCMX-Gal4 transfizierten 293-Zellen verwendet. Auf der Höhe der Positivkontrolle (75 kDa) ist ein deutliches Signal für das Gal4-ETO-Protein des Klons #157 zu sehen.



WB: α-Gal4

Abb. 3.23. Gal4-ETO Western-Blot-Analyse des Zellklons #157. In der Western-Blot-Analyse wurde die Gal4-ETO-Expression in Klon #157 nachgewiesen. Die Immunodetektion wurde mit einem α-Gal4-Antikörper durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden Lysate von transient mit den Plasmiden pCMX-Gal4-ETO bzw. pCMX-Gal4 transfizierten 293-Zellen verwendet. 293 = 293-Wildtypzellen (Negativkontrolle), #157 = Lysat des Zellklons #157; +Kontrolle = Positivkontrollen für Gal4-ETO und Gal4; kDa = Kilo-Dalton.

3.2.2.4.4. Wachstumskinetiken der stabilen Klone #61 und #157

In verschiedenen Wachstumskinetiken wurde das Proliferationsverhalten der Klone #61 und #157 unter G418 und GCV charakterisiert. Wie bereits in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben, führt die Expression des Gal4-ETO-Proteins in den Zellklonen zur transkriptionellen Repression des tkneo-Fusionsgens. Die Zellklone sind sensitiv für G418 und resistent gegen GCV. Diese Repression soll in Anwesenheit des Histon-Deacetylase-Inhibitors Butyrat wieder aufgehoben werden können. Bei der Selektion einer Peptid-Bibliothek würde die Expression eines ETO-inhibierenden Peptids denselben Effekt besitzen. Dies bedeutet, daß die Klone in Anwesenheit von G418 proliferieren bzw. aufgrund des exprimierten tkneo-Gens in Gegenwart von GCV sterben. Zur Kontrolle wurden parallel nicht-transfizierte 293-Zellen mitgeführt. Die verschiedenen 293-Zellen wurden während des Assays in 24-Napfplatten kultiviert und alle zwei bis drei Tage mittels Trypanblaufärbung ausgezählt. Jede Bedingung wurde als Doppelbestimmung durchgeführt.

In Abb 3.23A ist das Proliferationsverhalten der Zellklone #61, #157 und von 293-Wildtypzellen unter G418 abgebildet. Beide Zellklone proliferierten in gleichzeitiger Anwesenheit von Butyrat unter G418 (blaue Linien), wohingegen sie ohne Butyrat sensitiv für G418 waren (grüne Linien). Die exponentiellen Wachstumsphasen wurden, verglichen mit den Butyrat- (gelbe Linie) und den Mediumkontrollen (rote Linie), bei beiden Klonen erst 2 (#61) bzw. 9 (#157) Tage später erreicht. Beide Zellklone sind also nach Zugabe des HDAC-Inhibitors Butyrat resistent gegen G418, wobei Klon #157 langsamer proliferierte als Klon #61. Ohne Butyrat-Zugabe waren beide Klone sensitiv für G418. Ab Tag 11 (#61) bzw. Tag 8 (#157) waren in den Ansätzen, in denen nur G418 zugegeben wurde, keine lebenden Zellen mehr vorhanden. In den Wachstumskurven ist außerdem zu sehen, daß Butyrat die Proliferation der Zellen im Vergleich zur Mediumkontrolle leicht hemmte.

Die als Kontrolle mitgeführten 293-Wildtypzellen waren ab Tag 11 der Selektion unter G418 und in Kombination mit Butyrat (blaue Linie) alle abgestorben. Die Proliferation durch Butyrat war um 30% (Tag 8) vermindert.

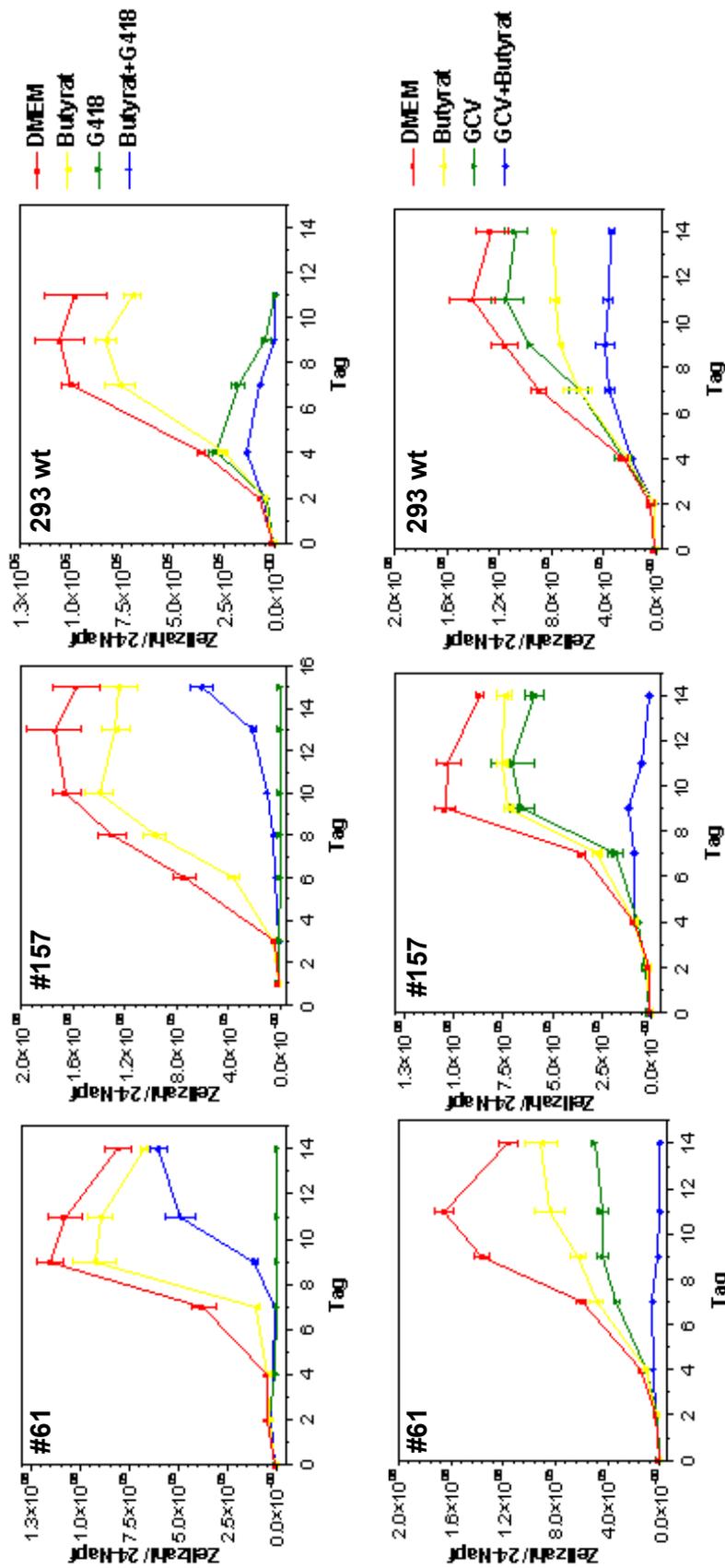


Abb. 3.23. Wachstumskinetiken der Klone #61 und #157 unter verschiedenen Selektionsbedingungen. Aufgrund der ETO-vermittelten transkriptionellen Repression des tkneo-Gens sind die Zellklone sensitiv für G418 und resistent gegen GCV. Diese Repression wird in Anwesenheit des HDAC-Inhibitors Butyrat wieder aufgehoben. Bei Selektion einer Peptid-Bibliothek soll die Expression eines ETO-inhibierenden Peptids denselben Effekt besitzen. Die Klone proliferieren dann in Anwesenheit von G418 bzw. sterben aufgrund des exprimierten tkneo-Gens in Gegenwart von GCV. Zur Kontrolle wurden parallel nicht-transfizierte 293-Zellen mitgeführt. Es wurden zwischen 6×10^3 und 8×10^3 Zellen auf 24-Napfplatten ausgesät, wobei jede Bedingung als Doppelbestimmung durchgeführt wurde. Die Zellen wurden 8 h mit 1 mM Butyrat vorinkubiert, bevor mit der Selektion (400 $\mu\text{g/ml}$ G418 bzw. 100 μM GCV) begonnen wurde. Die Lebend-Zellzahl wurde alle zwei bis drei Tage mittels Trypanblaufärbung bestimmt, wobei jeder Ansatz zweimal ausgezählt wurde. Die Lebend-Zellzahlen sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben.

In einer weiteren Wachstumsanalyse wurde das Proliferationsverhalten der Klone #61 und #157 bezüglich des zweiten Selektionsmarkers, der Thymidinkinase, untersucht. In Abb.3.23B ist zu sehen, daß der Zellklon #61 bei gleichzeitiger Anwesenheit von Butyrat und GCV (blau) sensitiv für GCV war. Ab Tag 10 konnten keine lebenden Zellen mehr ausgezählt werden. Klon #157 war in gleichzeitiger Anwesenheit von Butyrat ebenfalls sensitiv für GCV. Nach 16 Tagen waren 98.4% der Zellen (bezogen auf die Ganciclovirkontrolle) abgestorben. Der Klon #61 proliferierte im Vergleich zur Klon #157 unter GCV allein langsamer. Aus Abb.3.23B geht hervor, daß die Proliferation der 293-Wildtypzellen in der Kombination von Ganciclovir und Butyrat gehemmt wird. Der additive Effekt von GCV und Butyrat führt zu einem um 77% verminderten Wachstum der 293-Zellen (Tag 11). Diese additiven Effekte müssen auch bei der Bewertung der Klone #61 und #157 berücksichtigt werden.

Die Ergebnisse der durchgeführten Proliferationsassays zeigen, daß die Klone #157 und #61 den gewünschten Phänotyp unter den angegebenen Selektionsbedingungen aufweisen. Sie sind in gleichzeitiger Anwesenheit des HDAC-Inhibitors Butyrat G418-resistent und ohne Butyrat sensitiv für G418. Daß durch Butyrat die Gal4-ETO-vermittelte Repression des doppelten Selektionsmarkers in den Zellklonen wieder aufgehoben werden konnte, zeigten zusätzlich die Wachstumskurven mit Ganciclovir. Beide Klone zeigten in Gegenwart von Butyrat eine doppelt so hohe Sensitivität gegenüber GCV als 293-Wildtypzellen. Verglichen mit Klon #157 wird die transkriptionelle Repression des tkneo-Gens bei Klon #61 schneller durch Butyrat aufgehoben. Dies zeigt sich sowohl in der Wachstumsanalyse unter G418 als auch unter GCV. In weiteren Untersuchungen soll gezeigt werden, daß die Repression des tkneo-Gens tatsächlich durch Gal4-ETO und nicht durch andere zelluläre Mechanismen (z.B. eine von ETO unabhängige Acetylierung und Methylierung der Promotor-Sequenzen) vermittelt wird, die durch das Butyrat aufgehoben werden.

3.2.2.4.5. Wachstumskinetik nach Konkurrenz des Gal4-ETO-Proteins vom tkneo-Reporterkonstrukt

In einem Konkurrenz-Experiment soll gezeigt werden, daß die transkriptionelle Repression des tkneo-Selektionsmarkers spezifisch durch Gal4-ETO vermittelt wird. Hierfür wird die Gal4-DNA-Bindungsdomänen (Gal4-DBD) in den Klonen #61 und #157 koexprimiert. Die exprimierten Gal4-DBD sollen die Gal4-DNA-Bindungsstellen (2xUAS) im tkneo-Reporterkonstrukt besetzen. Dadurch wird die Bindung des Gal4-ETO-Proteins im Reporterkonstrukt spezifisch blockiert und die ETO-vermittelte Repression indirekt aufgehoben. Da sich eine G418-Selektion über einen Zeitraum von mindestens 10 Tagen erstreckt, war die stabile Expression der Gal4-DBD eine wichtige Voraussetzung. Hierfür wurden beide Zellklone mit einem retroviralen Vektor (Abb. 3.24), der für die Gal4-DBD kodierte, transduziert. Das Konstrukt verfügt über ein IRES-Element („internal ribosomal entry site“), das zwischen dem Gal4-DBD- und dem EGFP-Markergen liegt. Die Expression wird von der 5'LTR angetrieben, wobei das IRES-Element die Translation beider Gene von der selben mRNA ermöglicht. Bei der Translation können die Ribosomen über das IRES-Element vor der GFP-Sequenz an der mRNA binden. Als Kontrolle wurden die Klone mit dem retroviralen Konstrukt transduziert, das lediglich über das IRES-GFP-Element verfügt.

Konstruktion des retroviralen Konstrukts zur stabilen Expression der Gal4-DBD

Die Gal4-DBD wurde über eine Dreifragment-Ligation in den retroviralen Vektor MA142-IRES/GFP kloniert. Hierfür wurde die Gal4-DBD (470 bp) über 5' NotI/ 3' Sall aus dem pCMX-Gal4-Vektor isoliert. Aufgrund der NotI-Schnittstelle in der IRES-Sequenz konnte der MA142-IRES/GFP-Vektor nicht direkt über die 5' NotI/ 3' Sall-Schnittstellen zwischen 5'LTR und der IRES geöffnet werden. Um NotI in der IRES-Sequenz zu umgehen, wurden die Fragmente 5' NdeI/ 3' NotI (Abb. 3.24a.; 1.4 kbp) und 5' Sall/ 3' NdeI (Abb. 3.24b.; 6.0 kbp) einzeln aus dem MA142-IRES/GFP-Vektor isoliert. Anschließend wurde das Gal4-DBD-Fragment mit den beiden Fragmenten des retroviralen Vektors MA142-IRES/GFP ligiert.

Die am 3'-Ende der Gal4-Sequenz verwendete Sall-Schnittstelle wird üblicherweise zur Klonierung von Gal4-Fusionsgenen genutzt, weswegen die Gal4-Sequenz kein Stopkodon enthält. Nach beschriebener Klonierung der Gal4-Sequenz in den MA142-IRES/GFP-Vektor folgt das erste im selben Leserahmen vorkommende Stopkodon nach 123 Basen.

Dies hat zur Folge, daß das Gal4-Protein nach Expression vom MAGal4-IRES/GFP-Konstrukt 4.1 kDa größer ist.

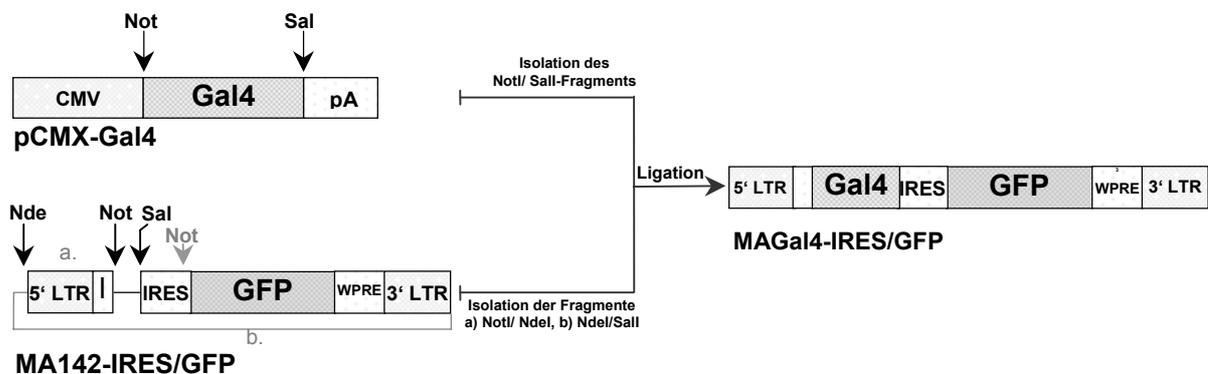


Abb. 3.24. Konstruktion des retroviralen Vektors MAGal4-IRES/GFP. Erläuterungen im Text. CMV = CMV-Promotor des Cytomegalievirus; Gal4 = Gal4-DNA-bindende-Domäne; pA = poly A-Signal; 5'- und 3'-LTR („long terminal repeats“) aus dem Moloney-Maus-Leukämie-Virus; IRES = („internal ribosomal entry site“); GFP = „green fluorescence protein“; WPRE = posttranskriptionelles Element aus dem „woodchuck“ Hepatitis-Virus.

Nachweis der Gal4-DBD Expression und Transduktion der Klone #61 und #157.

Die Expression der Gal4-DBD wurde in einer Western-Blot-Analyse (Abb. 3.25) überprüft. Hierfür wurden 293T-Verpackungszellen mit dem MAGal4-IRES/GFP-Konstrukt transient transfiziert. Die Expression ist aufgrund der transfizierten Plasmidmenge höher als in den mit dem entsprechenden Virusüberstand transduzierten Zellen und deshalb leichter nachzuweisen. Der Immunoblot wurde mit einem α -Gal4-Antikörper durchgeführt. Die Western-Blot-Analyse zeigt, daß die Gal4-DBD nach Transfektion des MAGal4-IRES/GFP-Vektors exprimiert wird. Aufgrund der in 3.2.2.4.5 beschriebenen Klonierungsstrategie ist das Gal4-Protein 4.1 kDa größer.

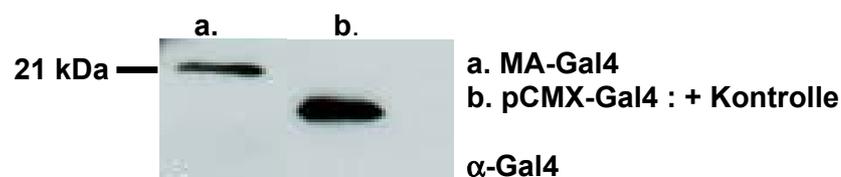


Abb. 3.23. Western-Blot-Analyse zum Nachweis der Gal4-Expression des retroviralen Vektors MAGal4-IRES/GFP. Für die Western-Blot-Analyse wurden transient mit dem Vektor MAGal4-IRES/GFP (a.) bzw. mit dem pCMX-Gal4-Vektor transfizierte 293T-Zellen (b.) verwendet. Der Immunoblot wurde mit einem α -Gal4-Antikörper durchgeführt.

Nachdem die Klone #61 und #157 mehrmals mit dem retroviralen MAGal4-DBD-Konstrukt und dem Kontrollvektor MA142-IRES/GFP transduziert worden waren, wurde der Anteil GFP-positiver und somit transduzierter Zellen in einer FACS-Analyse bestimmt. Hierbei waren 98.2% der mit dem MAGal4-IRES/GFP-Vektor transduzierten 293-Zellen des Klons #157 und 64.2% der Zellen des Klons #61 GFP-positiv. Die Transduktionsraten mit dem Kontrollvektor MA142-IRES/GFP lagen bei 96.6% (#157) und 70.2% (#61). In Abb. 3.26 sind die FACS-Analysen der Klone #61 und #157 abgebildet. Die gemessenen Ereignisse wurden auf der X-Achse nach Fluoreszenz-Intensität (GFP) und auf der Y-Achse nach ihrer Granularität aufgetrennt. Der prozentuale Anteil der GFP-positiven Zellen wurde anhand nicht-transduzierter 293-Zellen definiert. In Abb. 3.26 sind von links nach rechts die Messungen nicht-transduzierter, der mit dem Kontrollvektor und mit dem Gal4-Vektor transduzierter 293-Zellen abgebildet.

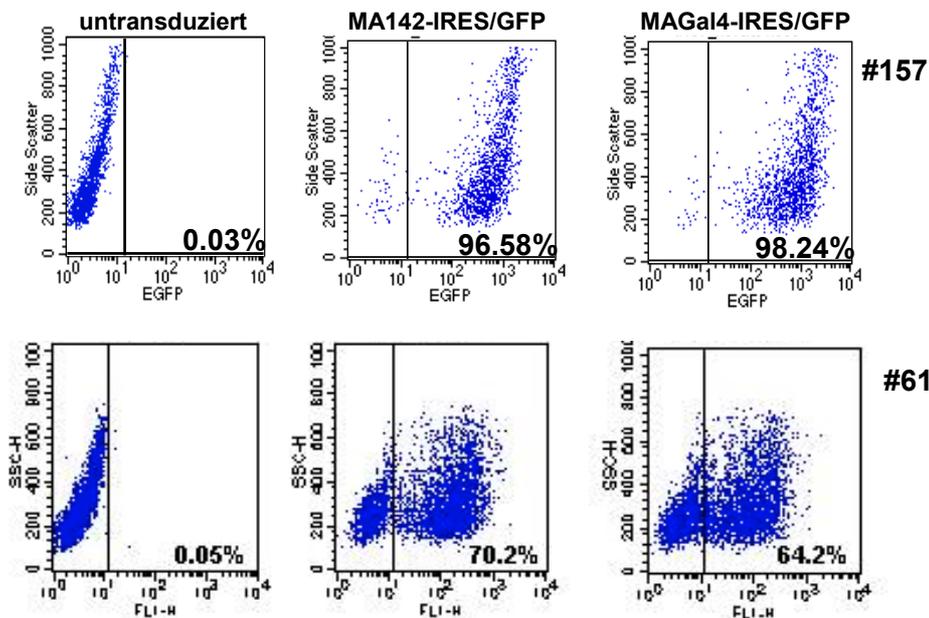


Abb. 3.26. FACS-Analyse der Klone #61 und #157 nach Transduktion mit den Vektoren MA142-IRES/GFP und MAGal4-IRES/GFP. Um zu zeigen, daß die transkriptionelle Repression des tkneo-Gens spezifisch durch das Gal4-ETO-Protein vermittelt wird, wurde ein Wettbewerbsversuch durchgeführt. Durch die Koexpression der Gal4-DBD soll das Gal4-ETO-Protein von den Gal4-DNA-Bindungsstellen (2xUAS) im tkneo-Reporterkonstrukt kompetitiert werden. Hierfür wurden beide Zellklone mit einem retroviralen Vektor (MAGal4-IRES/GFP), der für die Gal4-DBD kodierte, transduziert. Zusätzlich wurden die Klone mit dem retroviralen Kontrollvektor (MA142-IRES/GFP) transduziert, welcher lediglich über das IRES-GFP-Element verfügt. Um die prozentualen Anteile der GFP-positiven 293-Zellen zu bestimmen, wurden die gemessenen Ereignisse auf der X-Achse nach Fluoreszenz-Intensität (GFP) und auf der Y-Achse nach ihrer Granularität aufgetrennt. Die prozentualen-Anteile der GFP-positiven Zellen wurde über nicht-transduzierte 293-Zellen definiert. Von links nach rechts sind die Messungen der nicht-, der mit dem MA142-IRES/GFP und der mit dem MAGal4-IRES/GFP-Vektor transduzierten 293-Zellen abgebildet.

Das Gal4-Protein konnte nach Transfektion des MAGal4-IRES/GFP-Konstrukts in 293T-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.25). Da für die Translation des in den transduzierten 293-Zellen gemessenen GFP-Proteins und dem Gal4-Protein dieselbe mRNA vorliegt, sollte in allen GFP-positiven 293-Zellen auch die Gal4-DBD exprimiert werden. Die Effekte der Gal4-Expression in den Klonen #61 und #157 wurde in einem Wachstumsassay untersucht (Abb. 3.27).

Wachstumskinetik der Klone #61 und #157 nach Koexpression der Gal4-DBD

Durch die Koexpression der Gal4-DBD in den Klonen #61 und #157 soll ausgeschlossen werden, daß die transkriptionelle Repression des tkneo-Gens durch andere zelluläre Mechanismen wie z.B. eine von ETO unabhängige Acetylierung und Methylierung der Promotor-Sequenzen vermittelt wird. Ziel ist es, die ETO-vermittelte Repression des tkneo-Selektionsmarkers in den Klonen #61 und #157 spezifisch aufzuheben. Dies bedeutet, daß die Gal4-exprimierenden Klone G418-resistent werden, wohingegen die mit dem Kontrollvektor transduzierten 293-Zellen G418-sensitiv bleiben. Die Expression eines ETO-inhibierenden Peptids hätte bei Selektion einer Peptid-Bibliothek denselben Effekt auf das Wachstumsverhalten eines Klons unter G418.

In Abb 3.27 ist das Proliferationsverhalten der transduzierten Zellklone #61 und #157 unter G418 abgebildet. Die 293-Zellen wurden während des Assays in 24-Napfplatten kultiviert und alle zwei bis drei Tage mittels Trypanblaufärbung ausgezählt, wobei je Bedingung eine Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

Beide Gal4-exprimierenden Zellklone proliferierten unter G418 (grün), während die mit dem Kontrollvektor transduzierten Zellen sensitiv für G418 waren (blau). Verglichen mit der Mediumkontrolle (rot), erreichte Klon #61-MAGal4-IRES/GFP die exponentielle Wachstumsphase unter G418 mit einer Verzögerung von 2 Tagen. Die Plateauphase wurde sowohl unter Medium als auch unter G418 zwischen Tag 7 und 8 erreicht, wobei die maximale Zellzahl je 24er-Napf unter G418 (8×10^5) etwas niedriger war als in der Mediumkontrolle (1.3×10^6). Klon #157-MAGal4-IRES/GFP proliferierte unter G418-haltigem Medium bis zu Tag 4 genauso stark wie die Zellen der Mediumkontrolle. Ab Tag 4 war die Proliferationsrate unter G418 zwar vermindert, dennoch wurde bis Tag 9 eine Zellzahl von 5.5×10^5 Zellen je 24-Napf erreicht.

Das Proliferationsverhalten der mit dem Kontrollvektor MA142-IRES/GFP transduzierten 293-Zellklone #61-MA142-IRES/GFP und #157-MA142-IRES/GFP unter G418-haltigem Medium war mit den Daten von bereits ermittelten Kurven anderer

Proliferationsassays vergleichbar (Kapitel 2.1.3.; Abb. 3.23). Nach 10 Tagen bzw. 8 Tagen waren bei Klon #61-MA142 und Klon #157-MA142 alle Zellen unter G418 gestorben.

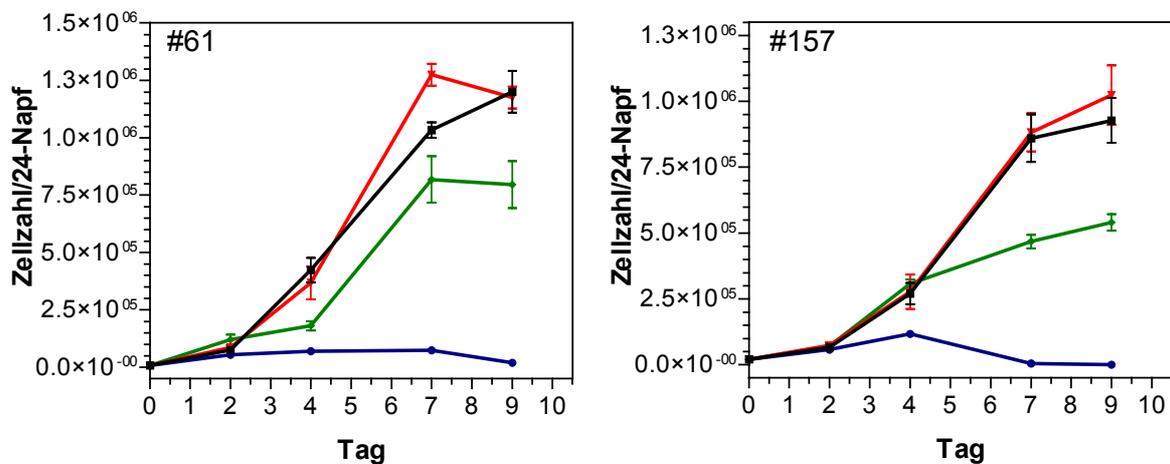


Abb. 3.27. Wachstumskinetik der mit MA142-IRES/GFP- bzw. MA142/Gal4 transduzierten 293-Zellklone #61 und #157 unter G418. In einem Konkurrenzexperiment soll die ETO-vermittelte Repression des tkneo-Gens durch die Koexpression der Gal4-DBD aufgehoben werden. Hiermit wird gezeigt, daß die Repression des Selektionsmarkers ETO-spezifisch ist. Die Klone #61 und #157 wurden hierfür mit dem retroviralen MAGal4-IRES/GFP-Konstrukt und dem Kontrollvektor MA142-IRES/GFP transduziert. Wird die Repression durch Gal4 aufgehoben, proliferieren die Klone in Anwesenheit von G418 (grüne Linien). Wurden die Klone mit dem Kontrollvektor transduziert, bleiben sie sensitiv für G418 (blaue Linie). Die transduzierten Klone wurden parallel in Medium ohne Zusätze kultiviert (rote Linie; MAGal4-IRES/GFP und schwarze Linie; MA142-IRES/GFP). Es wurden je 1×10^4 Zellen in 24-Napfplatten ausgesät, wobei je Bedingung eine Doppelbestimmung durchgeführt wurde. Die Selektion wurde bei $400 \mu\text{g/ml}$ G418 durchgeführt. Die Zellzahl wurde mittels Trypanblaufärbung bestimmt, jeder Ansatz wurde doppelt ausgezählt. Die Zellzahlen sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben.

Die Koexpression der Gal4-DBD führt in den stabilen Zellklonen #61 und #157 zu erhöhten mRNA-Spiegeln des tkneo-Selektionsmarkers

Zur Kompetition des Gal4-ETO-Proteins wurden die Zellklone #61 und #157 mit einem retroviralen Gal4-DBD-Konstrukt transduziert. Die Expression der Gal4-DBD führte, wie im letzten Abschnitt beschrieben, zur Aufhebung der Gal4-ETO vermittelten Repression des tkneo-Markers und somit zur tkneo-Expression und G418-Resistenz der Zellen. In einer RT-PCR-Analyse wurde zusätzlich gezeigt, daß die in die G418-Resistenz der etablierten Klone #61 und #157 nach Koexpression der Gal4-DBD auf die Expression des tkneo-Selektionsmarkers zurückzuführen war.

Hierfür wurde die RNA der mit dem Vektor MAGal4-IRES/GFP transduzierten Klone #61 und #157 verwendet. Parallel wurde die RNAs beider Klone eingesetzt, die lediglich

mit dem Kontrollvektor MA142-IRES/GFP transduziert waren. In Abb. 3.28 (+RT) sind die PCR-Produkte für tkneo in den Proben der mit dem Gal4-Vektor transduzierten Klone #61 und #157 (+Gal4; +RT) zu sehen. Als Positivkontrolle wurde RNA der 293-Zelllinie, die stabil mit dem tkneo-Reporterkonstrukt transfiziert ist, verwendet. Zur internen Kontrolle der eingesetzten RNA-Mengen wurde parallel zu allen Ansätzen eine β -Actin-PCR durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde RNA von 293wt-Zellen verwendet. Um PCR-Signale durch eine DNA-Kontamination der RNA-Proben auszuschließen, wurden diese zusätzlich nach einem RT-Schritt, der ohne Reverse-Transkriptase durchgeführt wurde (-RT), in PCR-Reaktionen eingesetzt.

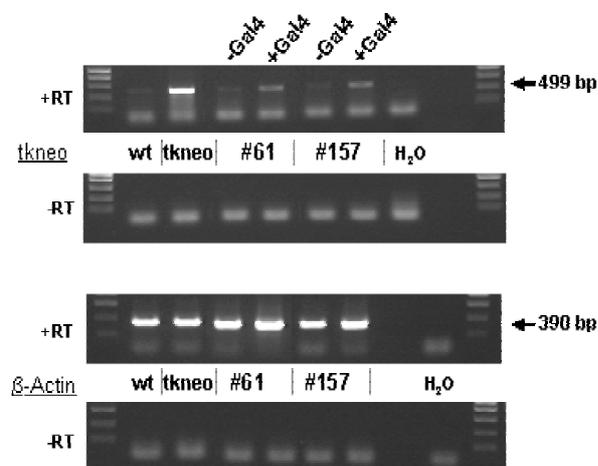


Abb. 3.28. Nachweis der tkneo-mRNA-Expression in den Klonen #61 und #157 nach Koexpression der Gal4-DBD mittels RT-PCR. In Wachstumsanalysen konnte gezeigt werden, daß die Koexpression der Gal4-DBD in den Klonen #61 und #157 zur G418-Resistenz führt. Hierbei konkurriert die Gal4-DBD mit Gal4-ETO um die DNA-Bindungsstelle im tkneo-Reporterkonstrukt. Die RT-PCR-Analysen bestätigten, daß die G418-Resistenz der mit dem Gal4-Vektor transduzierten Klone (+Gal4) zur Expression der tkneo-mRNA führt, die in den mit dem Kontrollvektor transduzierten Klone nicht vorhanden ist (-Gal4). Als Positivkontrolle wurde RNA der stabil mit dem tkneo-Reporterkonstrukt transfizierten Zelllinie eingesetzt. Die PCR-Analyse wurde für tkneo und zur internen Kontrolle der eingesetzten RNA-Mengen für β -Actin durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden 293wt-Zellen verwendet. +RT : mit Reverse Transkriptase; -RT : ohne Reverse Transkriptase.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Klone nach Koexpression der Gal4-DBD in G418-haltigem Medium proliferierten. Dies bedeutet, daß die transkriptionelle Repression des tkneo-Gens in den Klonen #61 und #157 spezifisch durch Gal4-ETO vermittelt wurde. Wie in Kap. 3.2.2.4.4 beschrieben, wurde die transkriptionelle Repression bereits unter Einsatz des HDAC-Inhibitors Butyrat aufgehoben. Das Proliferationsverhalten von Klon #61 ist unter Butyrat oder nach Koexpression von Gal4 in G418-haltigem Medium

vergleichbar. Der Klon #157-MAGal4-IRES/GFP proliferierte unter G418-haltigen Medium langsamer als Klon #61-MAGal4-IRES/GFP. Dies war auch in den Wachstumsassays unter Butyrat der Fall. Somit erfüllen beide Klone (#61 und #157) folgende Kriterien:

- Das Reporterkonstrukt pGKL-tkneo und das Repressorplasmid Gal4-ETO sind stabil in das Genom integriert.
- Die Gal4-ETO-mRNA wird exprimiert; die Expression des Proteins konnte zusätzlich in Klon #157 nachgewiesen werden.
- Die Zellen sind G418-sensitiv und in Anwesenheit von Butyrat G418-resistent.
- Die Zellen sind GCV-resistent und in Anwesenheit von Butyrat GCV-sensitiv.
- Die transkriptionelle Repression des tkneo-Gens kann durch Koexpression der Gal4-DBD aufgehoben werden.

Die Klone #61 und #157 können somit zukünftig zur Selektion ETO-inhibierender Peptide eingesetzt werden.

4. Diskussion

Die onkogene Aktivität von AML1/ETO kann in verschiedenen Ansätzen gehemmt werden

Die Translokation t(8;21) und das daraus resultierende Fusionsprotein AML1/ETO liegen bei 12% aller Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie (AML) vor. AML1/ETO rekrutiert über den ETO-Anteil einen aktiven Korepressorkomplex, der N-CoR, mSin3A und Histondeacetylasen enthält, und führt so zur transkriptionellen Repression von AML1-Zielgenen. Darüber hinaus wurde kürzlich gezeigt, daß AML1/ETO über eine direkte Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren wie SMAD3 oder C/EBP α auch die Expression AML1-unabhängiger Zielgene beeinflusst [Pabst et al., 2001; Westendorf et al. 1998]. Das AML1/ETO-Protein führt in hämatopoetischen Zellen zu einem Differenzierungsblock, erhöht das Selbsterneuerungspotential hämatopoetischer Stammzellen und trägt so zur Leukämieentstehung bei [Mulloy et al., 2002; Rhoades et al., 2000; Westendorf et al., 1998].

Die AML1/ETO-vermittelte transkriptionelle Repression wurde bereits unter Einsatz von HDAC-Inhibitoren aufgehoben. Mittlerweile gibt es eine Reihe von Substanzen, welche die Aktivität von Histon-Deacetylasen *in vitro* und/ oder *in vivo* hemmen. Bei Kasumi-1-Zellen, die das AML1/ETO-Fusionsprotein exprimieren, konnte durch den HDAC-Inhibitor Phenylbutyrat eine partielle Differenzierung und Apoptose erreicht werden [Wang et al., 1999]. Im Fall einer Patientin mit einer akuten promyelozytären Leukämie mit der Translokation PML/RAR α [t(15;17)] führte die Behandlung mit Phenylbutyrat in der Kombination mit Vitamin A zur vollständigen Eliminierung der leukämischen Blasten [Warrell et al., 1998]. Ähnlich wie bei AML1/ETO werden vom PML-Anteil des Fusionsproteins PML/RAR α nukleäre Korepressoren rekrutiert, die über Histon-Deacetylasen zur transkriptionellen Repression der für die Differenzierung wichtigen Zielgene des Retinsäurerezeptors RAR α führen. Vergleichbar erfolgreich könnte zukünftig auch eine Behandlung der AML1/ETO-Leukämien aussehen.

Noch stellt aber die niedrige Bioverfügbarkeit der HDAC-Inhibitoren ein Problem in der klinischen Anwendung dar. Die extrem kurze Halbwertszeit erschwert den Einsatz der HDAC-Inhibitoren, die *in vivo* in hohen Dosen eingesetzt werden müssen, um therapeutische Effekte erzielen zu können [Krämer et al., 2001; Qiu et al., 1999; Newmark et al., 1995]. Die Butyratderivate sind außerdem nicht spezifisch für Histon-Deacetylasen, denn sie beeinflussen zusätzlich die DNA-Methylierung und inhibieren die Phosphorylierung und Methylierung nukleärer Proteine [Krämer et al., 2001; Archer et al., 1999]. Andere HDAC-Inhibitoren wie TSA (Trichostatin A) oder Trapoxin wirken zwar

weitaus spezifischer, haben aber eine hohe Toxizität [Krämer et al., 2001]. Dennoch liegt in der Weiter- und Neuentwicklung von HDAC-Inhibitoren ein Potential für eine zukünftige klinische Anwendung.

Die Funktion von AML1/ETO konnte neben dem Einsatz von HDAC-Inhibitoren zusätzlich durch spezifische „Antisense“- oder „siRNAs“ (small interfering RNAs) *in vitro* inhibiert werden [Heidenreich et al., 2002; Szyrach et al., 2001; Sakakura et al., 1994]. Kasumi-1-Zellen, in denen die AML1/ETO-Expression durch siRNA blockiert wurde, konnten in der Anwesenheit von TGF β und Vitamin D₃ wieder differenziert werden. Darüber hinaus war das Koloniewachstum der AML1/ETO-exprimierenden hämatopoetischen Zellen im Agar stark vermindert [Heidenreich et al., 2002]. Unter Einsatz der siRNA-Technologie konnte die Wirkung von AML1/ETO sehr spezifisch unterbunden werden. Allerdings muß in den nächsten Jahren noch geklärt werden, wie siRNAs therapeutisch verabreicht werden können. Hierbei spielen vor allem die Bioverfügbarkeit und das gezielte Einschleusen der siRNA in die gewünschte Zellpopulation eine entscheidende Rolle.

Neben der Funktion von AML1/ETO als direkten Korepressor werden durch die bereits erwähnten Interaktionen des Fusionsproteins mit weiteren Transkriptionsfaktoren möglicherweise eine Reihe von Signaltransduktionswegen beeinflusst, wodurch es indirekt ebenfalls zu einer dysregulierten Genexpression kommen kann. Diesbezüglich wurde gezeigt, daß die Expression von AML1/ETO in TF-1-Zellen zu einer verstärkten Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT5 führt. Auch für die Zelllinie Kasumi-1 wurde eine verstärkte Phosphorylierung des STAT5-Proteins beschrieben [Spiekermann et al., 2001]. Die STAT-Moleküle liegen im Zytoplasma als inaktive Transkriptionsfaktoren vor. Nach Bindung über ihre SH2-Domäne an Phosphotyrosin-Motive aktivierter Zytokinrezeptoren werden sie von assoziierten JAKs (Januskinasen) spezifisch an einem Tyrosin im C-terminalen Bereich phosphoryliert [Barber et al., 2001]. Die phosphorylierten STAT-Moleküle bilden über eine reziproke Interaktion zwischen dem Phosphotyrosin im C-terminalen Bereich und der SH2-Domäne Homo- und Heterodimere. Die Dimere werden anschließend in den Kern transloziert, wo sie die Transkription spezifischer Gene aktivieren [Ehret et al., 2001; Hoey et al., 1998; Ihle et al., 1996].

Um die biologische Wirkung der vermehrten STAT5-Aktivität in den AML1/ETO-transformierten TF-1-Zellen zu untersuchen, wurde ein Peptid entwickelt, welches STAT5 hemmen sollte. Dieses Peptid bestand aus einem insgesamt 8 Aminosäuren umfassenden Motiv um das C-terminale Tyrosin Y694 des STAT5-Proteins (AVDGY(phos)VKPKQ), das im Phosphopeptid phosphoryliert ist. Im Kontrollpeptid liegt das Tyrosin unphosphoryliert vor und kann somit nicht mit der SH2-Domäne eines Signalproteins (STAT5) interagieren. Über den phosphorylierten Tyrosinrest soll das Peptid kompetitiv an die SH2-Domäne

eines STAT5-Moleküls binden, um dessen reziproke Dimerisierung mit einem weiteren STAT-Molekül zu verhindern. Die Dimerisierung der STAT-Moleküle ist Voraussetzung für den Transport in den Zellkern und die anschließende Bindung an STAT5 spezifische DNA-Sequenzen. Fagerlund et al. untersuchten den Transport von STAT-Molekülen in den Zellkern und zeigten, daß Importin $\alpha 5$ lediglich mit einem STAT-Dimer interagiert, um den Transport in den Zellkern zu vermitteln. STAT1-Moleküle, die über ein mutiertes Tyrosin verfügten, wurden nicht phosphoryliert und lagen als Monomere vor, die nicht in den Zellkern transportiert wurden [Fagerlund et al., 2002, McBride et al., 2002; Melen et al., 2001]. Somit stellt die Hemmung der Dimerisierung einen vielversprechenden Ansatz dar, um den Transport der STAT5-Moleküle in den Kern zu blockieren und somit die Transkription STAT5-abhängiger Gene zu inhibieren.

In Kolonieassays konnte das Wachstum AML1/ETO-transformierter TF-1-Zellen und von Kasumi-1-Zellen spezifisch durch das STAT5-Phosphopeptid gehemmt werden. Das Phosphopeptid hatte jedoch keinen Einfluß auf das Wachstum normaler CD34⁺-Zellen. Es war interessant zu klären, ob das Phosphopeptid zusätzlich mit den SH2-Domänen anderer Signalproteinen interagiert und somit über unterschiedliche Wirkmechanismen zum Wachstumsarrest der AML1/ETO-transformierten Zellen führt.

SH2- und SH3-Domänen sind Bestandteile vieler Proteine, die an der intrazellulären Signalübertragung beteiligt sind. Die etwa 100 Aminosäuren umfassende SH2-Domäne bindet an Phosphotyrosinreste, die in charakteristische Aminosäuresequenz-Motive eingebettet sind. Die Blockierung solcher SH2- und SH3-Domänen besitzt interessante Konsequenzen. Zum einen können gezielt Signalwege blockiert werden, die z.B. in transformierten Zellen konstitutiv aktiviert sind. Zum anderen kann durch die Blockade eines Zielproteins dessen Signalweg untersucht werden [Kardinal et al., 2001; Gibbs et al., 1994].

Die Bindungsspezifität des synthetischen Phosphopeptids an solch eine SH-Domäne wird vor allem von den direkt auf das Phosphotyrosin folgenden Aminosäuren beeinflusst [Marengere et al., 1994; Birge et al., 1993; Songyang et al., 1993]. Basierend auf den Ergebnissen von Songyang et al., die unter Einsatz einer degenerierten Phosphopeptid-Bibliothek die Bindungsspezifität verschiedener SH2-Domänen untersucht haben, wurde eine Auswahl an zu testenden SH2-Domänen verschiedener Signalproteine getroffen. Songyang et al. beschreiben hierbei eine Interaktion von Phosphotyrosin-Peptiden, die wie das STAT5-Phosphopeptid über ein Y(phos)xxP Aminosäuresequenz-Motiv verfügen, mit den SH2-Domänen aus Abl, Crk, SHP, Src, PI3K.p85 und PLC γ . In Zusammenarbeit mit Dr. Stephan Feller von der Universität Würzburg wurden zusätzlich die SH2-Domänen von Fer, Fyn und Grb2 und CrkL getestet. In „Pull-down“-Experimenten konnte zwar eine spezifische Interaktion des Phosphopeptids mit den GST-SH2-Domänen aus CrkL, Crk,

Fyn, PI3K und PLC γ nachgewiesen werden (Kapitel 3.1.1). Als Zielmolekül des Phosphopeptids der entsprechenden nativen Signalproteine wurde aber allein PLC γ der Kasumi-1-Zellen identifiziert (Kapitel 3.1.2). Diese Interaktion konnte für JK-1-Zellen, die im Gegensatz zu Kasumi-1-Zellen das Fusionsprotein Bcr/Abl exprimieren, nicht nachgewiesen werden. Dies bedeutet, daß die Interaktion des Phosphopeptids mit PLC γ spezifisch für AML1/ETO-transformierte Zellen war.

Die spezifische Bindung des Phosphopeptids an STAT5 konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise besitzt das aus STAT5 abgeleitete Phosphopeptid eine zu geringe Affinität zur SH2-Domäne des STAT5-Moleküls. Es gibt Hinweise dafür, daß die Dimerisierung und somit die Bindung zwischen Phosphotyrosin und SH2-Domäne durch die "coiled-coil"-Domäne stabilisiert wird [Zhang T et al., 2000; Greenlund et al., 1995]. Dies würde bedeuten, daß die Bindung des Phosphopeptids (AVDGY(phos)VKPQ) an die STAT5-Moleküle aufgrund fehlender Stabilisierung nur sehr schwach ist. Darüber hinaus stellten Sasse et al. fest, daß STAT3-Moleküle, in denen die auf das Phosphotyrosin folgenden Aminosäuren 5 und 6 mutiert waren, keine Dimere bildeten. Somit scheint insbesondere bei der Dimerisierung von STAT-Molekülen die Bindung der SH2-Domäne zusätzlich durch die um die spezifische Erkennungssequenz liegenden Aminosäuren stark beeinflusst zu werden

Die Hemmung des Koloniewachstums der AML1/ETO-transformierten TF-1 und Kasumi-1-Zellen ist somit wahrscheinlich nicht auf eine direkte Inhibierung der STAT5-Aktivität zurückzuführen. Als ein Zielmolekül des Phosphopeptids wurde PLC γ identifiziert. PLC γ spielt eine zentrale Rolle in der Signalkaskade vieler extrazellulärer Stimuli und ist ein interessantes Zielprotein. Der Aktivierung der PLC γ über Proteinkinasen folgt die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu 1,4,5-trisphosphat (IP $_3$) und Diacylglycerol (DAG). Hierbei führen IP $_3$ zum Anstieg des intrazellulären Ca $^{2+}$ -Spiegels und DAG zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC). Somit stellt PLC γ mit der Produktion dieser „second messenger“ eines der frühesten Signale in der Signalkaskade der Zelle dar. Eine konstitutive Aktivierung und die Überexpression von PLC γ haben in Zellen transformierende Eigenschaften [Smith et al., 1998; DeMali et al., 1997; Whitehead et al., 1995]. Studien in denen eine erhöhte PLC γ -Expression in Brust- und Kolonkarzinomen gefunden wurde, deuten auf die onkogenen Eigenschaften der Phospholipase C γ hin [Lee et al., 1995; Arteaga et al., 1991].

Um die Rolle von PLC γ in AML1/ETO-exprimierenden hämatopoetischen Zellen zu klären, wurden unter anderem die Expressionsstärke und der Phosphorylierungsstatus des PLC γ -Proteins untersucht. In den entsprechenden Immunoblot-Analysen konnte keine deutlich erhöhte PLC γ -Expression in AML1/ETO-transformierten Zelllinien nachgewiesen werden. Zudem zeigten die Kasumi-1-Zellen keine konstitutive Phosphorylierung von

PLC γ , was auf eine verstärkte Aktivität hingedeutet hätte. Um zu untersuchen, ob die Proliferation AML1/ETO-transformierter Zellen dennoch von PLC γ abhängig war, wurden zusätzlich die chemischen Inhibitoren U73122 und Compound 48/80 verwendet, um die PLC γ -Aktivität zu hemmen. Der Nachteil dieser chemischen Inhibitoren lag darin, daß sie nicht spezifisch wirken und im Gegensatz zum Phosphopeptid neben der PLC γ -Aktivität weitere zelluläre Prozesse beeinflussen (z.B. Aktivierung von G-Proteinen, Freisetzung von Arachidonsäure, Inhibierung von ADP-Ribosylierung). Durch keinen der PLC γ -Inhibitoren wurde im Kolonieassay das Wachstum AML1/ETO-transformierter NIH3T3-Zellen oder TF-1-Zellen spezifisch inhibiert. Darüber hinaus lösten die Substanzen keine vermehrte Apoptose oder Zelltod in den AML1/ETO-exprimierenden Zellen aus. Damit erscheint es unwahrscheinlich, daß die Proliferation der AML1/ETO-transformierten TF-1- und Kasumi-1-Zellen in den Kolonieassays von PLC γ abhängig ist.

Das Phosphopeptid hemmte hingegen sehr spezifisch das Wachstum AML1/ETO-exprimierender Zelllinien. Die Proliferation der Kontrollzellen wurde nicht durch das Phosphopeptid vermindert. Dies deutet darauf hin, daß das Phosphopeptid einen AML1/ETO-spezifischen Signalweg hemmte, der jedoch nicht genau charakterisiert werden konnte. Die von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) synthetisierten Peptide unterlagen großen Qualitätsschwankungen, die vor allem das Phosphopeptid betrafen. Die Synthese bereitete aufgrund der Phosphatgruppe größere Schwierigkeiten, so daß die Experimente nicht beliebig oft wiederholt werden konnten.

In den „Pull-down“-Experimenten wurden alle SH2-Domänen getestet, die aufgrund ihrer beschriebenen Bindungsspezifität für das Phosphotyrosinmuster an das Phosphopeptid binden. Die Entwicklung der Protein-Mikroarray-Technologie würde es inzwischen ermöglichen, nach weiteren Zielmolekülen des Phosphopeptids zu suchen [Espejo et al., 2002; Tong et al., 2002; Zhu et al., 2001; MacBeath et al., 2000]. Basierend auf den Versuchen von Espejo et al., (2002) könnte eine Vielzahl von SH2-Domänen gleichzeitig untersucht werden. In dieser Arbeit wurden verschiedene SH2- und SH3-Domänen als GST-Fusionsproteine exprimiert und unter Einsatz eines Roboters auf einer mit Nitrozellulose beschichteten Glasplatte fixiert. Fand eine Interaktion zwischen biotinyliertem Peptid und einer fixierten SH-Domäne statt, wurde das gebundene Peptid unter Einsatz eines Cy3-Streptavidinkonjugats nachgewiesen. Die Fluoreszenz-Signale des Cy3-Farbstoffs wurden automatisch von einem Meßgerät erfaßt und ausgewertet. Inzwischen werden von der Firma Panomics (Californien/ USA) solche Protein-Mikroarray-Platten, auf denen 38 SH3-Domänen aus verschiedenen Signalproteinen fixiert sind, angeboten. Für SH2-Domänen sind entsprechende Protein-Mikroarray-Platten noch nicht käuflich und müßten selbst mit einer Sammlung an SH2-Domänen hergestellt werden.

Sowohl das Phosphopeptid als auch eine Mikroarray-Platte mit verschiedenen SH2-Domänen standen zur Weiterführung des Projekts nicht zur Verfügung.

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit bestand darin, Peptide zu finden, die in der Lage sind, die transformierenden Eigenschaften in AML1/ETO-exprimierenden Zellen spezifisch zu blockieren. Hierfür wurden zwei Selektionssysteme aufgebaut, mit welchen solche ETO-inhibierende Peptide aus einer hochkomplexen Peptid-Bibliothek identifiziert werden sollen. Grundsätzlich kann ein solches Selektionssystem auf einer Peptid-"RNA/DNA-Display"-, einer "Phage-Display"- oder einer zellulären "Display"-Methode (Hefen und Säugerzellen) basieren, welche je nach Anforderung und Zielsetzung eingesetzt wird. [Li et al., 2000]. Unser Ziel war es, Peptide identifizieren zu können, die entweder über den direkten Kontakt zu ETO den Aufbau des Repressorkomplexes hemmen oder die Interaktion zwischen den Repressormolekülen NCoR, mSin3A und den HDACs behindern und so die ETO-vermittelte transkriptionelle Repression eines Zielgens unterbinden. Das Selektionssystem soll es also ermöglichen, Peptide zu finden, die nicht nur an die Zielproteine binden, sondern gleichzeitig eine physiologische Wirkung zeigen. Da in einem "Yeast-Two-hybrid"-System als auch über die "Phage-Display"-Methode in erster Linie Peptide identifiziert werden, die mit dem „Köder“-Protein (bait) interagieren, basieren die hier etablierten Selektionssysteme nicht auf diesen Methoden. Darüber hinaus würde das ETO-Protein in der "Phage-Display"-Methode extrazellulär für die Durchmusterung einer Peptid-Bibliothek eingesetzt werden, d.h. die Bedingungen wären sehr artifiziell und nicht physiologisch.

Die Selektionssysteme wurden dagegen in einer humanen Zelllinie aufgebaut, in welchem der Mechanismus der ETO-vermittelten Repression genau wider gespiegelt wird (Kapitel 3.2.1 und 3.2.2). Der Vorteil ist, daß die in Säugerzellen exprimierten Proteine alle benötigten posttranslationalen Modifizierungen enthalten die z.B. in der Hefe nur zum Teil durchgeführt werden können. Bei einem "Yeast-two-hybrid"-System muß deshalb immer in Betracht gezogen werden, daß die Zielproteine eventuell nicht korrekt gefaltet werden und sich dadurch von dem in Säugerzellen exprimierten Protein unterscheiden können [Hoppe-Seyler et al., 2001]. Dies kann dazu führen, daß die aus einem Hefe-„Screen“ identifizierten Peptid-Aptamere in humanen Zellen nicht zum erwarteten Effekt führen [Butz et al., 2000].

Basis beider Systeme war ein Gal4-abhängiges Reporterkonstrukt, bei welchem durch Hemmung der ETO-Funktion die Expression eines Reportergens induziert werden soll. Dabei bindet das Gal4-ETO-Protein über seine Gal4-DNA-Bindungsdomäne (Gal4-DBD) an die Gal4-DNA-Bindungsstellen im Promotorbereich des Reporterkonstrukts und rekrutiert über den ETO-Anteil Korepressoren, welche zur transkriptionellen Repression des Reportergens führen. Zur Charakterisierung der repressiven Eigenschaften von

AML1/ETO wurden von zahlreichen Arbeitsgruppen ähnliche Konstrukte genutzt, in denen ein Luziferasegen als Reporter verwendet wurde [Melnick et al., 2000; Wang et al., 1998; Westendorf et al., 1998]. Die Kotransfektion von Gal4-ETO führte dabei zu einer bis zu 80-fach erniedrigten Luziferaseaktivität. Auch innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe wurde ein solches Luziferase-Reporterkonstrukt zur Strukturanalyse von ETO verwendet [Hildebrand et al., 2001]. Basierend auf diesen Erfahrungen wurden ein VSV-G-Reporterkonstrukt und ein tkneo-Reporterkonstrukt etabliert.

Unter Einsatz des VSV-G-Reporterkonstrukts wurde im transienten Selektionssystem die Produktion infektiöser retroviraler Partikel durch das Repressorprotein Gal4-ETO reguliert (Kapitel 3.2.1). Das Gal4-ETO-Protein führte in der Verpackungszelllinie Phoenix-gp zur transkriptionellen Repression des VSV-G-Hüllproteins. Da das Hüllprotein für die Virusproduktion essentiell ist, konnten keine infektiösen viralen Partikel im Überstand geerntet werden. Das Hüllprotein stellte somit den limitierenden Faktor bei der Produktion infektiöser Partikel dar.

Wird die ETO-vermittelte transkriptionelle Repression durch ein Peptid aus der retroviralen Peptid-Bibliothek aufgehoben, kommt es zur Expression des Hüllproteins, und die retroviralen Gensequenzen werden in virale Partikel verpackt. Mit dem geernteten Virusüberstand werden anschließend Zellen transduziert, wobei die transduzierten Zellen anhand des GFP-Markerproteins identifiziert werden können. Um die ETO-vermittelte transkriptionelle Repression des VSV-Gens aufzuheben, wurde bei der Etablierung des Systems zum einen der HDAC-Inhibitor Trichostatin A (TSA) verwendet. Durch TSA wurden die Histon-Deacetylasen in dem durch ETO rekrutierten Korepressorkomplex inhibiert [Yoshida et al., 1990], welche die VSV-G-Expression durch Chromatinmodifikation hemmten. Zum anderen wurde die Gal4-DBD eingesetzt, um die Bindung des Gal4-ETO-Proteins an die Gal4-DNA-Bindungsstellen im Reporterkonstrukt zu verhindern. Durch die Konkurrenz wurde die ETO-vermittelte Repression des VSV-Gens indirekt aufgehoben.

Um zu entscheiden, ob das System für die Durchmusterung einer Peptid-Bibliothek eingesetzt werden kann, mußte geklärt werden, ob die Virusproduktion durch die Koexpression von Gal4-ETO reprimiert werden kann. Hierbei ist besonders wichtig, daß der Hintergrund an viralen Partikeln, die trotz der transkriptionellen Repression des VSV-Gens entstehen, sehr niedrig ist. Ein erhöhter Anteil an falsch positiven Viruspartikeln würde bei der Durchmusterung einer Peptid-Bibliothek die Identifizierung ETO-inhibierender Peptide stark erschweren oder sogar unmöglich machen. Gleichzeitig sollte das System eine hohe Sensitivität für ETO-inhibierende Peptide aufweisen, d.h. es müssen schon geringe Mengen des VSV-G-Proteins ausreichen, um virale Partikel, welche die Sequenzen für ETO-inhibierende Peptide tragen, zu erzeugen.

Die Koexpression von Gal4-ETO führte zu einer drastischen Abnahme der Virusproduktion, die anhand der Transduktionsraten (von 73% auf 0.2% herabgesetzt) bestimmt wurden. Die Repressionsstärke korrelierte dabei mit der transfizierten Menge des Gal4-ETO-Plasmids (Kapitel 3.2.1.3). Die Ergebnisse des Wettbewerbsversuchs und der zugehörigen Western-Blot-Analyse bestätigten, daß die reduzierten Transduktionsraten auf eine spezifische durch Gal4-ETO verminderte VSV-G-Expression zurückzuführen waren (Kapitel 3.2.1.4). In diesem Versuch wurde die Gal4-DNA-Bindende-Domäne eingesetzt, um die Bindungsstellen von Gal4-ETO im VSV-G-Reporterkonstrukt zu blockieren und so die transkriptionelle Repression des VSV-Gens aufzuheben. Die Expressionshöhe von VSV-G korrelierte mit den in der FACS-Analyse bestimmten Transduktionsraten. Der Wettbewerbsversuch verdeutlichte zusätzlich, daß das System sehr stringent war, denn um die ETO-vermittelte Repression aufzuheben, mußte der Kompetitor in einem sehr hohen Verhältnis zu Gal4-ETO kotransfiziert werden.

Die ETO-vermittelte transkriptionelle Repression des VSV-G-Gens konnte teilweise durch Einsatz des HDAC-Inhibitors TSA aufgehoben werden (Kapitel 3.2.1.5.). Hierbei muß allerdings berücksichtigt werden, daß durch TSA auch die Expression anderer Gene in der Verpackungszelllinie wie von *gag* und *pol* gesteigert werden konnten. Dies bedeutet, daß ein Teil der erhöhten Transduktionsrate auf diese Effekte zurückzuführen war [Merezak et al., 2002; Tobias et al., 2000]. Dennoch reichte eine erhöhte Expression der Gene *gag* und *pol* allein nicht aus, um die Transduktionsrate von 18.5% auf 50.5% zu steigern. Dieser Versuch bestätigte nochmals, daß die Expression des VSV-Gens spezifisch durch Gal4-ETO reprimiert wurde und die Virusproduktion nicht über VSV-G-unabhängige Mechanismen negativ beeinflusste.

Je weniger von dem Repressor eingesetzt wurde, desto effektiver konnte die Repression durch Koexpression der Gal4-DBD oder durch den HDAC-Inhibitor TSA aufgehoben werden. Allerdings stieg bei geringeren Gal4-ETO-Mengen auch die Anzahl der Partikel, die trotz der Expression des Gal4-ETO-Proteins gebildet wurden. Bei einer Selektion muß mit einem Hintergrund von mindestens 1.5×10^4 viralen Partikeln je ml gerechnet werden. Dies bedeutet, daß der Anteil der falsch-positiven Viruspartikel bei der Selektion einer Peptid-Bibliothek nach ETO-inhibierenden Peptiden sehr hoch wäre und auch nicht durch mehrere Selektionsrunden vermindert werden könnte. Zusätzlich zeigen die Ergebnisse des Wettbewerbsversuchs, daß die Gal4-DBD in einem hohen Verhältnis zum Gal4-ETO-Konstrukt kotransfiziert werden mußte. Ein ETO-inhibierendes Peptid würde in einer Peptid-Bibliothek wahrscheinlich nicht in einem solch hohem Verhältnis vorliegen.

Aufgrund des hohen Hintergrunds an viralen Partikeln ist die Wahrscheinlichkeit, mit diesem Selektionssystem ein ETO-inhibierendes Peptid aus einer Peptid-Bibliothek zu

identifizieren, sehr gering. Da es dennoch das Ziel war, ein System zu etablieren, mit welchem ETO-inhibierende Peptide identifiziert werden können, wurden die beschriebenen Probleme durch die Etablierung eines weiteren Selektionssystems gelöst (Kapitel 3.2.2). Hierbei handelte es sich um eine HEK-293-Zelllinie, die stabil mit einem tkneo-Reporterkonstrukt und Gal4-ETO transfiziert war. Das tkneo-Gen kodiert für ein Fusionsprotein bestehend aus der Herpes Simplex-Virus I-Thymidinkinase (HSV-TK) und der Neomycin-Phosphotransferase II (Neo). Wurde das Fusionsprotein in 293-Zellen exprimiert, führte die Thymidinkinase in gleichzeitiger Anwesenheit des Nucleosid-Analogons Ganciclovir (GCV) zu deren Tod. Durch die Expression der Neomycin-Phosphotransferase II wurde G418 durch das Enzym über eine Phosphorylierung inaktiviert, wodurch die Zellen trotz G418-Gabe überlebten. Es wurden Zellklone etabliert, in welchen die Expression des tkneo-Gens durch das Gal4-ETO-Protein reguliert wurde. Dabei konnte die ETO-vermittelte transkriptionelle Repression des tkneo-Gens durch einen HDAC-Inhibitor (Butyrat) oder der Gal4-DBD wieder aufgehoben werden. Ein ETO-inhibierendes Peptid hätte denselben Effekt, und diese Zellen könnten mit G418 selektioniert werden. Die stabile 293-Zelllinie hatte gegenüber einem transienten System folgende Vorteile:

- a. Das Reporterkonstrukt und Gal4-ETO liegen in konstanten Mengen vor.
- b. Aufgrund des verwendeten Selektionsmarkers kann eine direkte Positivselektion mit G418 durchgeführt werden.
- c. Im Vergleich zum transienten System ist es bei der Selektion nicht zusätzlich von der Expression anderer Gene (wie *gag* und *pol*) abhängig.
- d. Das tkneo-Reporterkonstrukt ist aufgrund seiner stabilen Integration in das Genom genau wie die durch AML1/ETO reprimierten Zielgene vollständig in Nukleosomen verpackt.

Zur Etablierung der Klone wurde eine 293-Zellpopulation, die das tkneo-Reporterkonstrukt enthielt und G418-resistente war, mit dem Gal4-ETO-Plasmid transfiziert. Wie erwartet führte die Gal4-ETO-Expression zur transkriptionellen Repression des tkneo-Reportergens, so daß GCV-resistente Zellklone isoliert werden konnten (Kapitel 3.2.2.3.).

58 der 118 der isolierten, GCV-resistenten Klone waren zwar G418-sensitiv, entwickelten aber nach Butyratzugabe keine Resistenz gegen G418. Dies kann zum einen darauf zurückzuführen sein, daß das Reporterplasmid aus dem Genom der Zelle eliminiert wurde. Dies traf bei 2 (#43, #143) von insgesamt 4 in PCR-Analysen untersuchten G418-

sensitiven Klonen zu. Solch eine Rekombination ist ein seltenes Ereignis. Da aber nach Transfektion des Gal4-ETO-Plasmids keine Positivselektion für das tkneo-Konstrukt durchgeführt werden konnte und zwischen Transfektion und der Wachstumsanalyse ein Zeitraum von mindestens 40 Tagen lag, konnten Zellklone entstehen, die das tkneo-Reporterkonstrukt nicht mehr stabil integriert hatten. Zum anderen kann die Expression des tkneo-Gens zusätzlich durch ETO-unabhängige Mechanismen inaktiviert worden sein, die nicht durch Butyrat aufgehoben werden können. Hierbei spielt der Integrationsort des Vektors in das Genom eine wichtige Rolle. Heterochromatin hat z.B. einen inaktivierenden Effekt auf die Transgenexpression. Die Methylierung von CpG-Inseln innerhalb des Promotorbereichs kann ebenso zur transkriptionellen Repression eines Transgens führen. Sie ist eine der häufigsten Ursachen, die in stabil transfizierten oder transduzierten Zellen zur transkriptionellen Repression des Transgens führt [Ehrlich et al., 2002, Mutskov et al., 2002; Pikaart et al., 1998]. Dies zeigten Mutskov et al. in Untersuchungen mit stabil transfizierten Zellklonen. Hierbei wurden die Expression des IL-2-Rezeptors und das Methylierungsmuster des verwendeten β -Globin-Promotors untersucht. Die Autoren wiesen nach, daß der Methylierungsgrad des Promotorbereichs 100 Tage nach Selektionsstopp bei 80% der Klone sehr stark erhöht war. Schon 5 Tage nach Beendigung der Antibiotika-Selektion war in 55% der in FACS-Messungen untersuchten Klonen eine Abnahme in der transgenen Expression des IL-2-Rezeptors festzustellen. Aufgrund der DNA-Methylierung wird die Bindungsaffinität von DNA-bindenden Proteinen wie Transkriptionsfaktoren zu DNA stark herabgesetzt, was zu einer verminderten transkriptionellen Aktivität des Promotors führt [Han et al., 2001].

Die Klone #20, #158 und #163 zeigten zwar den gewünschten Phänotyp (G418-sensitiv und in Anwesenheit von Butyrat G418-resistent), da aber die Integration von Gal4-ETO in diesen 3 Klonen nicht nachgewiesen werden konnte, muß die transkriptionelle Repression durch Histon-Deacetylasen vermittelt worden sein, die durch das Butyrat inhibiert werden konnten. Wie bereits erwähnt, spielt die Methylierung von CpG-Inseln innerhalb des Promotorbereichs eine tragende Rolle bei der Repression eines Transgens. Die methylierte DNA kann zusätzlich von Proteinen der MeCp-Familie erkannt werden, die daran binden und über Histondeacetylasen die Deacetylierung der Histone vermitteln. Mutskov et al. haben, diese Korrelation zwischen dem Methylierungsgrad des Transgens und der Deacetylierung der Histone H3 und H4 in stabil transfizierten Zellen nachgewiesen. Wurden die stabil transfizierten Zellklone nach Selektionsstopp in Anwesenheit des HDAC-Inhibitors TSA kultiviert, blieb die Transgenexpression (IL-2-Rezeptor) bei 60% der Klone erhalten [Mutskov et al., 2002]. Im Unterschied zu Mutskov et al. wurden die 293-Klone nicht konstitutiv unter Butyrat kultiviert. Dies könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, daß sich die Gal4-ETO-unabhängige Repression des

tkneo-Gens nur bei 3 Klonen (#20, #158, #163) durch den HDAC-Inhibitor Butyrat induzieren ließ. Diese Klone waren allerdings nicht für die Durchmusterung einer Peptid-Bibliothek geeignet, da die Repression des Reportergens nicht durch Gal4-ETO vermittelt wurde.

34 der 118 isolierten, GCV-resistenten Klone waren G418-resistent. Dies bedeutet, daß der tkneo-Selektionsmarker exprimiert wurde aber nur die Neomycin-Phosphotransferase aktiv war. Es werden zwei Mechanismen beschrieben, die zur Expression einer inaktiven Thymidinkinase führen. Zum einen treten häufig verschiedene Mutationen innerhalb des TK-Gens wie z.B. der ATP-Bindungsstelle (AS 51-63), der Nukleosid-Bindungsstelle (AS 168-176) oder des Codons für die Aminosäure 336 auf, welche die Expression eines inaktiven TK-Proteins zur Folge haben [Bestman-Smith et al., 2001; Morfin et al., 2000; Gaudreau et al., 1998; Sasadeusz et al., 1997]. Solche Mutationen können vor allem unter Selektionsdruck und nach längerer Gabe eines Nukleosid-Analogs entstehen [Christophers et al., 1998]. Darüber hinaus führen Spleißvarianten der TK-mRNA zur Expression trunkierter TK-Proteine, die das GCV nicht mehr phosphorylieren [Chalmers et al., 2001; Garin et al., 2001]. Da diese 34 Klone aber nicht weiter untersucht wurden, kann über eine mögliche Mutation oder die vermehrte Expression trunkierter Varianten des tkneo-Proteins nur spekuliert werden. 21 Klone ließ sich nach den stabilen Transfektionen nur noch schlecht kultivieren, was bedeutet, daß diese Klone langsamer wuchsen und in der Anwesenheit von Butyrat nicht mehr adhärten.

Die Klone #61 und #157 zeigten unter Einsatz des HDAC-Inhibitors Butyrat den gewünschten Phänotyp. Sie ließen sich in der Anwesenheit von Butyrat unter G418 kultivieren und reagierten sensitiv auf GCV, d.h. die Repression konnte durch den HDAC-Inhibitor aufgehoben werden. In Abwesenheit des HDAC-Inhibitors wurden alle Zellen der beiden Klone durch G418 abgetötet, d.h. die Expression des tkneo-Gens war reprimiert.

Die Integration und Expression von Gal4-ETO wurde in beiden Klonen nachgewiesen. Dennoch mußte in einem Wettbewerbsversuch gezeigt werden, daß die transkriptionelle Repression des tkneo-Gens tatsächlich durch Gal4-ETO und nicht durch ETO-unabhängige Mechanismen vermittelt wird. Hierfür wurde die Gal4-DBD stabil in den Klonen #61 und #157 koexprimiert. Die Gal4-DBD konkurriert mit Gal4-ETO um die DNA-Bindungsstellen im tkneo-Reporterplasmid und verhindert so spezifisch die ETO-vermittelte Repression des tkneo-Gens. Die Wachstumsanalyse zeigte, daß beide Klone nach Koexpression der Gal4-DBD unter G418 wuchsen, während sie in Abwesenheit der Gal4-DBD weiterhin G418-sensitiv waren. In einer RT-PCR-Analyse wurde zusätzlich die Expression der tkneo-mRNA der Gal4-DBD-koexprimierenden Klone nachgewiesen.

Die Wachstumsanalysen der Klone weisen darauf hin, daß die Expression des tkneo-Gens in Klon #61 nicht so stark reprimiert ist wie in Klon #157, da dieser sensitiver auf den

HDAC-Inhibitor Butyrat oder die Koexpression der Gal4-DBD reagierte. Die unterschiedliche Sensitivität beider Klone läßt sich mit der stärkeren Gal4-ETO-Expression in Klon #157 erklären, die für diesen Klon in einer Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden konnte, während sie für Klon #61 unter der Nachweisgrenze dieser Methode lag.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Repression des tkneo-Gens in den Klonen #61 und #157 durch Gal4-ETO vermittelt wird. Die Repression läßt sich in beiden Klonen durch Butyrat und durch die Koexpression der Gal4-DBD aufheben. Dabei zeigt Klon #157 ein stringenteres Verhalten als Klon #61. Die unterschiedliche Sensitivität beider Klone könnte bei der zukünftigen Durchmusterung einer Peptid-Bibliothek auch ein Vorteil sein, da Peptide identifiziert werden können, die über eine unterschiedlich starke Fähigkeit verfügen, die ETO-vermittelte Repression aufzuheben. Somit erfüllen beide Klone folgende Kriterien:

- a. Die Konstrukte pGKL-tkneo und pCMX-Gal4-ETO sind stabil integriert.
- b. Die Gal4-ETO-mRNA wird exprimiert.
- c. Die Zellen sind G418-sensitiv und in Anwesenheit von Butyrat G418-resistent.
- d. Die Zellen sind GCV-resistent und in Anwesenheit von Butyrat GCV-sensitiv.
- e. Die transkriptionelle Repression des tkneo-Gens kann durch Koexpression der Gal4-DBD aufgehoben werden und wird somit spezifisch über Gal4-ETO vermittelt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal ein Selektionssystem in einer humanen Zelllinie etabliert, mit welchem ETO-inhibierende Peptide aus einer Peptid-Bibliothek identifiziert werden können. Im Gegensatz zu anderen Methoden wie der "Yeast-two-Hybrid"- oder der "Phage-Display"-Methode spiegeln die Zellklone den Mechanismus der AML1/ETO-vermittelten Repression eines Zielgens genau wider, und die Selektion kann unter physiologischen Bedingungen statt finden. Somit können Peptide isoliert werden, die in der Lage sind, die ETO-Funktion *in vivo* effizient und hochspezifisch zu blockieren.

5. Zusammenfassung

AML1/ETO liegt bei 12% aller Patienten mit einer AML vor. Bei der Translokation t(8;21) kommt es zur Fusion der DNA-Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktors AML1 mit dem starken transkriptionellen Repressor ETO. Über den ETO-Anteil wird ein aktiver Korepressorkomplex rekrutiert, der zur transkriptionellen Repression AML1 relevanter Zielgene führt. Die dysregulierte Genexpression führt in AML1/ETO-transformierten Zellen möglicherweise zusätzlich zur Aktivierung anderer Signaltransduktionswege. Untersuchungen in der hämatopoetischen Zelllinie TF-1 hatten diesbezüglich gezeigt, daß die Expression von AML1/ETO zu einer verlängerten STAT5-Aktivität führte. Durch ein synthetisches Phosphopeptid konnte die Proliferation AML1/ETO-transformierter Zellen, nicht aber normaler CD34⁺-Zellen gehemmt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde PLC γ als ein Zielmolekül des Phosphopeptids identifiziert. Weiterführende Untersuchungen hatten gezeigt, daß PLC γ nicht zur Transformation AML1/ETO-exprimierender Zellen beiträgt. Die Synthese des Phosphopeptids bereitete aufgrund der Phosphorylierung Schwierigkeiten, so daß die Untersuchungen dadurch eingeschränkt waren. Ziel war es dennoch, Peptide identifizieren zu können, die in der Lage sind die transformierenden Eigenschaften in AML1/ETO-exprimierenden Zellen spezifisch zu blockieren. Hierfür wurden zwei Selektionssysteme in einer humanen Zelllinie aufgebaut, die es ermöglichen sollen ETO-inhibierende Peptide aus einer Peptid-Bibliothek identifizieren zu können. Das erste Selektionssystem basierte auf der Produktion viraler Partikel, die von einer Gal4-ETO-regulierten VSV-G-Expression abhängig ist. Unter anderem bestätigte die Kompetition von Gal4-ETO durch die Koexpression der Gal4-DNA-bindenden-Domäne, daß die drastisch verminderte Virusproduktion allein auf eine ETO-vermittelte transkriptionelle Repression des VSV-G-Hüllproteins zurückzuführen war. Für die Durchmusterung einer Peptid-Bibliothek war der Hintergrund an viralen Partikeln (1.5×10^4 TU/ml), die trotz der Gal4-ETO-Expression produziert wurden, allerdings zu hoch. Im Gegensatz dazu verfügt das zweite Selektionssystem über ein tkneo-Reporterkonstrukt, dessen Expression ebenfalls durch Gal4-ETO reguliert wird. Es wurden zwei Zellklone etabliert (#61, #157), bei welchen die ETO-vermittelte Repression des tkneo-Fusionsproteins durch Butyrat und durch die Koexpression der Gal4-DNA-bindenden-Domäne spezifisch aufgehoben werden konnte. Neben dem gewünschten Wachstumverhalten der Klone unter den verschiedenen Selektionsbedingungen (ETO "on": G418-sensitiv; GCV-resistent; ETO "off": G418-resistent; GCV-sensitiv) wurde die stabile Integration des tkneo-Reporterkonstrukts und des Gal4-ETO-Plasmids in einer semiquantitativen PCR nachgewiesen. Es wurde zum ersten Mal ein Selektionssystem etabliert, welches den Mechanismus der AML1/ETO-vermittelten Repression eines Gens genau wider spiegelt und die Selektion ETO-inhibierender Peptide aus einer Peptid-Bibliothek unter physiologischen Bedingungen ermöglicht.

6. Literaturverzeichnis

Ahn MY, Huang G, Bae SC, Wee HJ, Kim WY, Ito Y. Negative regulation of granulocytic differentiation in the myeloid precursor cell line 32Dcl3 by ear-2, a mammalian homolog of *Drosophila* seven-up, and a chimeric leukemogenic gene, AML1/ETO. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Feb 17;95(4):1812-7.

Allen TM. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2002 Oct;2(10):750-63.

Amann JM, Nip J, Strom DK, Lutterbach B, Harada H, Lenny N, Downing JR, Meyers S, Hiebert SW. ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, makes distinct contacts with multiple histone deacetylases and binds mSin3A through its oligomerization domain. *Mol Cell Biol.* 2001 Oct;21(19):6470-83.

Amidon GL, Lee HJ. Absorption of peptide and peptidomimetic drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1994;34:321-41. Review.

Anderson KL, Perkin H, Surh CD, Venturini S, Maki RA, Torbett BE. Transcription factor PU.1 is necessary for development of thymic and myeloid progenitor-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2000 Feb 15;164(4):1855-61.

Appelbaum FR, Rowe JM, Radich J, Dick JE. Acute myeloid leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program).* 2001;:62-86. Review.

Archer SY, Hodin RA. Histone acetylation and cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 1999 Apr;9(2):171-4. Review.

Arteaga CL, Johnson MD, Todderud G, Coffey RJ, Carpenter G, Page DL. Elevated content of the tyrosine kinase substrate phospholipase C-gamma 1 in primary human breast carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Dec 1;88(23):10435-9.

Asou H, Tashiro S, Hamamoto K, Otsuji A, Kita K, Kamada N. Establishment of a human acute myeloid leukemia cell line (Kasumi-1) with 8;21 chromosome translocation. *Blood.* 1991 May 1;77(9):2031-6.

Au WY, Lie AK, Ma SK, Wan TS, Liang R, Chan EC, Kwong YL. Tyrosine kinase inhibitor STI571 in the treatment of Philadelphia chromosome-positive leukaemia failing myeloablative stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2002 Oct;30(7):453-7.

Azam M, Erdjument-Bromage H, Kreider BL, Xia M, Quelle F, Basu R, Saris C, Tempst P, Ihle JN, Schindler C. Interleukin-3 signals through multiple isoforms of Stat5. *EMBO J.* 1995 Apr 3;14(7):1402-11.

Banker DE, Radich J, Becker A, Kerkof K, Norwood T, Willman C, Appelbaum FR. The t(8;21) translocation is not consistently associated with high Bcl-2 expression in de novo acute myeloid leukemias of adults. *Clin Cancer Res.* 1998 Dec;4(12):3051-62.

Barber DL, Beattie BK, Mason JM, Nguyen MH, Yoakim M, Neel BG, D'Andrea AD, Frank DA. A common epitope is shared by activated signal transducer and activator of transcription-5 (STAT5) and the phosphorylated erythropoietin receptor: implications for the docking model of STAT activation. *Blood.* 2001 Apr 15;97(8):2230-7.

Barnes DW, Loutit JF. Treatment of murine leukaemia with x-rays and homologous bone marrow: II. 1957. *J Hematother Stem Cell Res.* 2001 Jun;10(3):325-34. No abstract available.

- Bestman-Smith J, Schmit I, Papadopoulou B, Boivin G.** Highly reliable heterologous system for evaluating resistance of clinical herpes simplex virus isolates to nucleoside analogues. *J Virol.* 2001 Apr;75(7):3105-10.
- Biethahn S, Alves F, Wilde S, Hiddemann W, Spiekermann K.** Expression of granulocyte colony-stimulating factor- and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-associated signal transduction proteins of the JAK/STAT pathway in normal granulopoiesis and in blast cells of acute myelogenous leukemia. *Exp Hematol.* 1999 May;27(5):885-94.
- Birge RB, Hanafusa H.** Closing in on SH2 specificity. *Science.* 1993 Dec 3;262(5139):1522-4. Review
- Birnboim HC.** A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 1983;100:243-55.
- Black ME, Newcomb TG, Wilson HM, Loeb LA.** Creation of drug-specific herpes simplex virus type 1 thymidine kinase mutants for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Apr 16;93(8):3525-9.
- Blobel GA.** CREB-binding protein and p300: molecular integrators of hematopoietic transcription. *Blood.* 2000 Feb 1;95(3):745-55. Review.
- Blume-Jensen P, Hunter T** Oncogenic kinase signalling. *Nature.* 2001 May 17;411(6835):355-65. Review.
- Borycki AG, Foucrier J, Saffar L, Leibovitch SA.** Repression of the CSF-1 receptor (c-fms proto-oncogene product) by antisense transfection induces G1-growth arrest in L6 alpha 1 rat myoblasts. *Oncogene.* 1995 May 4;10(9):1799-811.
- Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R.** STATs in oncogenesis. *Oncogene.* 2000 May 15;19(21):2474-88. Review.
- Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.
- Breinbauer R, Vetter IR, Waldmann H.** From protein domains to drug candidates-natural products as guiding principles in the design and synthesis of compound libraries. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2002 Aug 16;41(16):2879-90. Review.
- Bromberg J, Darnell JE Jr.** The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene.* 2000 May 15;19(21):2468-73. Review.
- Bruhn L, Munneryn A, Grosschedl R.** ALY, a context-dependent coactivator of LEF-1 and AML-1, is required for TCRalpha enhancer function. *Genes Dev.* 1997 Mar 1;11(5):640-53.
- Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK.** 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.* 1993 Sep 1;90(17):8033-7.
- Butz K, Denk C, Ullmann A, Scheffner M, Hoppe-Seyler F.** Induction of apoptosis in human papillomaviruspositive cancer cells by peptide aptamers targeting the viral E6 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jun 6;97(12):6693-7.

- Calabi F, Pannell R, Pavloska G.** Gene targeting reveals a crucial role for MTG8 in the gut. *Mol Cell Biol.* 2001 Aug;21(16):5658-66.
- Carlesso N, Frank DA, Griffin JD.** Tyrosyl phosphorylation and DNA binding activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cell lines transformed by Bcr/Abl. *J Exp Med.* 1996 Mar 1;183(3):811-20.
- Carpenter G, Ji Q.** Phospholipase C-gamma as a signal-transducing element. *Exp Cell Res.* 1999 Nov 25;253(1):15-24. Review.
- Castilla LH, Wijmenga C, Wang Q, Stacy T, Speck NA, Eckhaus M, Marin-Padilla M, Collins FS, Wynshaw-Boris A, Liu PP.** Failure of embryonic hematopoiesis and lethal hemorrhages in mouse embryos heterozygous for a knocked-in leukemia gene CBFB-MYH11. *Cell.* 1996 Nov 15;87(4):687-96.
- Catlett-Falcone R, Dalton WS, Jove R.** STAT proteins as novel targets for cancer therapy. Signal transducer and activator of transcription. *Curr Opin Oncol.* 1999 Nov;11(6):490-6. Review.
- Chalmers D, Ferrand C, Apperley JF, Melo JV, Ebeling S, Newton I, Duperrier A, Hagenbeek A, Garrett E, Tiberghien P, Garin M.** Elimination of the truncated message from the herpes simplex virus thymidine kinase suicide gene. *Mol Ther.* 2001 Aug;4(2):146-8.
- Chen HI, Einbond A, Kwak SJ, Linn H, Koepf E, Peterson S, Kelly JW, Sudol M.** Characterization of the WW domain of human yes-associated protein and its polyproline-containing ligands. *J Biol Chem.* 1997 Jul 4;272(27):17070-7.
- Chen Z, Guidez F, Rousselot P, Agadir A, Chen SJ, Wang ZY, Degos L, Zelent A, Waxman S, Chomienne C.** PLZF-RAR alpha fusion proteins generated from the variant t(11;17)(q23;q21) translocation in acute promyelocytic leukemia inhibit ligand-dependent transactivation of wild-type retinoic acid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Feb 1;91(3):1178-82.
- Cheng T, Shen H, Giokas D, Gere J, Tenen DG, Scadden DT.** Temporal mapping of gene expression levels during the differentiation of individual primary hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Nov 12;93(23):13158-63.
- Christophers J, Clayton J, Craske J, Ward R, Collins P, Trowbridge M, Darby G.** Survey of resistance of herpes simplex virus to acyclovir in northwest England. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998 Apr;42(4):868-72.
- Ciftci K, Levy RJ.** Enhanced plasmid DNA transfection with lysosomotropic agents in cultured fibroblasts. *Int J Pharm.* 2001 May 7;218(1-2):81-92.
- Cohen BA, Colas P, Brent R.** An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Nov 24;95(24):14272-7.
- Dagert M, Ehrlich SD.** Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene.* 1979 May;6(1):23-8.
- Dangond F, Gullans SR.** Differential expression of human histone deacetylase mRNAs in response to immune cell apoptosis induction by trichostatin A and butyrate. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Jun 29;247(3):833-7.

- Darnell JE Jr.** STATs and gene regulation. *Science*. 1997 Sep 12;277(5332):1630-5. Review.
- Davis JN, Williams BJ, Herron JT, Galiano FJ, Meyers S.** ETO-2, a new member of the ETO-family of nuclear proteins. *Oncogene*. 1999 Feb 11;18(6):1375-83.
- de Guzman CG, Warren AJ, Zhang Z, Gartland L, Erickson P, Drabkin H, Hiebert SW, Klug CA.** Hematopoietic stem cell expansion and distinct myeloid developmental abnormalities in a murine model of the AML1-ETO translocation. *Mol Cell Biol*. 2002 Aug;22(15):5506-17.
- Decker T, Kovarik P.** Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene*. 2000 May 15;19(21):2628-37. Review.
- DeMali KA, Whiteford CC, Ulug ET, Kazlauskas A.** Platelet-derived growth factor-dependent cellular transformation requires either phospholipase Cgamma or phosphatidylinositol 3 kinase. *J Biol Chem*. 1997 Apr 4;272(14):9011-8.
- Derossi D, Chassaing G, Prochiantz A.** Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol*. 1998 Feb;8(2):84-7. Review.
- Derossi D, Joliot AH, Chassaing G, Prochiantz A.** The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem*. 1994 Apr 8;269(14):10444-50.
- DuBridge RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP.** Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol*. 1987 Jan;7(1):379-87.
- Ehret GB, Reichenbach P, Schindler U, Horvath CM, Fritz S, Nabholz M, Bucher P.** DNA binding specificity of different STAT proteins. Comparison of in vitro specificity with natural target sites. *J Biol Chem*. 2001 Mar 2;276(9):6675-88.
- Ehrlich M.** DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene*. 2002 Aug 12;21(35):5400-13. Review.
- Erickson P, Gao J, Chang KS, Look T, Whisenant E, Raimondi S, Lasher R, Trujillo J, Rowley J, Drabkin H.** Identification of breakpoints in t(8;21) acute myelogenous leukemia and isolation of a fusion transcript, AML1/ETO, with similarity to Drosophila segmentation gene, Runt. *Blood*. 1992 Oct 1;80(7):1825-31.
- Erickson PF, Dessev G, Lasher RS, Philips G, Robinson M, Drabkin HA.** ETO and AML1 phosphoproteins are expressed in CD34+ hematopoietic progenitors: implications for t(8;21) leukemogenesis and monitoring residual disease. *Blood*. 1996 Sep 1;88(5):1813-23.
- Erickson PF, Robinson M, Owens G, Drabkin HA.** The ETO portion of acute myeloid leukemia t(8;21) fusion transcript encodes a highly evolutionarily conserved, putative transcription factor. *Cancer Res*. 1994 Apr 1;54(7):1782-6.
- Erman B, Cortes M, Nikolajczyk BS, Speck NA, Sen R.** ETS-core binding factor: a common composite motif in antigen receptor gene enhancers. *Mol Cell Biol*. 1998 Mar;18(3):1322-30.
- Espejo A, Cote J, Bednarek A, Richard S, Bedford MT.** A protein-domain microarray identifies novel protein-protein interactions. *Biochem J*. 2002 Nov 1;367(Pt 3):697-702.

- Fabbro D, Ruetz S, Buchdunger E, Cowan-Jacob S, Fendrich G, Liebetanz J, Mestan J, O'Reilly T, Traxler P, Chaudhuri B, Fretz H, Zimmermann J, Meyer T, Caravatti G, Furet P, Manley P.** Protein kinases as targets for anticancer agents: from inhibitors to useful drugs. *Pharmacol Ther.* 2002 Feb-Mar;93(2-3):79.
- Fagerlund R, Melen K, Kinnunen L, Julkunen I.** Arginine/lysine-rich nuclear localization signals mediate interactions between dimeric STATs and importin alpha 5. *J Biol Chem.* 2002 Aug 16;277(33):30072-8.
- Feinstein PG, Kornfeld K, Hogness DS, Mann RS.** Identification of homeotic target genes in *Drosophila melanogaster* including *nervy*, a proto-oncogene homologue. *Genetics.* 1995 Jun;140(2):573-86.
- Feldman GM, Rosenthal LA, Liu X, Hayes MP, Wynshaw-Boris A, Leonard WJ, Hennighausen L, Finbloom DS.** STAT5A-deficient mice demonstrate a defect in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced proliferation and gene expression. *Blood.* 1997 Sep 1;90(5):1768-76.
- Feller SM, Posern G, Voss J, Kardinal C, Sakkab D, Zheng J, Knudsen BS.** Physiological signals and oncogenesis mediated through Crk family adapter proteins. *J Cell Physiol.* 1998 Dec;177(4):535-52. Review.
- Feller SM, Ren R, Hanafusa H, Baltimore D.** SH2 and SH3 domains as molecular adhesives: the interactions of Crk and Abl. *Trends Biochem Sci.* 1994 Nov;19(11):453-8. Review.
- Fields S, Sternglanz R.** The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet.* 1994 Aug;10(8):286-92. Review.
- Fisher AL, Ohsako S, Caudy M.** The WRPW motif of the hairy-related basic helix-loop-helix repressor proteins acts as a 4-amino-acid transcription repression and protein-protein interaction domain. *Mol Cell Biol.* 1996 Jun;16(6):2670-7.
- Ford AM, Bennett CA, Price CM, Bruin MC, Van Wering ER, Greaves M.** Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Apr 14;95(8):4584-8.
- Frank RC, Sun X, Berguido FJ, Jakubowiak A, Nimer SD.** The t(8;21) fusion protein, AML1/ETO, transforms NIH3T3 cells and activates AP-1. *Oncogene.* 1999 Mar 4;18(9):1701-10.
- Fuchs R, Blakesley R.** Guide to the use of type II restriction endonucleases. *Methods Enzymol.* 1983;100:3-38.
- Gamou T, Kitamura E, Hosoda F, Shimizu K, Shinohara K, Hayashi Y, Nagase T, Yokoyama Y, Ohki M.** The partner gene of AML1 in t(16;21) myeloid malignancies is a novel member of the MTG8(ETO) family. *Blood.* 1998 Jun 1;91(11):4028-37.
- Garin MI, Garrett E, Tiberghien P, Apperley JF, Chalmers D, Melo JV, Ferrand C.** Molecular mechanism for ganciclovir resistance in human T lymphocytes transduced with retroviral vectors carrying the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Blood.* 2001 Jan 1;97(1):122-9.
- Gaudreau A, Hill E, Balfour HH Jr, Erice A, Boivin G.** Phenotypic and genotypic characterization of acyclovir-resistant herpes simplex viruses from immunocompromised patients. *J Infect Dis.* 1998 Aug;178(2):297-303.

- Gelmetti V, Zhang J, Fanelli M, Minucci S, Pelicci PG, Lazar MA.** Abarrent recruitment of the nuclear receptor corepressor-histone deacetylase complex by the acute myeloid fusion partner ETO. *Mol Cell Biol.* 1998 Dec;18(12):7185-91.
- Gesbert F, Griffin JD.** Bcr/Abl activates transcription of the Bcl-X gene through STAT5. *Blood.* 2000 Sep 15;96(6):2269-76.
- Geyer CR, Colman-Lerner A, Brent R.** "Mutagenesis" by peptide aptamers identifies genetic network members and pathway connections. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jul 20;96(15):8567-72.
- Gibbs JB, Oliff A.** Pharmaceutical research in molecular oncology. *Cell.* 1994 Oct 21;79(2):193-8. Review.
- Giese K, Kingsley C, Kirshner JR, Grosschedl R.** Assembly and function of a TCR alpha enhancer complex is dependent on LEF-1-induced DNA bending and multiple protein-protein interactions. *Genes Dev.* 1995 Apr 15;9(8):995-1008.
- Golemis EA, Speck NA, Hopkins N.** Alignment of U3 region sequences of mammalian type C viruses: identification of highly conserved motifs and implications for enhancer design. *J Virol.* 1990 Feb;64(2):534-42.
- Golling G, Li L, Pepling M, Stebbins M, Gergen JP.** Drosophila homologs of the proto-oncogene product PEBP2/CBF beta regulate the DNA-binding properties of Runt. *Mol Cell Biol.* 1996 Mar;16(3):932-42.
- Gotoh A, Miyazawa K, Ohyashiki K, Toyama K.** Potential molecules implicated in downstream signaling pathways of p185BCR-ABL in Ph+ ALL involve GTPase-activating protein, phospholipase C-gamma 1, and phosphatidylinositol 3'-kinase. *Leukemia.* 1994 Jan;8(1):115-20.
- Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Krämer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzl T.** Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J.* 2001 Dec 17;20(24):6969-78.
- Gouilleux-Gruart V, Gouilleux F, Desaint C, Claisse JF, Capiod JC, Delobel J, Weber-Nordt R, Dusanter-Fourt I, Dreyfus F, Groner B, Prin L.** STAT-related transcription factors are constitutively activated in peripheral blood cells from acute leukemia patients. *Blood.* 1996 Mar 1;87(5):1692-7.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R.** Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 1977 Jul;36(1):59-74.
- Graham FL, van der Eb AJ.** A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology.* 1973 Apr;52(2):456-67.
- Greenlund AC, Morales MO, Viviano BL, Yan H, Krolewski J, Schreiber RD.** Stat recruitment by tyrosine-phosphorylated cytokine receptors: an ordered reversible affinity-driven process. *Immunity.* 1995 Jun;2(6):677-87.
- Grignani F, De Matteis S, Nervi C, Tomassoni L, Gelmetti V, Ciocce M, Fanelli M, Ruthardt M, Ferrara FF, Zamir I, Seiser C, Grignani F, Lazar MA, Minucci S, Pelicci PG.** Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature.* 1998a Feb 19;391(6669):815-8.

- Grignani F, Kinsella T, Mencarelli A, Valtieri M, Riganelli D, Grignani F, Lanfrancone L, Peschle C, Nolan GP, Pelicci PG.** High-efficiency gene transfer and selection of human hematopoietic progenitor cells with a hybrid EBV/retroviral vector expressing the green fluorescence protein. *Cancer Res.* 1998b Jan 1;58(1):14-9.
- Guy J, Drabek D, Antoniou M.** Delivery of DNA into mammalian cells by receptor-mediated endocytosis and gene therapy. *Mol Biotechnol.* 1995 Jun;3(3):237-48. Review.
- Han L, Lin IG, Hsieh CL.** Protein binding protects sites on stable episomes and in the chromosome from de novo methylation. *Mol Cell Biol.* 2001 May;21(10):3416-24.
- Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA.** Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature.* 1999 Jul 29;400(6743):464-8.
- Hanahan D, Weinberg RA.** The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70. Review.
- Hanahan D.** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 1983 Jun 5;166(4):557-80.
- Hayakawa F, Towatari M, Iida H, Wakao H, Kiyoi H, Naoe T, Saito H.** Differential constitutive activation between STAT-related proteins and MAP kinase in primary acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol.* 1998 Jun;101(3):521-8.
- Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H, Tanimoto M, Kitamura T, Saito H, Naoe T.** Tandem-duplicated *Fli3* constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogene.* 2000 Feb 3;19(5):624-31.
- Heidenreich O, Krauter J, Riehle H, Hadwiger P, John M, Heil G, Vornlocher HP, Nordheim A.** AML1/MTG8 Oncogene Suppression by Small Interfering RNAs Supports Myeloid Differentiation of t(8;21)-positive Leukemic Cells. *Blood.* 2002 Dec 12 [ahead of print]
- Hernandez-Munain C, Krangel MS.** Regulation of the T-cell receptor delta enhancer by functional cooperation between c-Myb and core-binding factors. *Mol Cell Biol.* 1994 Jan;14(1):473-83.
- Higuchi M, O'Brien D, Kumaravelu P, Lenny N, Yeoh EJ, Downing JR.** 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.* 2002 Feb;1(1):63-74.
- Hildebrand D, Tiefenbach J, Heinzl T, Grez M, Maurer AB.** Multiple regions of ETO cooperate in transcriptional repression. *J Biol Chem.* 2001 Mar 30;276(13):9889-95.
- Hildebrand DC, Maurer AB and Grez M.** Transformation of TF-1 cells with retroviral vectors containing AML1b or AML1/MTG8. *Annals of Hematology,* 1998.77(Supplement II): p.S205.
- Hoey T, Schindler U.** STAT structure and function in signaling. *Curr Opin Genet Dev.* 1998 Oct;8(5):582-7. Review.
- Hoffbrand AV, Pettit JE, Hoelzer D.** Roche Grundkurs Hämatologie. 1997.

- Hoff-Olsen P, Mevag B, Staalstrom E, Hovde B, Egeland T, Olaisen B.** Extraction of DNA from decomposed human tissue. An evaluation of five extraction methods for short tandem repeat typing. *Forensic Sci Int.* 1999 Nov 8;105(3):171-83.
- Hohaus S, Petrovick MS, Voso MT, Sun Z, Zhang DE, Tenen DG.** PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene. *Mol Cell Biol.* 1995 Oct;15(10):5830-45.
- Hoppe-Seyler F, Crnkovic-Mertens I, Denk C, Fitscher BA, Klevenz B, Tomai E, Butz K.** Peptide aptamers: new tools to study protein interactions. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2001 Aug;78(2):105-11. Review.
- Huang G, Shigesada K, Ito K, Wee HJ, Yokomizo T, Ito Y.** Dimerization with PEBP2beta protects RUNX1/AML1 from ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *EMBO J.* 2001 Feb 15;20(4):723-33.
- Ihle JN.** Signaling by the cytokine receptor superfamily in normal and transformed hematopoietic cells. *Adv Cancer Res.* 1996;68:23-65. Review.
- Jacobsen H, Klenow H, Overgaard-Hansen K.** The N-terminal amino-acid sequences of DNA polymerase I from *Escherichia coli* and of the large and the small fragments obtained by a limited proteolysis. *Eur J Biochem.* 1974 Jun 15;45(2):623-7.
- Jahns-Streubel G, Reuter C, Unterhalt M, Schleyer E, Wormann B, Buchner T, Hiddemann W.** Blast cell proliferative activity and sensitivity to GM-CSF in vitro are associated with early response to TAD-9 induction therapy in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 1995 Nov;9(11):1857-63.
- Kagoshima H, Shigesada K, Satake M, Ito Y, Miyoshi H, Ohki M, Pepling M, Gergen P.** The Runt domain identifies a new family of heteromeric transcriptional regulators. *Trends Genet.* 1993 Oct;9(10):338-41. Review.
- Kamachi Y, Ogawa E, Asano M, Ishida S, Murakami Y, Satake M, Ito Y, Shigesada K.** Purification of a mouse nuclear factor that binds to both the A and B cores of the polyomavirus enhancer. *J Virol.* 1990 Oct;64(10):4808-19.
- Kania MA, Bonner AS, Duffy JB, Gergen JP.** The *Drosophila* segmentation gene Runt encodes a novel nuclear regulatory protein that is also expressed in the developing nervous system. *Genes Dev.* 1990 Oct;4(10):1701-13.
- Kardinal C, Konkol B, Lin H, Eulitz M, Schmidt EK, Estrov Z, Talpaz M, Arlinghaus RB, Feller SM.** Chronic myelogenous leukemia blast cell proliferation is inhibited by peptides that disrupt Grb2-SoS complexes. *Blood.* 2001 Sep 15;98(6):1773-81.
- Kelemen BR, Hsiao K, Goueli SA.** Selective in vivo inhibition of mitogen-activated protein kinase activation using cell-permeable peptides. *J Biol Chem.* 2002 Mar;277(10):8741-8.
- Kinsella TM, Nolan GP.** Episomal vectors rapidly and stably produce high-titer recombinant retrovirus. *Hum Gene Ther.* 1996 Aug 1;7(12):1405-13.
- Kitabayashi I, Ida K, Morohoshi F, Yokoyama A, Mitsuhashi N, Shimizu K, Nomura N, Hayashi Y, Ohki M.** The AML1-MTG8 leukemic fusion protein forms a complex with a novel member of the MTG8(ETO/CDR) family, MTGR1. *Mol Cell Biol.* 1998a Feb;18(2):846-58.

- Kitabayashi I, Yokoyama A, Shimizu K, Ohki M.** Interaction and functional cooperation of the leukemia-associated factors AML1 and p300 in myeloid cell differentiation. *EMBO J.* 1998b Jun 1;17(11):2994-3004.
- Kitamura T, Tange T, Terasawa T, Chiba S, Kuwaki T, Miyagawa K, Piao YF, Miyazono K, Urabe A, Takaku F.** Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. *J Cell Physiol.* 1989 Aug;140(2):323-34.
- Klampfer L, Zhang J, Zelenetz AO, Uchida H, Nimer SD.** The AML1/ETO fusion protein activates transcription of BCL-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Nov 26;93(24):14059-64.
- Klebe G.** Recent developments in structure-based drug design. *J Mol Med.* 2000;78(5):269-81. Review.
- Kneuer C, Sameti M, Bakowsky U, Schiestel T, Schirra H, Schmidt H, Lehr CM.** A nonviral DNA delivery system based on surface modified silica-nanoparticles can efficiently transfect cells in vitro. *Bioconjug Chem.* 2000 Nov-Dec;11(6):926-32.
- Kokoris MS, Sabo P, Adman ET, Black ME.** Enhancement of tumor ablation by a selected HSV-1 thymidine kinase mutant. *Gene Ther.* 1999 Aug;6(8):1415-26.
- Krämer OH, Göttlicher M, Heinzl T.** Histone deacetylase as a therapeutic target. *Trends Endocrinol Metab.* 2001 Sep;12(7):294-300. Review.
- Kushner SR.** An improved method for transformation of *Escherichia coli* with *ColEI* derived plasmids. In *genetic Engineering* (Boyer HW and Nicosia S). 1978: 17-23. Elsevier/North Holland, Amsterdam.
- Lacronique V, Boureux A, Valle VD, Poirel H, Quang CT, Mauchauffe M, Berthou C, Lessard M, Berger R, Ghysdael J, Bernard OA.** A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science.* 1997 Nov 14;278(5341):1309-12.
- Lagasse E, Weissman IL.** Mouse MRP8 and MRP14, two intracellular calcium-binding proteins associated with the development of the myeloid lineage. *Blood.* 1992 Apr 15;79(8):1907-15.
- Langer R.** Drug delivery and targeting. *Nature.* 1998 Apr 30;392(6679 Suppl):5-10. Review.
- Latham PW.** Therapeutic peptides revisited. *Nat Biotechnol.* 1999 Aug;17(8):755-7.
- Lee SJ, Lee SD, Park JG, Kim CM, Ryu SH, Suh PG.** Overexpression of phospholipase C-gamma 1 in colorectal carcinomas is associated with overexpression of factors that bind its Promotor. *J Biol Chem.* 1995 Jul 7;270(27):16378-84.
- Leonard WJ.** Role of Jak kinases and STATs in cytokine signal transduction. *Int J Hematol.* 2001 Apr;73(3):271-7. Review.
- Leung D, Abbenante G, Fairlie DP.** Protease inhibitors: current status and future prospects. *J Med Chem.* 2000 Feb 10;43(3):305-41. Review.
- Levanon D, Brenner O, Negreanu V, Bettoun D, Woolf E, Eilam R, Lotem J, Gat U, Otto F, Speck N, Groner Y.** Spatial and temporal expression pattern of Runx3 (Aml2) and Runx1 (Aml1) indicates non-redundant functions during mouse embryogenesis. *Mech Dev.* 2001 Dec;109(2):413-7.

- Levanon D, Negreanu V, Bernstein Y, Bar-Am I, Avivi L, Groner Y.** AML1, AML2, and AML3, the human members of the Runt domain gene-family: cDNA structure, expression, and chromosomal localization. *Genomics*. 1994 Sep 15;23(2):425-32.
- Li M.** Applications of display technology in protein analysis. *Nat Biotechnol*. 2000 Dec;18(12):1251-6. Review.
- Li S, Couvillon AD, Brasher BB, Van Etten RA.** Tyrosine phosphorylation of Grb2 by Bcr/Abl and epidermal growth factor receptor: a novel regulatory mechanism for tyrosine kinase signaling. *EMBO J*. 2001 Dec 3;20(23):6793-804.
- Liang DC, Chou TB, Chen JS, Shurtleff SA, Rubnitz JE, Downing JR, Pui CH, Shih LY.** High incidence of TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia in Taiwan. *Leukemia*. 1996 Jun;10(6):991-3.
- Licht JD.** AML1 and the AML1-ETO fusion protein in the pathogenesis of t(8;21) AML. *Oncogene*. 2001 Sep 10;20(40):5660-79. Review.
- Lin TS, Mahajan S, Frank DA.** STAT signaling in the pathogenesis and treatment of leukemias. *Oncogene*. 2000 May 15;19(21):2496-504. Review.
- Liu P, Tarle SA, Hajra A, Claxton DF, Marlton P, Freedman M, Siciliano MJ, Collins FS.** Fusion between transcription factor CBF beta/PEBP2 beta and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia. *Science*. 1993 Aug 20;261(5124):1041-4.
- Liu R, Marik J, Lam KS.** A novel peptide-based encoding system for "one-bead one-compound" peptidomimetic and small molecule combinatorial libraries. *J Am Chem Soc*. 2002 Jul 3;124(26):7678-80.
- Look TA.** Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science*. 1997) 278: 1059.
- Lu J, Maruyama M, Satake M, Bae SC, Ogawa E, Kagoshima H, Shigesada K, Ito Y.** Subcellular localization of the alpha and beta subunits of the acute myeloid leukemia-linked transcription factor PEBP2/CBF. *Mol Cell Biol*. 1995 Mar;15(3):1651-61.
- Lund AH, van Lohuizen M.** RUNX: a trilogy of cancer genes. *Cancer Cell*. 2002 Apr;1(3):213-5. Review.
- Lutterbach B, Hiebert SW.** Role of the transcription factor AML-1 in acute leukemia and hematopoietic differentiation. *Gene*. 2000 Mar 21;245(2):223-35. Review.
- Lutterbach B, Westendorf JJ, Linggi B, Patten A, Moniwa M, Davie JR, Huynh KD, Bardwell VJ, Lavinsky RM, Rosenfeld MG, Glass C, Seto E, Hiebert SW.** ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, interacts with the N-CoR and mSin3 Korepressors. *Mol Cell Biol*. 1998 Dec;18(12):7176-84.
- MacBeath G, Schreiber SL.** Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science*. 2000 Sep 8;289(5485):1760-3.
- Mao S, Frank RC, Zhang J, Miyazaki Y, Nimer SD.** Functional and physical interactions between AML1 proteins and an ETS protein, MEF: implications for the pathogenesis of t(8;21)-positive leukemias. *Mol Cell Biol*. 1999 May;19(5):3635-44.

- Marengere LE, Songyang Z, Gish GD, Schaller MD, Parsons JT, Stern MJ, Cantley LC, Pawson T.** SH2 domain specificity and activity modified by a single residue. *Nature*. 1994 Jun 9;369(6480):502-5.
- Mastromarino P, Conti C, Goldoni P, Hautecoeur B, Orsi N.** Characterization of membrane components of the erythrocyte involved in vesicular stomatitis virus attachment and fusion at acidic pH. *J Gen Virol*. 1987 Sep;68 (Pt 9):2359-69.
- Matsushime H, Roussel MF, Ashmun RA, Sherr CJ.** Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell*. 1991 May 17;65(4):701-13.
- Maurer AB and Grez M.** The t(8;21) Fusion Protein, AML1/ETO, blocks differentiation and increases sensitivity to IL-3 in the factor dependent cell line TF-1. *Leukemia*, 1997.11(12):p.2230.
- McAllister RM, Isaacs H, Rongey R, Peer M, Au W, Soukup SW, Gardner MB.** Establishment of a human medulloblastoma cell line. *Int J Cancer*. 1977 Aug 15;20(2):206-12.
- McBride KM, Banninger G, McDonald C, Reich NC.** Regulated nuclear import of the STAT1 transcription factor by direct binding of importin-alpha. *EMBO J*. 2002 Apr 2;21(7):1754-63.
- McDonnell MW, Simon MN, Studier FW.** Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J Mol Biol*. 1977 Feb 15;110(1):119-46.
- McLarren KW, Lo R, Grbavec D, Thirunavukkarasu K, Karsenty G, Stifani S.** The mammalian basic helix loop helix protein HES-1 binds to and modulates the transactivating function of the Runt-related factor Cbfa1. *J Biol Chem*. 2000 Jan 7;275(1):530-8.
- McLarren KW, Theriault FM, Stifani S.** Association with the nuclear matrix and interaction with Groucho and RUNX proteins regulate the transcription repression activity of the basic helix loop helix factor Hes1. *J Biol Chem*. 2001 Jan 12;276(2):1578-84.
- McLean TW, Ringold S, Neuberg D, Stegmaier K, Tantravahi R, Ritz J, Koeffler HP, Takeuchi S, Janssen JW, Seriu T, Bartram CR, Sallan SE, Gilliland DG, Golub TR.** TEL/AML-1 dimerizes and is associated with a favorable outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1996 Dec 1;88(11):4252-8.
- McLemore ML, Grewal S, Liu F, Archambault A, Poursine-Laurent J, Haug J, Link DC.** STAT-3 activation is required for normal G-CSF-dependent proliferation and granulocytic differentiation. *Immunity*. 2001 Feb;14(2):193-204.
- Melen K, Kinnunen L, Julkunen I.** Arginine/lysine-rich structural element is involved in interferon-induced nuclear import of STATs. *J Biol Chem*. 2001 May 11;276(19):16447-55.
- Melnick A, Carlile GW, McConnell MJ, Polinger A, Hiebert SW, Licht JD.** AML-1/ETO fusion protein is a dominant negative inhibitor of transcriptional repression by the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Blood*. 2000a Dec 1;96(12):3939-47.

Melnick AM, Westendorf JJ, Polinger A, Carlile GW, Arai S, Ball HJ, Lutterbach B, Hiebert SW, Licht JD. The ETO protein disrupted in t(8;21)-associated acute myeloid leukemia is a corepressor for the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Mol Cell Biol.* 2000b Mar;20(6):2075-86.

Merezak C, Reichert M, Van Lint C, Kerkhofs P, Portetelle D, Willems L, Kettmann R. Inhibition of histone deacetylases induces bovine leukemia virus expression in vitro and in vivo. *J Virol.* 2002 May;76(10):5034-42.

Meyers S, Downing JR, Hiebert SW. Identification of AML-1 and the (8;21) translocation protein (AML-1/ETO) as sequence-specific DNA-binding proteins: the Runt homology domain is required for DNA binding and protein-protein interactions. *Mol Cell Biol.* 1993 Oct;13(10):6336-45.

Meyers S, Lenny N, Sun W, Hiebert SW. AML-2 is a potential target for transcriptional regulation by the t(8;21) and t(12;21) fusion proteins in acute leukemia. *Oncogene.* 1996 Jul 18;13(2):303-12.

Mitani K, Ogawa S, Tanaka T, Miyoshi H, Kurokawa M, Mano H, Yazaki Y, Ohki M, Hirai H. Generation of the AML1-EVI-1 fusion gene in the t(3;21)(q26;q22) causes blastic crisis in chronic myelocytic leukemia. *EMBO J.* 1994 Feb 1;13(3):504-10.

Mitelman F, Heim S. Quantitative acute leukemia cytogenetics. *Genes Chromosomes Cancer.* 1992 Jul;5(1):57-66.

Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K. AML1/ETO-expressing nonleukemic stem cells in acute myelogenous leukemia with 8;21 chromosomal translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jun 20;97(13):7521-6.

Miyoshi H, Kozu T, Shimizu K, Enomoto K, Maseki N, Kaneko Y, Kamada N, Ohki M. The t(8;21) translocation in acute myeloid leukemia results in production of an AML1-MTG8 fusion transcript. *EMBO J.* 1993 Jul;12(7):2715-21.

Miyoshi H, Ohira M, Shimizu K, Mitani K, Hirai H, Imai T, Yokoyama K, Soeda E, Ohki M. Alternative splicing and genomic structure of the AML1 gene involved in acute myeloid leukemia. *Nucleic Acids Res.* 1995 Jul 25;23(14):2762-9.

Miyoshi H, Shimizu K, Kozu T, Maseki N, Kaneko Y, Ohki M. t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Dec 1;88(23):10431-4.

Mizuki M, Fenski R, Halfter H, Matsumura I, Schmidt R, Muller C, Gruning W, Kratz-Albers K, Serve S, Steur C, Buchner T, Kienast J, Kanakura Y, Berdel WE, Serve H. FLT3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood.* 2000 Dec 1;96(12):3907-14.

Morfin F, Souillet G, Bilger K, Ooka T, Aymard M, Thouvenot D. Genetic characterization of thymidine kinase from acyclovir-resistant and -susceptible herpes simplex virus type 1 isolated from bone marrow transplant recipients. *J Infect Dis.* 2000 Jul;182(1):290-3.

Mossner E, Boll M, Pfeleiderer G. Purification of human and bovine alkaline phosphatases by affinity chromatography. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1980 Apr;361(4):543-9.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51 Pt 1:263-73.

Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JH, Owen MJ, Mertelsmann R, Zabel BU, Olsen BR. Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell.* 1997 May 30;89(5):773-9.

Mutskov VJ, Farrell CM, Wade PA, Wolffe AP, Felsenfeld G. The barrier function of an insulator couples high histone acetylation levels with specific protection of promoter DNA from methylation. *Genes Dev.* 2002 Jun 15;16(12):1540-54.

Newmark HL, Young CW. Butyrate and phenylacetate as differentiating agents: practical problems and opportunities. *J Cell Biochem Suppl.* 1995;22:247-53. Review.

Nieborowska-Skorska M, Wasik MA, Slupianek A, Salomoni P, Kitamura T, Calabretta B, Skorski T. Signal transducer and activator of transcription (STAT)5 activation by BCR/ABL is dependent on intact Src homology (SH)3 and SH2 domains of BCR/ABL and is required for leukemogenesis. *J Exp Med.* 1999 Apr 19;189(8):1229-42.

Niki M, Okada H, Takano H, Kuno J, Tani K, Hibino H, Asano S, Ito Y, Satake M, Noda T. Hematopoiesis in the fetal liver is impaired by targeted mutagenesis of a gene encoding a non-DNA binding subunit of the transcription factor, polyomavirus enhancer binding protein 2/core binding factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 May 27;94(11):5697-702.

Nuchprayoon I, Meyers S, Scott LM, Suzow J, Hiebert S, Friedmann AD. PEBP2/CBF, the murine homolog of the human myeloid AML1 and PEBP2 beta/CBF beta proto-oncoproteins, regulates the murine myeloperoxidase and neutrophil elastase genes in immature myeloid cells. *Mol Cell Biol.* 1994 Aug;14(8):5558-68.

Nucifora G, Begy CR, Kobayashi H, Roulston D, Claxton D, Pedersen-Bjergaard J, Parganas E, Ihle JN, Rowley JD. Consistent intergenic splicing and production of multiple transcripts between AML1 at 21q22 and unrelated genes at 3q26 in (3;21)(q26;q22) translocations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Apr 26;91(9):4004-8.

Odaka Y, Mally A, Elliott LT, Meyers S. Nuclear import and subnuclear localization of the proto-oncoprotein ETO (MTG8). *Oncogene.* 2000 Jul 27;19(32):3584-97.

Ogawa E, Inuzuka M, Maruyama M, Satake M, Naito-Fujimoto M, Ito Y, Shigesada K. Molecular cloning and characterization of PEBP2 beta, the heterodimeric partner of a novel Drosophila Runt-related DNA binding protein PEBP2 alpha. *Virology.* 1993a May;194(1):314-31.

Ogawa E, Maruyama M, Kagoshima H, Inuzuka M, Lu J, Satake M, Shigesada K, Ito Y. PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the Drosophila Runt gene and the human AML1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993b Jul 15;90(14):6859-63.

Okuda T, Cai Z, Yang S, Lenny N, Lyu CJ, van Deursen JM, Harada H, Downing JR. Expression of a knocked-in AML1-ETO leukemia gene inhibits the establishment of normal definitive hematopoiesis and directly generates dysplastic hematopoietic progenitors. *Blood.* 1998 May 1;91(9):3134-43.

Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell*. 1996 Jan 26;84(2):321-30.

Okuno Y, Suzuki A, Ichiba S, Takahashi T, Nakamura K, Hitomi K, Sasaki R, Tada K, Imura H. Establishment of an erythroid cell line (JK-1) that spontaneously differentiates to red cells. *Cancer*. 1990 Oct 1;66(7):1544-51.

Ory DS, Neugeboren BA, Mulligan RC. A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 Oct 15;93(21):11400-6

Ottmann OG, Druker BJ, Sawyers CL, Goldman JM, Reiffers J, Silver RT, Tura S, Fischer T, Deininger MW, Schiffer CA, Baccarani M, Gratwohl A, Hochhaus A, Hoelzer D, Fernandes-Reese S, Gathmann I, Capdeville R, O'Brien SG. A phase 2 study of imatinib in patients with relapsed or refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoid leukemias. *Blood*. 2002 Sep 15;100(6):1965-71.

Otto F, Kanegane H, Mundlos S. Mutations in the RUNX2 gene in patients with cleidocranial dysplasia. *Hum Mutat*. 2002 Mar;19(3):209-16. Review.

Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*. 1997 May 30;89(5):765-71.

Pabst T, Mueller BU, Harakawa N, Schoch C, Haferlach T, Behre G, Hiddemann W, Zhang DE, Tenen DG. AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia. *Nat Med*. 2001 Apr;7(4):444-51.

Parkman R. Chronic graft-versus-host disease. *Curr Opin Hematol*. 1998 Jan;5(1):22-5. Review.

Paul A. Marks, Richard A. Rifkind, Victoria M. Richon, Ronald Breslow, Thomas Miller, William K. Kelly. Histone deacetylases and cancer causes and therapie. *Nature Reviews Cancer* 1, 194 -202 (2001).

Pawson T. Protein modules and signalling networks. *Nature*. 1995 Feb 16;373(6515):573-80. Review.

Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Sep 15;90(18):8392-6.

Petrovick MS, Hiebert SW, Friedman AD, Hetherington CJ, Tenen DG, Zhang DE. Multiple functional domains of AML1: PU.1 and C/EBPalpha synergize with different regions of AML1. *Mol Cell Biol*. 1998 Jul;18(7):3915-25.

Pikaart MJ, Recillas-Targa F, Felsenfeld G. Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators. *Genes Dev*. 1998 Sep 15;12(18):2852-62.

Prosser HM, Wotton D, Gegonne A, Ghysdael J, Wang S, Speck NA, Owen MJ. A phorbol ester response element within the human T-cell receptor beta-chain enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Oct 15;89(20):9934-8.

Puccetti E, Obradovic D, Beissert T, Bianchini A, Washburn B, Chiaradonna F, Boehrer S, Hoelzer D, Ottmann OG, Pelicci PG, Nervi C, Ruthardt M. AML-associated translocation products block vitamin D(3)-induced differentiation by sequestering the vitamin D(3) receptor. *Cancer Res.* 2002 Dec 1;62(23):7050-8.

Putney SD, Burke PA. Improving protein therapeutics with sustained-release formulations. *Nat Biotechnol.* 1998 Feb;16(2):153-7. Review.

Qiu L, Kelso MJ, Hansen C, West ML, Fairlie DP, Parsons PG. Anti-tumour activity in vitro and in vivo of selective differentiating agents containing hydroxamate. *Br J Cancer.* 1999 Jun;80(8):1252-8.

Quelle FW, Thierfelder W, Witthuhn BA, Tang B, Cohen S, Ihle JN. Phosphorylation and activation of the DNA binding activity of purified Stat1 by the Janus protein-tyrosine kinases and the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem.* 1995 Sep 1;270(35):20775-80.

Rane SG, Reddy EP. JAKs, STATs and Src kinases in hematopoiesis. *Oncogene.* 2002 May 13;21(21):3334-58. Review.

Redondo JM, Pfohl JL, Hernandez-Munain C, Wang S, Speck NA, Krangel MS. Indistinguishable nuclear factor binding to functional core sites of the T-cell receptor delta and murine leukemia virus enhancers. *Mol Cell Biol.* 1992 Nov;12(11):4817-23.

Rhoades KL, Hetherington CJ, Harakawa N, Yergeau DA, Zhou L, Liu LQ, Little MT, Tenen DG, Zhang DE. Analysis of the role of AML1-ETO in leukemogenesis, using an inducible transgenic mouse model. *Blood.* 2000 Sep 15;96(6):2108-15.

Rhoades KL, Hetherington CJ, Rowley JD, Hiebert SW, Nucifora G, Tenen DG, Zhang DE. Synergistic up-regulation of the myeloid-specific Promotor for the macrophage colony-stimulating factor receptor by AML1 and the t(8;21) fusion protein may contribute to leukemogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Oct 15;93(21):11895-900.

Rich DH, Bursavich MG, Estiarte MA. Discovery of nonpeptide, peptidomimetic peptidase inhibitors that target alternate enzyme active site conformations. *Biopolymers.* 2002;66(2):115-25.

Romana SP, Poirel H, Leconiat M, Flexor MA, Mauchauffe M, Jonveaux P, Macintyre EA, Berger R, Bernard OA. High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1995 Dec 1;86(11):4263-9.

Rosa Santos SC, Dumon S, Mayeux P, Gisselbrecht S, Gouilleux F. Cooperation between STAT5 and phosphatidylinositol 3-kinase in the IL-3-dependent survival of a bone marrow derived cell line. *Oncogene.* 2000 Feb 24;19(9):1164-72.

Rubio-Aliaga I, Daniel H. Mammalian peptide transporters as targets for drug delivery. *Trends Pharmacol Sci.* 2002 Sep;23(9):434-40. Review.

Sacchi N, Schiaffonati L, Magnani I, Pappalardo C, Hughes AJ Jr, Darfler M, Hoogeveen AT. Detection and subcellular localization of an AML1 chimeric protein in the t(8;21) positive acute myeloid leukemia. *Oncogene.* 1996 Jan 18;12(2):437-44.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985 Dec 20;230(4732):1350-4.

Sakakura C, Yamaguchi-Iwai Y, Satake M, Bae SC, Takahashi A, Ogawa E, Hagiwara A, Takahashi T, Murakami A, Makino K, et al. Growth inhibition and induction of differentiation of t(8;21) acute myeloid leukemia cells by the DNA-binding domain of PEBP2 and the AML1/MTG8(ETO)-specific antisense oligonucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Nov 22;91(24):11723-7.

Santos SC, Lacronique V, Bouchaert I, Monni R, Bernard O, Gisselbrecht S, Gouilleux F. Constitutively active STAT5 variants induce growth and survival of hematopoietic cells through a PI 3-kinase/Akt dependent pathway. *Oncogene.* 2001 Apr 19;20(17):2080-90.

Sasadeusz JJ, Tufaro F, Safrin S, Schubert K, Hubinette MM, Cheung PK, Sacks SL. Homopolymer mutational hot spots mediate herpes simplex virus resistance to acyclovir. *J Virol.* 1997 May;71(5):3872-8.

Sasaki K, Yagi H, Bronson RT, Tominaga K, Matsunashi T, Deguchi K, Tani Y, Kishimoto T, Komori T. Absence of fetal liver hematopoiesis in mice deficient in transcriptional coactivator core binding factor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Oct 29;93(22):12359-63.

Sasse J, Hemmann U, Schwartz C, Schniertshauer U, Heesel B, Landgraf C, Schneider-Mergener J, Heinrich PC, Horn F. Mutational analysis of acute-phase response factor/Stat3 activation and dimerization. *Mol Cell Biol.* 1997 Aug;17(8):4677-86.

Sattler M, Salgia R, Okuda K, Uemura N, Durstin MA, Pisick E, Xu G, Li JL, Prasad KV, Griffin JD. The proto-oncogene product p120CBL and the adaptor proteins CRKL and c-CRK link c-ABL, p190BCR/ABL and p210BCR/ABL to the phosphatidylinositol-3' kinase pathway. *Oncogene.* 1996 Feb 15;12(4):839-46.

Sawyers CL, Denny CT, Witte ON. Leukemia and the disruption of normal hematopoiesis. *Cell.* 1991 Jan 25;64(2):337-50. Review.

Scandura JM, Boccuni P, Cammenga J, Nimer SD. Transcription factor fusions in acute leukemia: variations on a theme. *Oncogene.* 2002 May 13;21(21):3422-44. Review.

Schaefer TS, Sanders LK, Nathans D. Cooperative transcriptional activity of Jun and Stat3 beta, a short form of Stat3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Sep 26;92(20):9097-101.

Scherr M, Battmer K, Eder M, Schule S, Hohenberg H, Ganser A, Grez M, Blomer U. Efficient gene transfer into the CNS by lentiviral vectors purified by anion exchange chromatography. *Gene Ther.* 2002 Dec;9(24):1708-14.

Sehgal A. Recent developments in peptide-based cancer therapeutics. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2002 Mar;5(2):245-50. Review.

Shikami M, Miwa H, Nishii K, Takahashi T, Sekine T, Mahmud N, Nishikawa M, Shiku H, Kamada N, Kita K. Low BCL-2 expression in acute leukemia with t(8;21) chromosomal abnormality. *Leukemia.* 1999 Mar;13(3):358-68.

Shinjo K, Takeshita A, Ohnishi K, Ohno R. Granulocyte colony-stimulating factor receptor at various differentiation stages of normal and leukemic hematopoietic cells. *Leuk Lymphoma.* 1997 Mar;25(1-2):37-46. Review.

- Shuai K, Halpern J, ten Hoeve J, Rao X, Sawyers CL.** Constitutive activation of STAT5 by the BCR-ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia. *Oncogene*. 1996 Jul 18;13(2):247-54.
- Smith LT, Hohaus S, Gonzalez DA, Dziennis SE, Tenen DG.** PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate the granulocyte colony-stimulating factor receptor Promotor in myeloid cells. *Blood*. 1996 Aug 15;88(4):1234-47.
- Smith MR, Court DW, Kim HK, Park JB, Rhee SG, Rhim JS, Kung HF.** Overexpression of phosphoinositide-specific phospholipase Cgamma in NIH 3T3 cells promotes transformation and tumorigenicity. *Carcinogenesis*. 1998 Jan;19(1):177-85.
- Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, Gish G, Pawson T, Haser WG, King F, Roberts T, Ratnofsky S, Lechleider RJ, et al.** SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell*. 1993 Mar 12;72(5):767-78.
- Sood R, Talwar-Trikha A, Chakrabarti SR, Nucifora G.** MDS1/EVI1 enhances TGF-beta1 signaling and strengthens its growth-inhibitory effect but the leukemia-associated fusion protein AML1/MDS1/EVI1, product of the t(3;21), abrogates growth-inhibition in response to TGF-beta1. *Leukemia*. 1999 Mar;13(3):348-57.
- Southern E.** Gel electrophoresis of restriction fragments. *Methods Enzymol*. 1979;68:152-76.
- Spear MA, Breakefield XO, Beltzer J, Schuback D, Weissleder R, Pardo FS, Ladner R.** Isolation, characterization, and recovery of small peptide phage display epitopes selected against viable malignant glioma cells. *Cancer Gene Ther*. 2001 Jul;8(7):506-11.
- Speck NA, Gilliland DG.** Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jul;2(7):502-13. Review.
- Spiekermann K, Biethahn S, Wilde S, Hiddemann W, Alves F.** Constitutive activation of STAT transcription factors in acute myelogenous leukemia. *Eur J Haematol*. 2001 Aug;67(2):63-71.
- Spiekermann K, Pau M, Schwab R, Schmieja K, Franzrahe S, Hiddemann W.** Constitutive activation of STAT3 and STAT5 is induced by leukemic fusion proteins with protein tyrosine kinase activity and is sufficient for transformation of hematopoietic precursor cells. *Exp Hematol*. 2002 Mar;30(3):262-71.
- Sun W, Graves BJ, Speck NA.** Transactivation of the Moloney murine leukemia virus and T-cell receptor beta-chain enhancers by cbf and ets requires intact binding sites for both proteins. *J Virol*. 1995 Aug;69(8):4941-9.
- Suzow J, Friedman AD.** The murine myeloperoxidase Promotor contains several functional elements, one of which binds a cell type-restricted transcription factor, myeloid nuclear factor 1 (MyNF1). *Mol Cell Biol*. 1993 Apr;13(4):2141-51.
- Szyrach M, Munchberg FE, Riehle H, Nordheim A, Krauter J, Nagel S, Heil G, Heidenreich O.** Cleavage of AML1/MTG8 by asymmetric hammerhead ribozymes. *Eur J Biochem*. 2001 Jun;268(12):3550-7.
- Tahirov TH, Inoue-Bungo T, Morii H, Fujikawa A, Sasaki M, Kimura K, Shiina M, Sato K, Kumasaka T, Yamamoto M, Ishii S, Ogata K.** Structural analyses of DNA recognition by the AML1/Runx-1 Runt domain and its allosteric control by CBFbeta. *Cell*. 2001 Mar 9;104(5):755-67.

Takahashi A, Satake M, Yamaguchi-Iwai Y, Bae SC, Lu J, Maruyama M, Zhang YW, Oka H, Arai N, Arai K, et al. Positive and negative regulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor Promotor activity by AML1-related transcription factor, PEBP2. *Blood*. 1995 Jul 15;86(2):607-16.

Tanaka K, Tanaka T, Kurokawa M, Imai Y, Ogawa S, Mitani K, Yazaki Y, Hirai H. The AML1/ETO(MTG8) and AML1/Evi-1 leukemia-associated chimeric oncoproteins accumulate PEBP2beta(CBFbeta) in the nucleus more efficiently than wild-type AML1. *Blood*. 1998 Mar 1;91(5):1688-99.

Tanaka T, Tanaka K, Ogawa S, Kurokawa M, Mitani K, Nishida J, Shibata Y, Yazaki Y, Hirai H. An acute myeloid leukemia gene, AML1, regulates hemopoietic myeloid cell differentiation and transcriptional activation antagonistically by two alternative spliced forms. *EMBO J*. 1995 Jan 16;14(2):341-50.

Teglund S, McKay C, Schuetz E, van Deursen JM, Stravopodis D, Wang D, Brown M, Bodner S, Grosveld G, Ihle JN. Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell*. 1998 May 29;93(5):841-50.

ten Hoeve J, Arlinghaus RB, Guo JQ, Heisterkamp N, Groffen J. Tyrosine phosphorylation of CRKL in Philadelphia+ leukemia. *Blood*. 1994 Sep 15;84(6):1731-6.

Tenen DG, Hromas R, Licht JD, Zhang DE. Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood*. 1997 Jul 15;90(2):489-519. Review.

Tobias CA, Kim D, Fischer I. Improved recombinant retroviral titers utilizing trichostatin A. *Biotechniques*. 2000 Oct;29(4):884-90.

Todaro GJ, Habel K, Green H. Antigenic and cultural properties of cells doubly transformed by polyoma virus and SV40. *Virology*. 1965 Oct;27(2):179-85

Tong AH, Drees B, Nardelli G, Bader GD, Brannetti B, Castagnoli L, Evangelista M, Ferracuti S, Nelson B, Paoluzi S, Quondam M, Zucconi A, Hogue CW, Fields S, Boone C, Cesareni G. A combined experimental and computational strategy to define protein interaction networks for peptide recognition modules. *Science*. 2002 Jan 11;295(5553):321-4.

Uchida H, Downing JR, Miyazaki Y, Frank R, Zhang J, Nimer SD. Three distinct domains in TEL-AML1 are required for transcriptional repression of the IL-3 Promotor. *Oncogene*. 1999 Jan 28;18(4):1015-22.

Uchida H, Zhang J, Nimer SD. AML1A and AML1B can transactivate the human IL-3 Promotor. *J Immunol*. 1997 Mar 1;158(5):2251-8.

Vangala RK, Heiss-Neumann MS, Rangatia JS, Singh SM, Schoch C, Tenen DG, Hiddemann W, Behre G. The myeloid master regulator transcription factor PU.1 is inactivated by AML1-ETO in t(8;21) myeloid leukemia. *Blood*. 2003 Jan 1;101(1):270-7.

Voso MT, Burn TC, Wulf G, Lim B, Leone G, Tenen DG. Inhibition of hematopoiesis by competitive binding of transcription factor PU.1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Aug 16;91(17):7932-6.

Wagner C. Molekulare Onkologie. Entstehung und Progression maligner Tumoren 2. Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York. Aktualisierte und erweiterte Auflage 1999.

- Wang D, Stravopodis D, Teglund S, Kitazawa J, Ihle JN.** Naturally occurring dominant negative variants of Stat5. *Mol Cell Biol.* 1996 Nov;16(11):6141-8.
- Wang J, Hoshino T, Redner RL, Kajigaya S, Liu JM.** ETO, fusion partner in t(8;21) acute myeloid leukemia, represses transcription by interaction with the human N-CoR/mSin3/HDAC1 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Sep 1;95(18):10860-5.
- Wang J, Sauntharajah Y, Redner RL, Liu JM.** Inhibitors of histone deacetylase relieve ETO-mediated repression and induce differentiation of AML1-ETO leukemia cells. *Cancer Res.* 1999 Jun 15;59(12):2766-9.
- Wang Q, Stacy T, Binder M, Marin-Padilla M, Sharpe AH, Speck NA.** Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Apr 16;93(8):3444-9.
- Wang S, Wang Q, Crute BE, Melnikova IN, Keller SR, Speck NA.** Cloning and characterization of subunits of the T-cell receptor and murine leukemia virus enhancer core-binding factor. *Mol Cell Biol.* 1993 Jun;13(6):3324-39.
- Ward AC, Touw I, Yoshimura A.** The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood.* 2000 Jan 1;95(1):19-29. Review.
- Wargnier A, Legros-Maida S, Bosselut R, Bourge JF, Lafaurie C, Ghysdael CJ, Sasportes M, Paul P.** Identification of human granzyme B Promotor regulatory elements interacting with activated T-cell-specific proteins: implication of Ikaros and CBF binding sites in Promotor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Jul 18;92(15):6930-4.
- Warrell RP Jr, He LZ, Richon V, Calleja E, Pandolfi PP.** Therapeutic targeting of transcription in acute promyelocytic leukemia by use of an inhibitor of histone deacetylase. *J Natl Cancer Inst.* 1998 Nov 4;90(21):1621-5.
- Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, Prentice R, Fefer A, Buckner CD, Storb R.** Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med.* 1979 May 10;300(19):1068-73.
- Weinberg RA.** Alteration of the genomes of tumor cells. *Cancer.* 1983 Jun 1;51(11):1971-5.
- Weiss B, Jacquemin-Sablon A, Live TR, Fareed GC, Richardson CC.** Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. *J Biol Chem.* 1968 Sep 10;243(17):4543-55.
- Westendorf JJ, Yamamoto CM, Lenny N, Downing JR, Selsted ME, Hiebert SW.** The t(8;21) fusion product, AML-1-ETO, associates with C/EBP-alpha, inhibits C/EBP-alpha-dependent transcription, and blocks granulocytic differentiation. *Mol Cell Biol.* 1998 Jan;18(1):322-33.
- Whitehead I, Kirk H, Kay R.** Expression cloning of oncogenes by retroviral transfer of cDNA libraries. *Mol Cell Biol.* 1995 Feb;15(2):704-10.
- Wiemels JL, Cazzaniga G, Daniotti M, Eden OB, Addison GM, Masera G, Saha V, Biondi A, Greaves MF.** Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *Lancet.* 1999a Oct 30;354(9189):1499-503.

- Wiemels JL, Ford AM, Van Wering ER, Postma A, Greaves M.** Protracted and variable latency of acute lymphoblastic leukemia after TEL-AML1 gene fusion in utero. *Blood*. 1999b Aug 1;94(3):1057-62.
- Wiemels JL, Xiao Z, Buffler PA, Maia AT, Ma X, Dicks BM, Smith MT, Zhang L, Feusner J, Wiencke J, Pritchard-Jones K, Kempinski H, Greaves M.** In utero origin of t(8;21) AML1-ETO translocations in childhood acute myeloid leukemia. *Blood*. 2002 May 15;99(10):3801-5.
- Wolford JK, Prochazka M.** Structure and expression of the human MTG8/ETO gene. *Gene*. 1998 May 28;212(1):103-9.
- Wong CW, Privalsky ML.** Components of the SMRT corepressor complex exhibit distinctive interactions with the POZ domain oncoproteins PLZF, PLZF-RARalpha, and BCL-6. *J Biol Chem*. 1998 Oct 16;273(42):27695-702.
- Xia Z, Baer MR, Block AW, Baumann H, Wetzler M.** Expression of signal transducers and activators of transcription proteins in acute myeloid leukemia blasts. *Cancer Res*. 1998 Jul 15;58(14):3173-80.
- Xu X, Leo C, Jang Y, Chan E, Padilla D, Huang BC, Lin T, Gururaja T, Hitoshi Y, Lorens JB, Anderson DC, Sikic B, Luo Y, Payan DG, Nolan GP.** Dominant effector genetics in mammalian cells. *Nat Genet*. 2001 Jan;27(1):23-9.
- Yagi R, Chen LF, Shigesada K, Murakami Y, Ito Y.** A WW domain-containing yes-associated protein (YAP) is a novel transcriptional co-activator. *EMBO J*. 1999 May 4;18(9):2551-62.
- Yang M, Wu Z, Fields S.** Protein-peptide interactions analyzed with the yeast two-hybrid system. *Nucleic Acids Res*. 1995 Apr 11;23(7):1152-6.
- Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T.** Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem*. 1990 Oct 5;265(28):17174-9.
- Yu H, Chen JK, Feng S, Dalgarno DC, Brauer AW, Schreiber SL.** Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell*. 1994 Mar 11;76(5):933-45.
- Yuan Y, Zhou L, Miyamoto T, Iwasaki H, Harakawa N, Hetherington CJ, Burel SA, Lagasse E, Weissman IL, Akashi K, Zhang DE.** 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*. 2001 Aug 28;98(18):10398-403.
- Zaiman AL, Lewis AF, Crute BE, Speck NA, Lenz J.** Transcriptional activity of core binding factor-alpha (AML1) and beta subunits on murine leukemia virus enhancer cores. *J Virol*. 1995 May;69(5):2898-906.
- Zeng C, McNeil S, Pockwinse S, Nickerson J, Shopland L, Lawrence JB, Penman S, Hiebert S, Lian JB, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS.** Intranuclear targeting of AML/CBFalpha regulatory factors to nuclear matrix-associated transcriptional domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Feb 17;95(4):1585-9.
- Zhang DE, Fujioka K, Hetherington CJ, Shapiro LH, Chen HM, Look AT, Tenen DG.** Identification of a region which directs the monocytic activity of the colony-stimulating factor 1 (macrophage colony-stimulating factor) receptor Promotor and binds PEBP2/CBF (AML1). *Mol Cell Biol*. 1994 Dec;14(12):8085-95.

Zhang J, Spring H, Schwab M. Neuroblastoma tumor cell-binding peptides identified through random peptide phage display. *Cancer Lett.* 2001 Oct 10;171(2):153-64.

Zhang T, Kee WH, Seow KT, Fung W, Cao X. The coiled-coil domain of Stat3 is essential for its SH2 domain-mediated receptor binding and subsequent activation induced by epidermal growth factor and interleukin-6. *Mol Cell Biol.* 2000 Oct;20(19):7132-9.

Zhang X, Darnell JE Jr. Functional importance of Stat3 tetramerization in activation of the alpha 2-macroglobulin gene. *J Biol Chem.* 2001 Sep 7;276(36):33576-81.

Zhang X, Wrzeszczynska MH, Horvath CM, Darnell JE Jr. Interacting regions in Stat3 and c-Jun that participate in cooperative transcriptional activation. *Mol Cell Biol.* 1999 Oct;19(10):7138-46.

Zhu H, Bilgin M, Bangham R, Hall D, Casamayor A, Bertone P, Lan N, Jansen R, Bidlingmaier S, Houfek T, Mitchell T, Miller P, Dean RA, Gerstein M, Snyder M. Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science.* 2001 Sep 14;293(5537):2101-5.

Zhu X, Yeaton JE, Burden SJ. AML1 is expressed in skeletal muscle and is regulated by innervation. *Mol Cell Biol.* 1994 Dec;14(12):8051-7.

7. Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATRA	all-trans-Retinolsäure
bp	Basenpaar
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
CBFβ	core binding factor β
CIP	Calf Intestine Phosphatase
CLL	Chronisch lymphatische Leukämia
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EBNA	Epstein-Barr-Kernantigen
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescence protein
ENU	N-ethyl-N-nitrosourea
env	Hüllprotein, envelop
ETO	Eight-Twenty-One
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
G418	Geneticin
gag	retrovirales Gen, das für Strukturproteine (gruppenspezifisches Antigen) kodiert

Gal4-DBD	DNA-Bindungsdomäne eines hefespezifischen Transkriptionsfaktors (β -Galactosidase)
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GCV	Ganciclovir
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
GST	Glutathion-S-Transferase
GvHD	graft versus host disease
GvL	graft versus leukemia
HBS	Hepes buffered Saline
HDAC	Histon-Deacetylase
HR	Hoch-Risiko
HSV	Herpes simplex virus I
hu	human
IL-3	Interleukin 3
IP	Immunpräzipitation
IRES	Internal Ribosomal Entry Site
kDa	Kilodalton
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
LTR	long terminal repeat
M	Molar
MDS	myelodysplastic syndrome
MEF	myeloid ets factor.
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MPSV	murine-proliferating-sarcoma virus
MW	Molekulargewicht
NCoR	nuclear receptor corepressor
Neo	Neomycinphosphotransferase
ng	Nanogramm
NHR	Nervy Homologie Region
NOD	nonobese diabetic
OD	Optische-Dichte
pA	poly A-Signal

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PLZF	Promyelocytic Leukemia Zinc Finger
PML	Promyelozytic Leukemia
pol	Gen, das für die retroviralen Proteine reverse Transkriptase, Integrase, RNaseH und Protease kodiert
PS	Phosphatidylserin
PST	Prolin/Serin/Threonin
Puro	Puromycin
RAR	Retinsäure-Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkription
RT	Raumtemperatur
SCID	severe combined immunodeficiency
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SEM	standard error of means
SFFV	spleen focus forming virus
SH2	Src Homologie-Domäne
SV40	simian virus 40
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEL	Gen, das für einen Transkriptionsfaktor der ETS-Familie kodiert
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TK	Thymidinkinase-Promotor
tkneo	Fusionsgen bestehend aus Thymidinkinase und Neomycin-Phosphotransferase II
Tris	2-Amino-2-Hydroxymethylpropan-1,3-diol
TSA	Trichostatin A
TU	transducing units
U	units
UAS	upstream activating signal; DNA-Bindungsstelle der Gal4-DBD
V	Volt
Vol	Volumen
VSV-G	Glykoprotein G des Vesikulären Stomatitisvirus
WPRE	Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element
wt	Wildtyp

KONGREßBEITRÄGE UND VERÖFFENTLICHUNGEN

KONGREßBEITRÄGE

Hildebrand D, **Schüle S**, Tiefenbach J, Heinzl T, Grez M and Maurer A.

A core repressor domain in AML1/ETO is required for interaction with Sin3A and transcriptional repression.

International Society for Experimental Hematology (ISEH), Tokyo 2001.

Schüle S, Hildebrand D and Grez M.

Inhibition of ETO mediated repression of gene expression by interfering peptides.

European Hematology Association (EHA), Florenz 2002.

VERÖFFENTLICHUNGEN

Scherr M, Battmer K, Eder M, Schüle S, Hohenberg H, Ganser A, Grez M, Blomer U.

Efficient gene transfer into the CNS by lentiviral vectors purified by anion exchange chromatography. Gene Ther. 2002 Dec;9(24):1708-14.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Chemotherapeutischen Forschungsinstitut Georg-Speyer-Haus in Frankfurt am Main unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Bernd Groner in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Manuel Grez angefertigt.

Herrn Prof. Bernd Ludwig danke ich für die freundliche Betreuung dieser Arbeit im Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität.

Herrn Prof. Dr. Bernd Groner danke ich sehr für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Meine besonderer Dank gilt Herrn Dr. Manuel Grez für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Übernahme der Betreuung im Georg-Speyer-Haus. Seine fachliche Unterstützung war für die Durchführung dieser Arbeit unverzichtbar.

Herrn Dr. Alexander Maurer danke ich für die gute fachliche und persönliche Betreuung. Seine immerwährend optimistische Einstellung und seine konstruktive Diskussionsbereitschaft habe ich sehr geschätzt.

Herrn Dr. Stephan Feller danke ich für die gute Kooperation und die Überlassung der SH2-GST-Fusionsproteine.

Herrn Dr. Stefan Stein danke ich für die zahlreichen fachlichen Diskussionen und die vielen praktischen Ratschläge.

Herrn Christian Herder und Frau Beate Glaeser danke ich herzlich für die konstruktiven Korrekturvorschläge und ihre Geduld bei der Durchsicht dieser Arbeit.

Den Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe danke ich für die gute Zusammenarbeit und ihre Unterstützung. Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Daniela Hildebrand für ihre Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Zusammenarbeit am AML1/ETO-Projekt. Darüber hinaus danke ich Hana Kunkel, die mir mit ihrer bemerkenswerten Menschenkenntnis immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Christian Herder, Helga Frentzen, Kristin Junker, Till Wenger und Anne Gaußmann danke ich für ihre Freundschaft.

Meiner Freundin Grit Hackenberg möchte ich für ihr Vertrauen, ihre Unterstützung und ihre Geduld insbesondere während der letzten sechs Monate danken. Darüber hinaus danke ich Christian Herder, Daniela Hildebrand, Kathrin Kummer und Nicole Gilla für ihre Freundschaft und ihren Humor bei der ein oder anderen Flasche Rotwein!

Bei meinen Eltern Margret & Fried möchte ich mich für ihre Unterstützung und ihre unendliche Zuversicht im allgemeinen bedanken, denn Froh zu sein bedarf es wenig! Darüber hinaus danke ich meinen Geschwistern Mark, Amelie, Carla & Rick...!

LEBENS LAUF

DATEN ZUR PERSON

Name	Silke Schüle
Geburtsdatum	19.06.1972
Geburtsort	Singen am Hohentwiel
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

AUSBILDUNG

1999-2003	Promotionsstudentin des Fachbereichs Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang-Goethe Universität, Frankfurt am Main. Die Promotionsarbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Manuel Grez, im Georg-Speyer-Haus, Frankfurt am Main angefertigt.
1999	Praktikum im Stoffwechsellabor der Kinderheilkunde I, der Universitätsklinik Frankfurt am Main, unter der Leitung von Prof. Dr. Böhles.
1993-1999	Studium der Oecotrophologie mit Fachrichtung Ernährungswissenschaften an der Justus-Liebig-Universität, Gießen. <u>Thema der Diplomarbeit:</u> Charakterisierung des renalen Peptidtransporters PepT2 nach heterologer Expression in SF21-Zellen. Die Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Hannelore Daniel, im Institut für Ernährungswissenschaften angefertigt.
1990-1993	Allgemeine Hochschulreife. Ernährungswissenschaftliches-Gymnasium, Waldshut.
1983-1990	Realschule, Titisee-Neustadt.
1979-1983	Grundschule, Singen am Hohentwiel.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich keiner anderen Hilfsmittel als der angegebenen bedient habe. Entlehnungen aus anderen Schriften sind als solche kenntlich gemacht.

Frankfurt am Main, den

.....

Silke Schüle