

Aus dem Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und
Immunologie an der Universität Hamburg –
Wissenschaftlicher Direktor: Herr Dr. Heinrich Hohenberg

**Untersuchungen zur Rolle des
Transkriptionsfaktors C/EBP α bei der normalen
und aberranten Hämatopoese mit Hilfe der RNA-
Interferenz Methode**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Gabriela Bernadeta Iwanski

aus Lublin

Hamburg 2006

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

an der Universität Hamburg am: 20.03.2007

Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende : Herr Prof. Klaus Harbers

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Herr PD Dr. Boris Fehse

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Herr PD Dr. Martin Horstmann

Für meine Eltern

Zusammenfassung

Die vorliegende Doktorarbeit hatte zum Ziel, einen Beitrag zu liefern, die Bedeutung des Transkriptionsfaktors $C/EBP\alpha$ sowohl für die normale Hämatopoese wie auch für die Entstehung der akuten myeloischen Leukämie (AML) besser zu verstehen. Das *CEBPA*-Gen ist in circa 25% aller AML-Patienten mutiert oder runterreguliert. Um zu verstehen, welche Bedeutung eine reduzierte Expression von *CEBPA* für die humane Myelopoese hat, wurde die Expression des *CEBPA*-Gens mit Hilfe der RNA-Interferenz (RNAi) – Methode teilweise ausgeschaltet und der Effekt auf die Differenzierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen des Menschen untersucht. Im ersten Teil der Arbeit wurde die RNAi-Methode für *CEBPA* und zum Vergleich für *TEL*, das ebenfalls für einen Transkriptionsfaktor kodiert, etabliert. Verschiedene kurze RNA-Stücke (siRNA) wurden mit Hilfe des Vektors pSUPER bzw. retroviraler Vektoren mit einer SUPER-Kassette exprimiert. Die Effektivität der jeweiligen siRNAs wurde in Zelllinien getestet, die *CEBPA* bzw. *TEL* transient oder stabil in Form von bizistronischen mRNAs exprimieren, die zusätzlich für ein Fluoreszenzprotein kodieren. Die RNAi-vermittelte Reduktion der Expression von *CEBPA* bzw. *TEL* konnte daher als Veränderung der Fluoreszenz mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen werden. Auf diese Weise wurden zwei siRNAs, die die Expression von *CEBPA* deutlich reduzieren, identifiziert und für die weiteren Versuche eingesetzt. Ein Vergleich verschiedener retroviraler Vektoren hinsichtlich der Expression von siRNA zeigte, dass die sog. SIN-Vektoren, bei denen die Enhancerregion in der LTR deletiert ist, besonders gut für diese Zwecke geeignet sind. Dieser Befund ist von großem praktischem Interesse für alle RNAi-Experimente, bei denen retrovirale Vektoren benutzt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht, welchen Effekt eine reduzierte *CEBPA*-Expression auf die Differenzierung von humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen hat. Zu diesem Zweck wurde in $CD34^+$ -Zellen mit Hilfe des oben genannten retroviralen Vektors siRNA exprimiert, die die Expression von *CEBPA* erniedrigt. Die infizierten und sortierten $CD34^+$ -Zellen wurden in Flüssigkulturen sowie im semisoliden Medium (CFU-C Assay) zur Differenzierung gebracht. Es zeigte sich, dass ein reduzierter Level an $C/EBP\alpha$ zu einem Differenzierungsblock in der myeloiden Abstammungsreihe führt, der gekennzeichnet ist durch eine verringerte Anzahl von reifen Granulozyten und dem Auftreten von unreifen, maligne aussehenden Zellen. Dieser

Befund macht deutlich, wie wichtig dieser Transkriptionsfaktor für die myeloide Differenzierung beim Menschen ist. Auffallend war weiterhin, dass nach Runterregulation von *CEBPA* das Verhältnis von myeloiden zu erythroiden Zellen erniedrigt war. Anhand der absoluten Kolonienzahl im CFU-C Assay konnte gezeigt werden, dass die Ursache hierfür nicht ein verringertes Kommitment für die myeloide Differenzierung sondern eine verringerte Proliferation der für die myeloide Differenzierung bereits festgelegten Zellen war. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass eine Reduktion der *CEBPA* Expression zu einem Differenzierungsblock führt, der dem bei AML entspricht. Allerdings haben die differenzierungsblockierten Zellen nur eine begrenzte Proliferationskapazität. Daher sind für die Entstehung einer reifen AML weitere Ereignisse erforderlich.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Hämatopoese.....	1
1.1.1 Stammzellen der Hämatopoese.....	2
1.1.2 Regulation der Hämatopoese.....	3
1.2 Leukämogenese.....	4
1.2.1 Einteilung der Leukämien.....	5
1.2.2 Molekulare Pathomechanismen der AML.....	7
1.2.3 Rolle der Transkriptionsfaktoren bei der AML.....	8
AML1.....	9
PU.1.....	9
C/EBP α	10
TEL.....	12
1.3 Small Interfering RNA (siRNA).....	13
1.3.1 Mechanismus der RNA-Interferenz.....	13
1.3.2 Stabile Expression von shRNAs in Säugetierzellen.....	15
1.4 Fragestellung.....	16
2. Material und Methoden	17
2.1 Material.....	17
2.1.1 Mikrobiologie.....	17
2.1.2 Molekularbiologie.....	17
2.1.3 Zellkultur.....	20
2.2 Methoden.....	23
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	23
Arbeiten mit DNA.....	23
Arbeiten mit RNA.....	28
Protein- Analyse.....	28
2.2.2 Mikrobiologische Methoden.....	30
2.2.3 Zellbiologische Methoden.....	31
Infektion von Zielzellen.....	33
Arbeiten mit hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen.....	33
2.2.4 Etablierung des Testmodells für shRNAs der RNAi-Methode.....	38
Etablierung der Zelllinien SC1/mutCEBPA-YFP und SC1/mutTEL- eGFP.....	39
3. Ergebnisse	40
3.1 Etablierung der RNA-Interferenz (RNAi) – Methode für die Transkriptionsfaktoren CEBP/ α und TEL.....	40
3.1.1 Identifizierung von genspezifischen Zielsequenzen für die RNA-Interferenz.....	40
3.1.2 Transiente Expression zur funktionellen Charakterisierung von shRNAs.....	42
3.1.3 Retrovirale Vektoren zur stabilen Expression von shRNA.....	45
3.1.4 Reduktion der Expression von <i>CEBPA</i> und <i>TEL</i> mit Hilfe retroviral exprimierter shRNAs.....	48
3.1.5 siRNA-vermittelte Reduktion von endogenem C/EBP α	53
3.2 RNAi-vermittelte Reduktion der Expression von CEBPA in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen des Menschen.....	56
3.2.1 Infektion und Sortierung der CD34 ⁺ -Zellen.....	56
3.2.2 siRNA-vermittelte Reduktion des <i>CEBPA</i> -Transkriptionslevels in CD34 ⁺ -Zellen.....	58
3.2.3 Differenzierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen in Flüssigkultur.....	59
3.2.4 Differenzierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen im CFU-C Assay.....	65

4. Diskussion	73
4.1 Knockdown von Genen mit Hilfe der RNAi-Methode	73
4.2 Expression von siRNA mit Hilfe des retroviralen SIN-Vektors	76
4.3 Rolle des Transkriptionsfaktors C/EBP α bei der Hämatopoese und Leukämogenese.....	77
4.4 Rolle von C/EBP α beim myeloiden Lineage Commitment.....	78
5. Literaturverzeichnis	82
6. Abkürzungsverzeichnis	100
7. Abbildungsverzeichnis	104
8. Tabellenverzeichnis	106
9. Publikationen in Verbindung mit dieser Arbeit	107
10. Danksagung	108
11. Lebenslauf	109

1. Einleitung

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine der häufigsten Krebserkrankungen des menschlichen Blutsystems, die Erwachsene wie auch Kinder betrifft, und deren Therapiemöglichkeiten weder ausgeschöpft sind noch eine Heilung garantieren. Der Ursprung der AML liegt auf der Ebene der hämatopoetischen Stammzelle bzw. den aus ihr hervorgehenden frühen Vorläuferzellen der Hämatopoese, wobei die Mechanismen der leukämogenen Transformation dieser Zellen noch nicht ausreichend verstanden sind. Es ist daher von großer Bedeutung, Kenntnisse über Eigenschaften und Differenzierung der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen zu erlangen, um daraus die Schlüsselschritte ihrer malignen Transformation verstehen zu können. Die in dieser Arbeit angewandte Methode der RNA-Interferenz (siehe Kapitel 1.3) liefert für die Erlangung dieser Kenntnisse einen großen Beitrag. Sie könnte darüberhinaus in der Entwicklung neuer selektiver und für den Patienten womöglich schonender Therapien im Sinne der „molecular targeted therapy of cancer“ (MTTC) von entscheidender Bedeutung sein.

1.1 Hämatopoese

Die Blutbildung (Hämatopoese) wird unterteilt in die Myelo- und die Lymphopoese (siehe Abb.1). Die Myelopoese beinhaltet dabei die Bildung von Erythrozyten (Erythropoese), Granulozyten (Granulopoese), Monozyten (Monopoese) und Thrombozyten (Megakaryopoese). Diese Zellen bilden zusammen mit ihren Vorläufern das sogenannte myeloische System, deren Bildungsort das blutbildende, rote Knochenmark (*medulla ossium rubra*) ist. Die Lymphopoese findet sowohl im Knochenmark als auch in den lymphatischen Geweben des Körpers statt und führt zur Bildung von B- und T-Lymphozyten, die eine essentielle Rolle bei der erworbenen Immunantwort des menschlichen Organismus durch klonale Rearrangements von Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptorgenen spielen (Wulfhekel und Düllmann, 1994). Myelo- und Lymphopoese entspringen aus einer gemeinsamen Zelle, der hämatopoetischen Stammzelle (*hematopoietic stem cell*, HSC), die den Bestand des Blutsystems durch eine Vielzahl besonderer Eigenschaften sichert (siehe Abb.1 und Kap. 1.1.1).

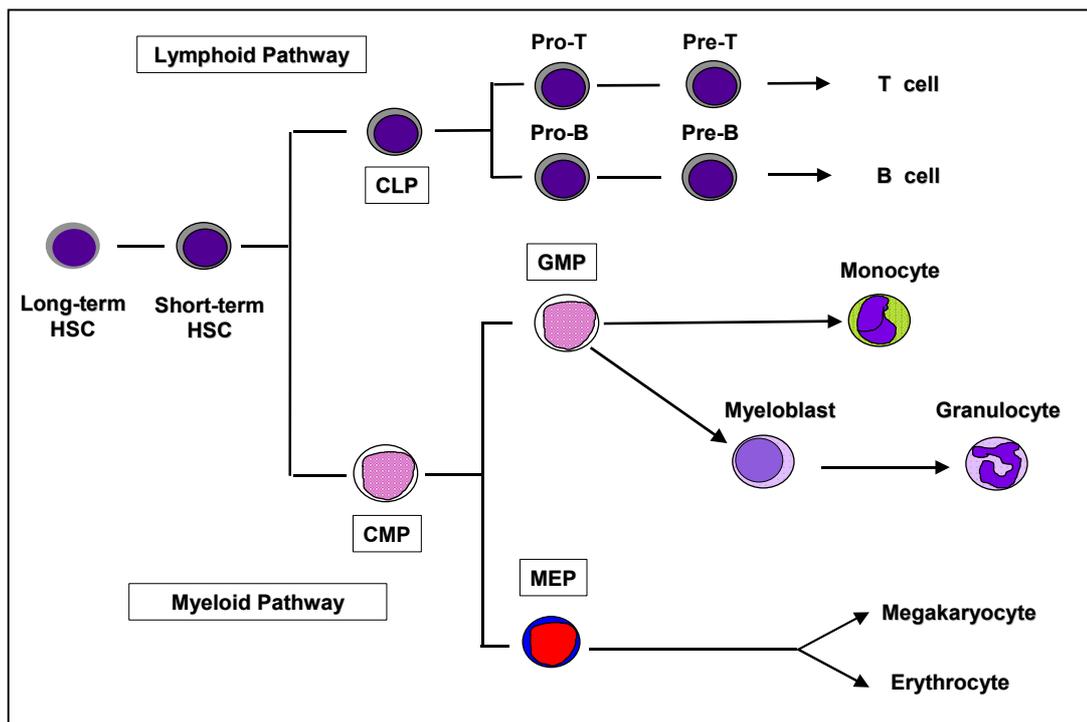


Abb.1. Myelo- und Lymphopoese

Abgebildet ist schematisch die Entstehung der myelo- und der lymphozytären Abstammungsreihe. Abgeändert aus Tenen, 2003. Einzelheiten siehe Text. CLP = common lymphoid progenitor, CMP = common myeloid progenitor, GMP= granulocyte-macrophage-progenitor, HSC= hematopoietic stem cell, MEP= megakaryocyte-erythrocyte-progenitor.

1.1.1 Stammzellen der Hämatopoese

Das blutbildende, rote Knochenmark ist der Sitz der HSC. Ihre Tochterzellen kehren im Prozess der Selbsterneuerung zum Stammzellpool zurück oder differenzieren unter der Regulation bestimmter hämatopoetischer Wachstums- und Differenzierungsfaktoren zu den oben genannten reifen Blutzellen. HSC haben außerdem eine extensive Proliferationskapazität sowie eine lange Überlebensfähigkeit (Orkin, 2000, Gilliland et al., 2004).

Innerhalb der HSC unterscheidet man die Langzeit-hämatopoetische Stammzelle (*long term HSC*), aus der sich die Kurzzeit-hämatopoetische Stammzelle (*short term HSC*) entwickelt (siehe Abb.1). Diese Bezeichnungen beruhen auf Ergebnissen von Tierversuchen, in denen die HSC nach Injektion in letal bestrahlte Mäuse/Ratten die Hämatopoese für drei bzw. weniger als drei Monate aufrechterhalten konnten (Dexter et al., 1990; Keller und Snodgrass, 1990).

Aus der Kurzzeit-HSC entsteht die pluripotente Stammzelle, die teilungs- und differenzierungsfähig ist und aus ihr die multipotenten Stammzellen, mit mehr oder weniger eingeschränkter Teilungs- und Selbsterneuerungspotenz. Aus den multipotenten Stammzellen entwickeln sich die unipotenten Vorläuferzellen der myeloischen (CMP = *common myeloid progenitor*) und lymphatischen (CLP = *common lymphoid progenitor*) Abstammungsreihe (Manz et al., 2002; Hao et al., 2001; Akashi et al., 2000; siehe Abb.1). Die unipotenten Vorläuferzellen sind insoweit determiniert, als dass sich aus ihnen entweder Erythrozyten, Thrombozyten, basophile und eosinophile Granulozyten oder B- und T-Lymphozyten entwickeln können. Es wird angenommen, dass die Differenzierung der neutrophilen Granulozyten sowie der Monozyten/Makrophagen aus einer gemeinsamen, bipotenten Stammzelle entspringt (Radomska et al., 1998; Whetton et al., 1994).

Eine wichtige Eigenschaft der Vorläuferzelle, die sie von anderen Zellen unterscheidet, ist ihre Fähigkeit zur Bildung von Zellkolonien, den sog. CFUs (*colony forming units*), *in vivo* und *in vitro*. Die Anzahl der Kolonien korreliert dabei mit der Zellmenge. Die Bildung der CFUs ist abhängig von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren (Wulfhekel und Düllmann, 1994). Untersuchungen haben ergeben, dass hämatopoetische Zellen zusätzlich eine Differenzierungsplastizität (*hematopoietic lineage plasticity*) besitzen. Diese ist dadurch gekennzeichnet, dass die Differenzierung nicht nur teilweise reversibel ist, sondern auch von einer Entwicklungsreihe in die andere wechseln kann (Graf, 2002). So können die CLPs beispielsweise umprogrammiert werden und myelomonozytische Eigenschaften bekommen, indem sie sich unter bestimmten Kulturbedingungen zu GMPs (*granulocyte/macrophage progenitors*) oder sogar direkt zu neutrophilen Granulozyten oder Makrophagen entwickeln. Die GMPs können sich in MEPs (*megakaryocyte/erythrocyte progenitors*) umwandeln oder direkt in die Erythroblasten oder Megakaryozyten (Akashi et al., 2000; Kondo et al., 1997).

1.1.2 Regulation der Hämatopoese

Die Proliferation und Differenzierung der CD34⁺-HSC ebenso wie ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Apoptose wird zum einen von Wachstumsfaktoren und zum anderen von Transkriptionsfaktoren reguliert (Orkin, 2000). Auf diese Weise können die kurzlebigen Zellen des Blutsystems durch eine begrenzte Anzahl dieser HSCs, die ca. 0,1% der kernhaltigen Zellen des Knochenmarks ausmachen, mittels sich schnell teilender transienter Zellpopulationen ersetzt werden (Domen und Weissman, 1999;

Morrison et al., 1995). Zu den hämatopoetischen Wachstumsfaktoren zählen bestimmte Kolonie-stimulierende Faktoren (CSF), wie GM-CSF (*granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*), G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*) und M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*). Aber auch Interleukine (IL), vor allem IL-3 sowie Erythropoetin und SCF (*stem cell factor*) spielen in der Hämatopoese eine wichtige Rolle. Die Kolonie-stimulierenden Faktoren werden auch als Zytokine bezeichnet und gehören zu den extrinsischen Regulatoren der Hämatopoese. Sie haben nicht nur Einfluss auf die Proliferation der hämatopoetischen Stammzelle, sondern sichern auch die Überlebensfähigkeit dieser Zellen (Lotem und Sachs, 1999). Sie binden an Oberflächenrezeptoren von Zellen, die Signaltransduktionswege für die Regulation von Transkriptionsfaktoren aktivieren (Kondo et al., 2003) und sorgen somit für die Feinabstimmung der Genexpression der Transkriptionsfaktoren (Zhu und Emerson, 2002).

Die Zytokine werden von Fibroblasten bzw. fibroblastischen Retikulumzellen sezerniert, die wiederum von Stromazellen des Knochenmarks gebildet werden. Dieses sogenannte Mikromilieu (*microenvironment*) des Knochenmarks besteht aus feinen Retikulinfasern, die sich aus Fibronectin und Kollagen Typ III zusammensetzen sowie aus extrazellulärer Matrix (Kondo et al., 2003).

An der Regulation der Hämatopoese sind auch endogene Transkriptionsfaktoren beteiligt. Sie spielen eine große Rolle bei der Differenzierung in verschiedene Zelltypen (Shivdasani und Orkin, 1996; Orkin, 1995).

In dieser Arbeit wird vor allem auf Transkriptionsfaktoren eingegangen, die die myeloische Differenzierung beeinflussen. Diese Transkriptionsfaktoren, zu denen u.a. PU.1, C/EBP α und AML1 (s. Kapitel 1.2.3) gehören, haben nicht nur einen essentiellen Einfluss auf die normale myeloische Differenzierung, sondern scheinen auch eine Rolle bei der Leukämogenese spielen zu können (Rabbitts, 1994; Nichols und Nimer., 1992; Lubbert et al., 1991).

1.2 Leukämogenese

Myeloproliferative Erkrankungen sind neoplastische Proliferationen von Knochenmarkzellen mit variablen und vielfältigen Erscheinungsformen ausgehend von einer Störung der hämatopoetischen Stammzelle und ihrer Entwicklung. Leukämie bedeutet „weißes Blut“ und bezieht sich auf die verbreiterte Leukozytenmanschette (*buffy coat*) auf der Erythrozytensäule nach Zentrifugieren des Blutes bei

Leukämiepatienten mit sehr hoher Leukozytenzahl. Virchow prägte den Begriff bei einer chronischen myeloischen Leukämie (Sell, 2006).

Als Mitverursacher primär leukämogener Transformationen werden u.a. ionisierende Strahlen, chemische Substanzen und/oder onkogene Viren vermutet. Aber auch genetische Dispositionen gehören dazu, wobei die meisten Mechanismen noch unzureichend geklärt sind. Zu den Folgen einer manifestierten Leukämie gehört die Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark gefolgt von Anämie und Granulozytopenie mit Infektanfälligkeit. Außerdem treten Thrombozytopenie mit daraus resultierender Blutungsneigung sowie mögliche Funktionsausfälle von mit Tumorzellen infiltrierten Organen auf.

1.2.1 Einteilung der Leukämien

Innerhalb der verschiedenen Leukämien unterscheidet man entsprechend ihrem Verlauf und der Morphologie der Tumorzellen die akuten von den chronischen Leukämien sowie die myeloischen von den lymphatischen Leukämien. Ihre Prognose hängt u. a. von der initialen Leukozytenanzahl, dem Lebensalter, der Zytogenetik als auch von bestimmten Subtypen ab.

Akute Leukämien sind klonale Neoplasien hämatopoetischer Stammzellen und ihrer Abkömmlinge mit autonomer Proliferation, gestörter Ausreifung und Ausschwemmung unreifer Blasten in das periphere Blut. Der maligne Zellklon teilt sich dabei nachweislich ungehemmt, verdrängt die Hämatopoese im Knochenmark und ist in den meisten Formen akuter Leukämien als Leukozytose im Blut nachweisbar. Aleukämische Verlaufsformen sind eher die Ausnahme.

Zur Diagnosesicherung, aber auch zur Klassifikation und Feststellung der Prognose einer Leukämie, gehören führend die morphologische und zytochemische Untersuchung der Knochenmarkbiopsie. Zusätzlich sollte durch Bestimmung von Oberflächenmarkern als auch von spezifischen chromosomalen Aberrationen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) die Zyto- und Molekulargenetik festgelegt werden. Auch eine (immun-) histologische Bewertung einer Knochenmarkbiopsie kann in einigen Fällen zur Diagnosesicherung beitragen.

Die *akute myeloische Leukämie* (AML) ist eine Tumorerkrankung mit einem medianen Erkrankungsalter von 63 Jahren und einer Inzidenz von derzeit 2-4 Fällen/100 000 Einwohner pro Jahr.

Myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome können zur Entstehung der sog. sekundären akuten myeloischen Leukämien führen. Eine sekundäre AML kann sich außerdem nach einer Chemotherapie insbesondere mit Alkylanzien und Alkaloiden oder nach einer Radiotherapie entwickeln (Scheinberg et al., 2001). Auch aus einer aplastischen Anämie oder einer PNH (Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie) kann sich eine AML entwickeln. Kongenitale Syndrome wie das Fanconi-, Down-, Diamond-Blackfan- und das Kostmann-Syndrom scheinen das relative Risiko für die Entwicklung einer AML zu erhöhen (Scheinberg et al., 2001).

Die AML wird anhand der FAB-Kriterien (French-American-British-Cooperative-Group) unter Berücksichtigung morphologischer Kriterien in acht Untergruppen eingeteilt (siehe Tab.1) Die Therapie besteht aus systemischer Polychemotherapie und gegebenenfalls einer allogenen bzw. autologen peripheren Stammzelltransplantation (PBSCT) oder Knochenmarktransplantation (KMT) (Lowenberg et al., 2001).

AML-M0	akute myeloische Leukämie mit minimaler myeloischer Differenzierung
AML-M1	akute Myeloblastenleukämie ohne Ausreifung
AML-M2	akute Myeloblastenleukämie mit Ausreifung
AML-M3	akute Promyelozytenleukämie
AML-M4	akute myelomonozytäre Leukämie
AML-M4Eo	akute myelomonozytäre Leukämie mit Eosinophilie
AML-M5a	akute Monoblastenleukämie
AML-M5b	akute Monozytenleukämie
AML-M6	akute Erythroleukämie
AML-M7	akute Megakaryoblastenleukämie

Tab.1. FAB-Subtypen der AML

Dargestellt sind die Untergruppen der akuten myeloischen Leukämien, die anhand morphologischer Kriterien von der FAB (French-American-British-Cooperative-Group) eingeteilt sind.

Zu den Leukämien des Menschen zählen außerdem noch die akute lymphatische Leukämie (ALL), die chronische myeloische Leukämie (CML) sowie die chronische lymphatische Leukämie (CLL), auf die im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter eingegangen wird.

Der Betrachtungsschwerpunkt dieser Arbeit beruht auf der AML, da die in dieser Arbeit untersuchten Transkriptionsfaktoren C/EBP α und TEL eine mögliche Rolle in ihrer Entwicklung zu spielen scheinen.

1.2.2 Molekulare Pathomechanismen der AML

Zu den molekularen Pathomechanismen der AML gehören chromosomale Translokationen, Punktmutationen sowie Deletionen, die u. a. Transkriptionsfaktoren betreffen und/ oder bestimmte Signaltransduktionswege stören (siehe unten). Genotypische und epidemiologische Untersuchungen von AML-Zellen haben gezeigt, dass diese häufig mehr als eine Mutation aufweisen. Auch die Ergebnisse von Tierversuchen postulieren die sog. „*multistep pathogenesis*“ der AML (Gilliland et al., 2004).

Die Translokationen t(8;21) bei der AML-M2 und t(15;17) bei AML-M3 haben ebenso wie die Inversion inv(16) bei AML-M4Eo in Patienten mit diagnostizierter AML eine relativ gute Prognose, wenn sie mit einer Induktions-Chemotherapie und einer intensiven Konsolidierungs-Chemotherapie behandelt werden (Buechner et al., 2005). Die Translokation t(8;21) führt zur Entstehung des Fusionsproteins AML1-ETO, welches die Eigenschaften eines transkriptionellen Repressors hat und eine kritische Rolle in der Entstehung der AML-M2 zu spielen scheint (Schwieger et al., 2002; Burel et al., 2001; Erickson et al., 1992). Eine dagegen schlechtere Prognose haben die Deletionen 5q-, 7q- und t11q;23 Rearrangements bei der AML (Gilliland und Tallman, 2002).

Punktmutationen können zu einer Onkogen-Aktivierung durch eine sogenannte „*gain-of-function*“ Mutation führen. So treten beispielsweise in *NRAS*- und *KRAS*-Proto-Onkogenen in 25% bzw. 15% der AML-Patienten Punktmutationen auf und führen zu einer Abschaltung der intrinsischen RAS-GTPase-Aktivität einhergehend mit einer Aktivierung von RAS (Reuter et al., 2000). Die „*gain-of-function*“ Mutationen treten ebenfalls bei den Tyrosinkinasen KIT und FLT3 auf, die wiederum die Signaltransduktion von RAS aktivieren können (Stirewalt und Radich, 2003).

Die Tyrosinkinase c-KIT ist ein Rezeptor für den SCF und ist in ca. 80% der AML-Blasten nachweisbar (Linnekin, 1999). Die extrazellulär gelegenen Exon 8 Mutationen des c-KIT sind in 20-30% der AML-Patienten mit der t(8;21) bzw. der inv(16) nachweisbar und gehen mit einer erhöhten Rezidivwahrscheinlichkeit einher (Cammenga, 2005; Valk et al., 2004; Care et al., 2003; Gari et al., 1999). Diese Mutationen verursachen über eine Rezeptor-Dimerisierung eine Aktivierung des Rezeptors und können die MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) ebenso wie PIK3

(Phosphoinositolkinase 3) aktivieren, wodurch es zu einer Änderung der Genexpression kommt (Cammenga, 2005)

FLT3-Mutationen sind bei ca. 30- 35% der AML-Patienten nachweisbar und gehen mit einer schlechten Prognose für Patienten unter 65 Jahre einher (Gilliland und Griffin, 2002). 20- 25% der AML-Patienten besitzen eine interne Tandemduplikation (ITD) in diesem Tyrosinkinase-Rezeptor (Fröhling et al., 2002; Kiyoi et al., 1999). Die ITD führt zu einer Liganden-unabhängigen Rezeptor-Dimerisierung und der daraus resultierenden persistierenden Aktivierung der Tyrosinkinase-Domänen. Auf diese Weise werden Signaltransduktionswege von MAPK, RAS und STAT5 (*signal transducer and activator of transcription 5*) eingeschaltet (Stirewalt und Radich, 2003). FLT3-ITDs sind nachweisbar in CD34⁺/CD38⁻ primären AML-Zellen (Levis et al., 2005), so dass sie in der AML-Stammzellpopulation eine Rolle in der Entstehung dieser Erkrankung spielen könnten (Jordan und Guzman, 2004; Warner et al., 2004). Interessanterweise hemmen FLT3-ITDs die Genexpression der Transkriptionsfaktoren *CEBPA* und *PU.1*, die insbesondere für die myeloide Differenzierung bedeutend sind (Zheng et al., 2004; Mizuki et al., 2003). Stromabwärts gelegene Ziele von FLT3, u. a. NF- κ B und Akt, induzieren in leukämischen Stammzellen (LSC) deren Überlebensfähigkeit (Gilliland et al., 2004).

1.2.3 Rolle der Transkriptionsfaktoren bei der AML

Der Entstehung der AML liegt u. a. eine gestörte Differenzierung zugrunde, wobei bis heute nicht geklärt ist, ob der Differenzierungsblock durch einen oder mehrere Mechanismen verursacht wird. Linienspezifische Differenzierungsfaktoren spielen in der Hämatopoese eine große Rolle. Aber auch in der Entstehung einer AML scheinen abnormale Transkriptionsfaktoren von Bedeutung zu sein, worauf Untersuchungen von AML, in denen keine anderen Mutationen oder chromosomalen Aberrationen nachweisbar sind, hinweisen (Rosenbauer et al., 2005). Für die Untersuchungen zur Funktion der Transkriptionsfaktoren wurden diese entweder überexprimiert oder ihre Expression unterdrückt. Anhand der Ergebnisse wurden die hämatopoetischen Transkriptionsfaktoren in zwei Gruppen eingeteilt: Transkriptionsfaktoren, die in allen hämatopoetischen Zelllinien vertreten sind, wie z.B. RUNX1, sowie linienspezifische Transkriptionsfaktoren (lin⁺), zu denen CCAAT/enhancer-binding protein- α (C/EBP α), TEL und PU.1 gehören (Tenen, 2001; Tenen et al., 1997; Shivdasani und Orkin, 1996).

AML1

Eine Mutation im *RUNX1*-Gen (*AML1*) betrifft in der murinen Embryogenese die gesamte Blutbildung, da dieser Transkriptionsfaktor die Umwandlung des Hämangioblasten in eine hämatopoetische Stammzelle reguliert, und führt daher zu einem letalen Phänotyp (Growney et al., 2005; Okuda et al., 1996; Wang et al., 1996). Konditionelle Deletion von *RUNX1* in der adulten Maus führt zu linienspezifischen Veränderungen der B- und T-Zellreifung sowie zu einer verringerten CLP- und Thrombozytenproduktion (Growney et al., 2005). Die Mäuse weisen zusätzlich einen milden myeloproliferativen Phänotyp auf, der charakterisiert ist durch eine erhöhte Anzahl an myeloiden Vorläuferzellen, erhöhte Leukozytenzahlen im peripheren Blut sowie extramedulläre Hämatopoese (Growney et al., 2005). Der heterodimere Partner des *RUNX1*-Gens ist CBF β (*core-binding factor β gen*). Zusammen stellen sie einen Transkriptionsfaktor in der CBF-Familie dar (Cai et al., 2000; North et al., 1999).

In humanen Leukämien ist das *RUNX1*-Gen in eine Reihe von chromosomalen Translokationen, durch die onkogene Fusionsproteine entstehen, verwickelt, von denen einige dominant-negativ gegenüber dem Wildtyp zu sein scheinen. Zudem ist bekannt, dass auch die Überexpression des intakten *RUNX1* onkogen ist (Cameron und Neil, 2004). *RUNX1* stellt den aminoterminalen Abschnitt des Fusionsproteins AML1-ETO dar, welches bei der Translokation t(8;21), die AML-M2 mitverursacht, entsteht. Dabei wird der 5'-Abschnitt des *RUNX1*-Gens samt der amino-terminalen DNA-Bindungsdomäne (*runt*) auf Chromosom 8 an das nahezu gesamte *ETO*-Gen auf Chromosom 21 gebunden. *RUNX1* ist ebenfalls Teil des Fusionsproteins TEL/AML1, welches durch die Translokation t(12;21) entsteht und 20-25% aller lymphoblastischen ALL im Kindesalter verursacht (Loh et al., 1998; Romana et al., 1995). Die genauen Mechanismen der *RUNX1* Funktionen sowie die Zielgene von *RUNX1* sind noch nicht ausreichend geklärt (Fischer et al., 2005; De Guzman et al., 2002; Schwieger et al., 2002; Burel et al., 2001). Es ist aber bekannt, dass *RUNX1*-CBF β eine Vielzahl von myeloiden und lymphoiden Genen reguliert, u. a. IL-3 und CSF-2 (*colony-stimulating factor 2*) (de Bruijn et al., 2004; Otto et al., 2003; Cameron et al., 1994), sodass *RUNX1* weiterhin Mittelpunkt weiterer Untersuchungen bleiben wird.

PU.1

PU.1 ist ein Mitglied der Ets-Transkriptionsfaktorfamilie und ist das Genprodukt des *SPI1*-Onkogens, welches als Folge einer transkriptionellen Aktivierung in *Friend-virus*-

induzierten Erythroleukämien identifiziert wurde (Moreau-Gachelin, 1994). PU.1 spielt bei der Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen in Richtung der myeloiden Abstammungsreihe eine wichtige Rolle, indem es nahezu jedes myeloidspezifische Gen, u. a. die Gene für den G-, GM-, M-CSF-Rezeptor, reguliert (Iwama et al., 1998; McKercher et al., 1996; Smith et al., 1996; Hohaus et al., 1995; Scott et al., 1994). Untersuchungen haben ergeben, dass es vor allem für die Entwicklung früher myeloider Vorläufer essentiell ist, da PU.1-negative Zellen auf einer frühen myeloiden Reifungsstufe blockiert sind und durch Einsatz von PU.1 weiter reifen können (Tenen, 2003; Anderson et al., 1999; DeKoter et al., 1998). Myeloide Zellen haben eine höhere PU.1-Aktivität als Zellen der lymphoiden Abstammungsreihe, wobei eine Induktion der PU.1-Expression in lymphoiden Vorläuferzellen diese in Richtung der monozytären Linie differenzieren lässt (DeKoter und Singh, 2000). Eine weitere Rolle hat PU.1 bei der späteren Entwicklung von Monozyten und Makrophagen (Tenen, 2003). Mäuse mit einem PU.1-Knockout weisen eine gestörte Reifung von Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten auf, wobei die erythrozytären und megakaryozytären Linien nicht beeinflusst sind (Simon et al., 1996).

C/EBP α

C/EBP α (*CCAAT/enhancer-binding protein- α*) ist ein Transkriptionsfaktor der basischen Leuzin-Zipperfamilie (BLZ) und hat im Gegensatz zu PU.1 eine spezifische Rolle in der Granulopoese. Der Aufbau des C/EBP α -Proteins ist in Abb.2 dargestellt. Es bindet als Homo- oder Heterodimer an andere C/EBP-Proteine und andere Transkriptionsfaktoren, die ein Leuzin-Zipper-Motiv haben, und hat einen Einfluss auf eine Vielzahl an Genen, in dem es u. a. die Differenzierung von Hepatozyten und Adipozyten reguliert (Zhang et al., 1997). Daher führt ein C/EBP α -Knockout zu einer defekten Glukose-Homöostase und damit Hypoglykämie sowie einer fehlenden Entwicklung des weißen Fettgewebes. Die Hypoglykämie ist für die wenige Tage alten Mäuse letal (Zhang et al., 1997; Lin et al., 1994). Ein C/EBP α -Knockout in Mäusen hat außerdem einen selektiven Block der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten-Differenzierung zur Folge sowie eine Ansammlung von Myeloblasten in Blut und Knochenmark (Zhang et al., 1997). Eine Hochregulation der C/EBP α -Funktion führt dagegen zu einer Induktion der Granulopoese und einer Hemmung der Monozyten-Entwicklung aus bipotenten Stammzellen sowie zu einer Hemmung von PU.1. Es wird

vermutet, dass die Hemmung von PU.1 direkt die Differenzierung von Monozyten hemmt (Tenen, 2003; Reddy et al., 2002; Radomska et al., 1998).

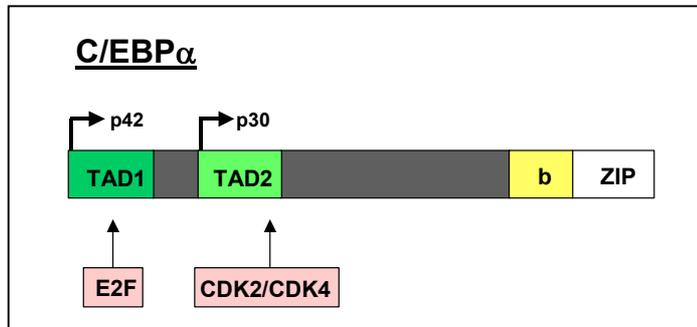


Abb.2. Schematische Darstellung des translatierten Bereichs der *CEBPA*-cDNA

Sequenzmotive für die Transaktivierungsdomänen (TAD1 und TAD2), die basische Region (b) und die Leuzin-Zipper Region (ZIP) sind gekennzeichnet. Die Startstellen für die Proteine p42 und p30, die beide von der *CEBPA*-cDNA kodiert werden können, sind durch Pfeile markiert. Weitere Einzelheiten siehe Text.

Durch Benutzung von zwei verschiedenen ATGs kodiert *CEBPA* für zwei Proteine mit dem Molekulargewicht 42kDa bzw. 30kDa (Landschulz et al., 1989). Wie aus Abb.2 ersichtlich, fehlt dem 30kDa großen Protein die Transaktivierungsdomäne TAD1. Die basische Region b vermittelt die DNA-Bindung und der Leuzin-Zipper die Homo- und Heterodimerisierung (Umek et al., 1991; Landschulz et al., 1988b). *C/EBP α* spielt einigen Studien zufolge auch die Rolle eines Tumorsuppressors, da es durch Runterregulation von p21 bzw. Hemmung der Zyklin-abhängigen Kinasen CDK2 und CDK4 zu einer Hemmung der Zellproliferation führt und zwar unabhängig von p53 oder Rb (Wang et al., 2001; Timchenko et al., 1996; Hendricks-Taylor und Darlington, 1995).

Ein wichtiger Mechanismus der Regulierung der Granulozyten-Differenzierung durch *C/EBP α* *in vivo* und *in vitro* ist die Hemmung des E2F Signalweges, der in einer Runterregulation von c-MYC sowie einer Proliferationshemmung resultiert (Johansen et al., 2001; Porse et al., 2001).

C/EBP α -Mutationen werden in ca. 9% aller untersuchten Proben von Patienten mit AML gefunden, wobei 20% der Patienten mit dem Subtyp M2 eine *C/EBP α* -Mutation aufweisen. Aber auch in der AML-M4 lässt sich ein mutiertes *C/EBP α* nachweisen. Bei den *C/EBP α* -Mutationen handelt es sich um Punktmutationen, die meist entweder die DNA-Bindungsdomäne der basischen Region des Leuzin-Zipper beeinflussen oder die

Translation des gesamten 42kDa C/EBP α -Proteins stören (*frameshift* oder *stopcodon*), wodurch die 30kDa große Form überexprimiert wird, die dominant-negative Eigenschaften besitzen soll (Pabst et al., 2001; Nerlov, 2004). Interessanterweise besitzen die meisten AML-Patienten die beiden oben erwähnten Mutationen auf separaten Allelen, so daß man sehr spezifische Veränderungen in den molekularen Mechanismen und Interaktionen von C/EBP α , die zu einer malignen Transformation führen, vermuten kann (Nerlov, 2004). Eine Reduktion von C/EBP α durch das Fusionsprotein AML1/ETO in der AML Typ2 sowie durch die FLT3-ITD wurde ebenfalls nachgewiesen (Pabst et al., 2001b; Gombart et al., 2002; Preudhomme et al., 2002; Mizuki et al., 2003).

TEL

TEL (*Translocation Ets Leukemia*) mit seinem Gen ETV6 (*Ets Translocation Variant Gene 6*, siehe Abb.3) gehört ebenso wie PU.1 zu der Ets-Transkriptionsfaktorfamilie und liegt auf Chromosom 12 in der Region p13. Es wurde aus Patienten mit chronisch myelomonozytärer Leukämie als Teil eines Fusionsproteins mit dem PDGFR β (*platelet-derived growth factor receptor β*) der Translokation t(5;12)(q33;p13) isoliert. In ca. 8% aller AMLs sind Punktmutationen im TEL gefunden worden (van Waalwijk et al., 2005). TEL-Knockout-Mäuse sterben aufgrund einer Unfähigkeit zur Ausbildung des Blutgefäßnetzes im Dottersack (Wang et al., 1997). Das konditionierte TEL-Knockout-Modell zeigt dagegen, dass TEL ein essentieller Regulator der Überlebensfähigkeit adulter HSC ist. Zudem ist TEL für die Entwicklung aller hämatopoetischer Zelllinien im Knochenmark sieben Tage alter Mäuse unentbehrlich (Hock et al., 2004; Wang et al., 1998).

Wie bereits oben erwähnt, ist TEL ebenfalls Teil des Fusionsproteins TEL/AML1 in der prä-B-ALL (Golub et al., 1995). Ein Verlust der Heterozygotie in der Region p13 auf Chromosom 12 wurde in Leukämien, Brustkrebs sowie in Ovarialtumoren nachgewiesen (Hatta et al., 1997; Spirin et al., 1996; Sato et al., 1995).

TEL agiert als Transkriptionsinhibitor über Interaktionen mit mSin3A, N-CoR, SMRT Co-Repressoren und Histon-Deacetylase3 (Wang und Hiebert, 2001; Lopez et al., 1999). Über seine ETS-Domäne bindet TEL an DNA und über die N-terminale PTD (pointed domain) induziert es Dimerisierung, die für die Transkriptionshemmung unentbehrlich ist. TEL führt auch zur Aktivierung von Tyrosinkinasen (Lopez et al., 1999; Jousset et al., 1997; Carroll et al., 1996).

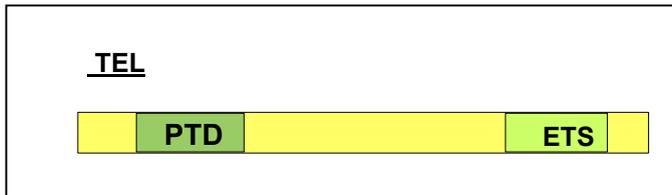


Abb.3. Schematische Darstellung des translatierten Bereichs der TEL-cDNA

Sequenzmotive, die für die Pointed Domain (PTD) und die DNA-Bindungsdomäne ETS kodieren, sind gekennzeichnet.

1.3 Small Interfering RNA (siRNA)

Die Technologie der *small Interfering RNA* (siRNA) basiert auf der Anwendung doppelsträngiger RNA, die homologe Regionen auf mRNAs erkennen und die durch einen Prozess mit der Bezeichnung „*RNA interference*“, kurz RNAi, zu einer Reduktion der Genexpression (Knockdown) führen kann (Sharp, 1999). Es wird vermutet, dass RNAi als Form der posttranskriptionalen Steuerung an der Regulation von Genen, bei der Entwicklung von Zelltypen und Geweben sowie bei der Entstehung von Neoplasien beteiligt ist. Studien haben gezeigt, dass der Mechanismus der RNA-i in Eukaryonten, nicht aber in Prokaryonten existiert und es sich dabei um einen entwicklungs geschichtlich alten, hochkonservierten Mechanismus handelt (Stanislawska und Olszewski, 2005; Bernstein et al., 2001b).

1.3.1 Mechanismus der RNA-Interferenz

RNA-Interferenz ist in zahlreichen Organismen nachgewiesen worden, wobei er zuerst in dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* entdeckt wurde. Dabei kam es durch Injektion von doppelsträngiger RNA im Gegensatz zu einzelsträngiger RNA zu einer Reduktion der homologen endogenen mRNA (Fire et al., 1998).

Der RNAi-Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt. Es ist aber bekannt, dass RNAi bei *C.elegans* und Pflanzen durch das Vorhandensein von langer, doppelsträngiger RNA (dsRNA) in der Zelle ausgelöst wird. Diese dsRNA wird von dem Dicer-RDE-1 (RNAi deficient–1) Komplex (siehe Abb.4) in doppelsträngige, typischerweise 21 nt große siRNAs geschnitten (Tabara et al., 2002; Elbashir et al., 2001). Bei Dicer, auch „Häcksler“ genannt, handelt es sich um eine doppelstrang-

spezifische Endoribonuklease Typ III (Dykxhoorn et al., 2003). Die geschnittenen siRNAs formen einen 19bp großen Duplex mit 2nt Überhang am 3`-Ende. Der Antisense-Strang der siRNA wird für den RISC (RNAi silencing complex) verwendet, der durch Rekrutierung von Proteinen gebildet wird und unter anderem eine Helikaseaktivität enthält. RISC lagert sich an die homologe RNA, die entfernt werden soll (*targeting*), und degradiert sie anschließend (siehe Abb. 4). Die daraus entstehenden kurzen dsRNA-Fragmente stellen dann selbst interferenzaktive siRNAs dar und triggern wiederum als „Primer“ den zuvor beschriebenen Prozess der RNA-Interferenz.

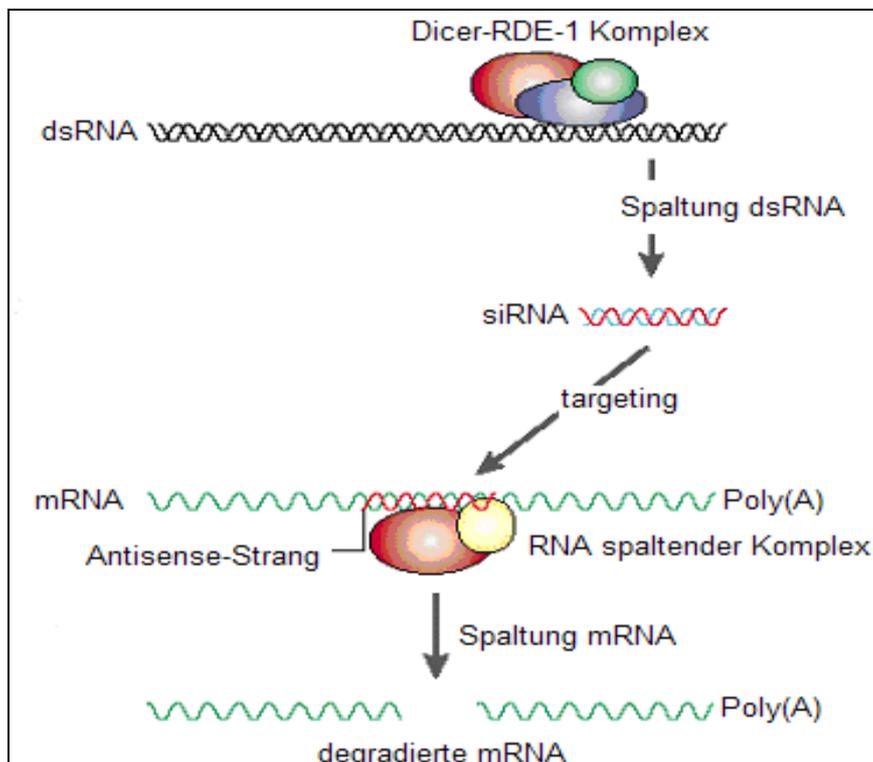


Abb.4. Mechanismus der RNA-Interferenz

Lange doppelsträngige RNA (dsRNA) wird vom Dicer-RDE-1 Komplex geschnitten, so dass kurze siRNAs entstehen. Abgeändert aus McManus und Sharp, 2002. Einzelheiten siehe Text.

1.3.2 Stabile Expression von shRNAs in Säugetierzellen

siRNAs mit über 30 bp Länge verursachen in Säugetierzellen eine „Akute-Phase-Reaktion“ mit anschließender Apoptose (Elbashir et al., 2001b; Hunter et al.; 1975). Um diesen unspezifischen Effekt zu umgehen, muss man kleine, 21 bis 23 Nukleotid große siRNAs verwenden. Diese Oligonukleotide sind in der Lage, spezifisch die Genexpression zu hemmen. Der Nachteil ist, dass dieser Effekt zeitlich begrenzt ist und somit die Anwendung der siRNAs einschränkt (Dykxhoorn et al., 2003; Elbashir et al.; 2001). Um eine stabile Expression zu ermöglichen, werden doppelsträngige DNA-Oligonukleotide in Plasmid- oder Retrovirus-Vektoren kloniert und unter Kontrolle eines RNA-Polymerase-III-Promotors in sog. shRNA (*short hairpin RNA*) transkribiert. Diese shRNAs werden dann durch die *RNase Dicer* in aktive siRNAs von 19-21 Basenpaaren zerlegt (Brummelkamp et al., 2002). Retrovirale Vektoren sind für die stabile Expression von siRNA besonders gut geeignet, da sie Zellen mit hoher Effizienz infizieren und sich stabil in das Genom der Wirtszelle integrieren können.

Mit Hilfe eines retroviralen Vektors wurden in dieser Arbeit siRNAs gegen *CEBPA* in humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen langfristig und stabil exprimiert und anschließend die Wirkung dieser Knockdowns in den Zellen studiert.

1.4 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Transkriptionsfaktor C/EBP α im Hinblick auf seine Rolle in der Hämatopoese und der Entstehung der AML zu studieren. C/EBP α ist ein wichtiger Regulator der myeloiden Differenzierung im murinen System. Seine Eigenschaften und Funktionen im humanen System sind dagegen bisher wenig bekannt. Zudem liegt das *CEBPA*-Gen in ca. 25% aller AML-Patienten in mutierter Form vor, was darauf hinweist, dass dieser Transkriptionsfaktor im Zusammenhang mit der Entstehung der AML steht.

Zu diesem Zweck soll untersucht werden, welchen Effekt die Runterregulation der humanen *CEBPA*-Expression mit Hilfe der RNA-Interferenz (RNAi)-Methode auf die Differenzierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen aus dem menschlichen Nabelschnurblut hat.

Im ersten Teil der Arbeit soll die RNAi-Methode etabliert werden, um mit Hilfe von retroviralen Vektoren siRNAs zu exprimieren, die in der Lage sind, die Expression von *CEBPA* und zum Vergleich auch von *TEL* herunterzuregulieren. Im zweiten Teil soll mit Hilfe verschiedener Methoden analysiert werden, welchen Effekt die Runterregulation der *CEBPA*-Expression auf die *in vitro* Differenzierung der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen hat.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien stammen von den Firmen Difco/BD Beckton-Dickinson (Heidelberg), BIO-RAD (München), Merck (Darmstadt), Gibco/Invitrogen (Karlsruhe), SIGMA-ALDRICH (Taufkirchen), Cambrex BioScience (Verviers, Belgien), CellSystems (St. Katherinen).

2.1.1 Mikrobiologie

Für die Transformation und Amplifikation der verwendeten Plasmide wurde der Escherichia coli - Bakterienstamm XL10 Gold (Stratagene) verwendet. Die Herstellung, Lagerung, Anzucht und Expansion der chemisch kompetenten Bakterienstämme zur Transformation von Plasmiden erfolgte nach den allgemein üblichen Protokollen (Sambrook et al., 1989).

Bakterienkulturmedien

Zur Anzucht der Bakterien wurde Luria-Bertani (LB)-Medium verwendet. Das LB-Medium setzt sich aus 1% Bacto-Trypton, 0,5% Hefeextrakt und 0,5% NaCl, pH 7,4 zusammen. Bei festen Medien wurde zusätzlich 1,5% Bacto-Agar zugegeben. Die Medien wurden bei 121°C autoklaviert und im Falle der festen Nährmedien anschließend ausplattiert. Ampicillin wurde zur Selektion transformierter Bakterien verwendet, wobei es aufgrund seiner Hitzelabilität erst nach Abkühlung der Medien auf 50°C in einer Endkonzentration von 100 ng/ml zugesetzt wurde.

2.1.2 Molekularbiologie

Enzyme, zugehörige Puffer sowie Zusätze

Restriktionsendonukleasen sowie weitere DNA- und RNA-spaltende Enzyme wurden von den Firmen Boehringer-Mannheim (Mannheim), Gibco/Invitrogen (Karlsruhe), MBI-

Fermentas (St.Leon-Rot) und Roche Diagnostics (Mannheim) nach Herstellerangaben verwendet.

Plasmide und retrovirale Vektoren

pSUPER Klonierungsvektor für Oligonukleotide, die unter Kontrolle des H1 Promotors in siRNA transkribiert werden (Brummelkamp et al., 2002)

Folgende Plasmide wurden in der AG Molekulare Pathologie für diese Arbeit hergestellt:

pSF91/mutCEBPA-YFP Plasmid für die Produktion eines Retrovirusvektors, der die Mutante 10 von C/EBP α (Pabst et al., 2001) und YFP von einer bizistronischen mRNA exprimiert, basiert auf pSF91/mut10-eGFP (Schwieger et al., 2004)

pSF91/mutTEL-eGFP Plasmid für die Produktion eines Retrovirusvektors, der die Mutante 3D9 von TEL (van Waalwijk et al., 2005) und eGFP von einer bizistronischen mRNA exprimiert

pRetroSUPER-Red (pRSR) Plasmid für die Produktion eines Retrovirusvektors, der cDNA für DsRed2 und SUPER-Kassette für Expression von siRNA enthält, basiert auf dem Retrovirusvektor SF91 (Hildinger et al., 1999)

pRetroSUPER-Red-SIN (pRSR-SIN) Plasmid für die Produktion eines selbst-inaktivierenden (SIN) Retrovirusvektors, der cDNA für DsRed2 und SUPER-Kassette für Expression von siRNA enthält, basiert auf dem Plasmid pRetroSUPER (Brummelkamp et al., 2002)

pRetroSuper-GFP-SIN (pRSG-SIN) Plasmid für die Produktion eines selbst-inaktivierenden (SIN) Retrovirusvektors, der cDNA für eGFP und SUPER-Kassette für Expression von siRNA enthält, basiert auf dem Plasmid pRetroSUPER (Brummelkamp et al., 2002)

pSV40-gag/pol (R960)	trägt die Moloney-MLV gag- und pol-Gene unter der Kontrolle des SV40-Promotors (in dieser Arbeitsgruppe hergestellt)
pEcoEnv (#522)	Expressionsplasmid für die Verpackung viraler Partikel für die Infektion muriner Zelllinien (Morita et al., 2000)
pRD-114 Env (R916)	Expressionsplasmid für die Verpackung viraler Partikel für die Infektion humaner Stammzellen; trägt unter Kontrolle des CMV-Promotors die kodierende Sequenz für ein modifiziertes Hüllprotein des Feline Endogenous Virus (FEV), welches den zytoplasmatischen Teil des amphotropen MLV-Hüllproteins enthält (Sandrin et al., 2002)

Oligonukleotide

Die Oligonukleotide für die Synthese von siRNA wurden u.a. mit Hilfe des DEQOR-Computerprogramms ausgesucht (Henschel et al., 2004). Die Oligonukleotide wurden von Metabion, Martinsried bezogen.

Name	Position	Sequenz 5` nach 3`
gfp2 *	243 – 261	GCACGACTTCTTCAAGTCC
cebp1**	819 - 838	GGCCAAGAAGTCGGTGGAC
cebp2**	945 - 963	GGAAGCTGACCAGTGACAAT
cebp3**	825 - 844	GAAGTCGGTGGACAAGAACA
tel1***	319 - 337	AGAGGACTTTTCGCTATCGA
tel2***	1174 – 1192	GAACAGAACAACATGACC
tel3***	538 - 556	CCCTCCCACCATTGAACTG
tel4***	970 - 988	CCACATCATGGTCTCTGTC
tel8***	292 - 312	TGAATGGCAAAGCTCTCCTGC

Tab.2. Auflistung aller Oligonukleotide, ihrer Position und der zugehörigen Nukleotidequenzen

* shRNA gegen *eGFP*, Position relativ zum Startcodon (ATG) der Clontech eGFP-Sequenz

** shRNA gegen *CEBPA*, Position entsprechend der Referenzsequenz NM_004364

*** shRNA gegen *TEL (ETV6)*, Position entsprechend der Referenzsequenz NM_001987

Primer

M13/pUC-20: pSUPER vw (vor H1)	GTAAAACGACGGCCAGTGAG
M13/pUC-48rev: pSUPER rw (hinter Oligo)	AGCGGATAACAATTTACACAGGA
RSR-1: pSUPER mit Oligo in RSR-Vektor	CCTACATCGTGACCTGGGAAG
RSR-2: pSUPER mit Oligo in RSR-Vektor	GGTAGAATTCGAACGCTGACG
RSR-SIN: cs 461	CAGGCTGCATTTCTTCTTCT
RSR-SIN: cs 462	TTGGAGCCGACTGCAAATACA
Primer für RT ² -PCR: cs 571	TCGGTGGACAAGAACAG
Primer für RT ² -PCR: cs 572	GCAGGCGGTCATTG

2.1.3 Zellkultur

Zelllinien

In dieser Arbeit wurden adhärent wachsende Zellen sowie Suspensionszellen verwendet.

Adhärent wachsende Zellen

Zelllinie	Medium	Herkunft
SC-1	MEM	murine Fibroblastenzelllinie (Hartley und Rowe., 1975)
Phoenix GP	DMEM	293T-Zellen, in denen das für das SV40 gag- pol kodierende Plasmid stabil integriert ist. 293 ist eine humane Epithelialzelllinie aus der Niere, 293T wurde durch Adeno-Virus E1a transformiert und trägt ein temperatursensitives largeT-Antigen von SV40 (von G. Nolan, Stanford University, Palo Alto, USA)
TE671	DMEM	humane Rhabdomyosarkom-Zelllinie (Quentmeier et al., 2001)
HepG2	DMEM	humane HCC (Hepatozelluläres Carcinom)-Zelllinie (Diehl et al., 1996)
MDA-MB-231	DMEM	humane Brustkrebszelllinie (Barrett et al., 2002)

Tab.3. Adhärenente Zelllinien, zugehörige Kulturmedien und Herkunft

Suspensionszellen

Zelllinie	Medium	Herkunft
CD34 ⁺ -Stammzellen	IMDM	CD34+-positive humane Nabelschnur- und Plazenta-Zellen (Albertinen-Krankenhaus, Hamburg)
FDCP1	RPMI	murine, IL-3-abhängige hämatopoetische Zelllinie (Keith et al., 1990)
TF-1	RPMI	humane AML-Zelllinie (Rutella et al., 2006)

Tab.4. Suspensions-Zelllinien, zugehörige Kulturmedien und Herkunft

Zellkulturmedien

Die Zellkulturmedien wurden mit fötalem Kälberserum (FCS; Sigma, München) versetzt. Das FCS wurde zur Inaktivierung der enthaltenen Komponenten des Komplementsystems 30 min bei 56°C inkubiert.

Minimal Essential Medium (MEM)

Das Minimal Essential Medium (Sigma Cell Culture™, München) wurde für die Kultivierung der SC-1-Zellen eingesetzt, wobei es vor Gebrauch mit 10% FCS, 2% Glutamin (200 mM) und 1% Natriumpyruvat (1 mM) versetzt wurde.

Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)

DMEM (Biochrom KG Seromed, Berlin) wurde u.a. für die Kultivierung der Phoenix-, sowie der TE-Zellen verwendet (siehe Tab.3). Vor Gebrauch wurde es mit 10% FCS, 2% Glutamin (200 mM) und 1% Natriumpyruvat (1 mM) versetzt. Zur Einstellung eines pHs von 7,9 wurde NaHCO₃ verwendet.

Einfriermedium

Die Zelllinien wurden mit 90% FCS und 10% DMSO (Merck, Darmstadt) langsam über Nacht auf -70°C abgekühlt und nach 48h in flüssigem Stickstoff eingelagert.

RPMI- Medium

RPMI (Rosvell Park Memorial Institute)-Medium (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) wurde vor Gebrauch mit 10% FCS, 2% Glutamin (200 mM) und 1% Natriumpyruvat (1 mM) versetzt. Die RPMI-Lösung wurde mittels einer Peristaltikpumpe durch einen 0,22 µm

Filter steril filtriert und in 500 µl Aliquots bei 4°C gelagert. Das RPMI-Medium wurde für die Kultivierung von TF-1 -und FDCP1-Zellen verwendet (siehe Tab.4).

Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium (IMDM)

IMDM (Biochrom KG Seromed, Berlin) zur Kultivierung der CD34⁺-Nabelschnurblutzellen (siehe Tab.4) wurde nach dem gleichen Protokoll angesetzt wie das RPMI-Medium. Zusätzlich wurde dieses Medium mit 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) versetzt.

Expansions- und Differenzierungsmedien für die CD34⁺ - Nabelschnurblutzellen

Die eingesetzten Zytokine stammen von CellSystems (St. Katherinen). Die für den CFU-C Assay verwendeten Methylcellulosen (Methocult™ H4434 und H4230) waren von CellSystems, St. Katherinen (siehe Kap.2.2.3).

Verwendete Antikörper für die FACS-Analyse

Die FACS-Analysen erfolgten mit humanen Antikörpern von BD Beckton-Dickinson, Heidelberg.

Antikörper	Markierung	Klon	Isotyp
CD11b	APC	(D12)	Ratte IgG _{2b,κ}
CD13	APC	(WM15)	Maus IgG _{1,κ}
CD14	APC, PE	(MΦP9)	Maus IgG _{2b,κ}
CD15	PE	(MMA)	Maus IgM,κ
CD33	APC, PE	(P67.6)	Maus IgG _{1,κ}
CD34	APC	(8G12)	Maus IgG _{1,κ}
CD71	PE	(M-A712)	Maus IgG _{2a,κ}
CD117	PE	(104D2)	Maus IgG _{1,κ}
IgG	PE	(G18-145)	Maus IgG _{1,κ}
IgG	APC	(G18-145)	Maus IgG _{1,κ}
IgG	FITC	(G18-145)	Maus IgG _{1,κ}

Tab.5. Antikörper für die FACS-Analyse

APC= Allophycocyanin, PE= Phycoerythrin, FITC= Fluorescein isothiocyanate

Weitere Materialien der Zellkultur

Für die Aufreinigung der CD34⁺ - Nabelschnurblutzellen wurde der Liniendepletionskit (EasySep™ Human CD34 Selection, StemCell Technologies, Vancouver, Kanada) verwendet. Die Infektion dieser Zellen erfolgte mit Hilfe von Retronektin (rekombinantes Fibronektinfragment CH-296, Retronektin® TaKaRa, Cambrex BioScience, Verviers, Belgien).

2.2 Methoden

Die Methoden, die in dieser Arbeit angewandt wurden, sind, sofern nicht anders angegeben, dem „*Molecular Cloning*“ (Sambrook et al., 1989) entnommen.

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Arbeiten mit DNA

Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation der Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979; Ish-Horowicz und Burke, 1981).

Für die Minipräparation wurde eine einzelne Bakterienkolonie vom Transformationsansatz gepickt, in Ampicillin-haltiges LB-Medium überführt und bei 37°C und 200 rpm in einem Schüttelinkubator zu einer 3 ml Vorkultur (OD 600 0,5-1) herangezogen. Die DNA-Präparation erfolgte nach Standardprotokoll: nach Zentrifugation wurde das Zellpellet in 100 µl kaltem Resuspensionspuffer (50 mM Glucose, 10 mM EDTA pH 8, 25 mM TrisHCl pH 8) suspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit 200 µl Lysispuffer (2 M NaOH, 1% SDS) versetzt und 5 min auf Eis inkubiert. Die Fällung von Proteinen erfolgte mit 150 µl Ausfällungspuffer (3 M Kaliumacetat, 5 M Essigsäure) für 5 min auf Eis. Nach Zentrifugation wurde der Überstand mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform ausgeschüttelt. Die Ausfällung der DNA erfolgte durch Zugabe des doppelten Volumens 96%igen Ethanol zu dem Überstand und einer anschließenden Zentrifugation. Die DNA wurde mit 70%

Ethanol gewaschen und das Pellet in 30 µl Tris/RNase-Lösung pH 7,5 aufgenommen. Die Plasmid-DNA wurde zur Kontrolle einer Testspaltung mit Restriktionsenzymen und einer anschließenden Gelelektrophorese unterzogen.

Für die Midi- bzw. Maxipräparation wurden ca. 100 µl positiver Bakterienkoloniekulturen in 100 ml bzw. 200 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht in einem Schüttelinkubator bei 37°C zu einer Vorkultur herangezogen. Danach erfolgte die Midi- und Maxipräparation nach dem Protokoll des Quiagen Plasmid Midi- bzw. Maxi-Kits (Quiagen, Hilden). Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte photometrisch.

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde genutzt, um DNA-Moleküle nach Restriktionsverdau im elektrischen Feld der Größe nach aufzutrennen. Je nach erwarteter Fragmentgröße wurde mit 0,8 bis 2%igen TAE-Agarosegelen (TAE-Puffer, modifiziert: Tris-Acetat pH 8,0 40 mM, Na₂EDTA 0,1 mM) gearbeitet. Die DNA-Fragmente wurden durch Ethidiumbromidfärbung auf einem UV-Licht abstrahlenden Detektiongerät (UV-Transilluminator Ti2, Biometra, Göttingen) ihrer Größe nach geordnet als Banden sichtbar gemacht. Das gewünschte DNA-Fragment wurde durch Vergleich mit einem DNA-Standard (Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder, MBI Fermentas, St. Leon-Rot) mit einem Skalpell ausgeschnitten und auf die Ultrafree® DA-Säule (Millipore, Schwalbach) gegeben. Es folgte ein 10-minütiger Zentrifugationsschritt bei 5000 x g zur Aufreinigung des DNA-Fragments aus dem Agarosestück. Die isolierten DNA-Fragmente wurden in Ligationsreaktionen eingesetzt.

Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau erfolgte entweder als Testverdau zur Überprüfung von Vektoren beispielsweise nach DNA-Präparation, für die Isolierung von DNA-Fragmenten oder als erster Schritt für weitere enzymatische Reaktionen. Für einen Restriktionsverdau wurde pro µg der zu spaltenden DNA 1 U des jeweiligen Restriktionsenzym verwendet. In einem Endvolumen von 20 µl erfolgte der Verdau in einem von der Firma empfohlenen Puffer für 1 h bei 37°C im Wasserbad.

Klenow-Reaktion

Um die bei dem Restriktionsverdau entstandenen überhängenden, einzelsträngigen DNA-Enden am 5'-Ende aufzufüllen, wurde die 5'-3'-Polymerase-Aktivität des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I genutzt. 2 U Klenow-Fragment, 10 x Klenow-Puffer

sowie die beiden benötigten Nukleotide (0,1 mM) wurden zum Restriktionsansatz hinzugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Enzyminaktivierung für 15 min bei 65°C in einem Heizblock.

Dephosphorylierung des linearisierten Vektors

Um bei der Ligationsreaktion die Selbstligation des Vektors zu verhindern, noch bevor die gewünschten Oligonukleotide integriert werden, wurde die *Calf Intestine Phosphatase* (CIP, Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Dieses Enzym katalysiert das Entfernen der 5`Phosphate während 1 h bei 37°C. Die Inaktivierung der CIP erfolgte für 15 min bei 80°C. Die Aufreinigung erfolgte durch Phenol-Chloroformbehandlung und die Fällung mit Ethanol.

Annealing (Hybridisierung)

Um die Ligation der Oligonukleotide in einen Vektor zu ermöglichen, mussten zunächst die beiden zueinander komplementären Oligonukleotide hybridisiert werden. Die Oligonukleotide wurden jeweils in einer Konzentration von 1 µl (100 µM) in einem Gesamtansatz von 50 µl in einem frisch zubereiteten Annealing-Puffer (100 mM K-acetate, 30 mM HEPES-KOH pH 7,4 sowie 2 mM Mg-acetate) für 4 min bei 95°C und dann für 10 min bei 70°C im Wasserbad inkubiert werden. Anschließend erfolgte die langsame Abkühlung auf Raumtemperatur.

Ligation

Die Ligation der hybridisierten Oligonukleotide in den Vektor erfolgte in einem Verhältnis von 3:1 Oligonukleotidpaar zu Vektor. In einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden 100 bis 200 ng der geschnittenen dephosphorylierten Vektor-DNA mit 7 µl der hybridisierten Oligos (2 µM), 1 µl 10 x Ligase-Puffer und 1 µl T4 DNA-Ligase (2 U, Fermentas) bei 16°C über Nacht inkubiert. Die Negativkontrolle bestand aus einem Ligationsansatz ohne Oligonukleotide.

Polymerase - Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation eines bestimmten DNA-Abschnitts dient die Methode der Polymerase-Kettenreaktion von Mullis und Mitarbeitern (Mullis, 1990; Saiki et al., 1986). Dabei liegt der zu amplifizierende DNA-Abschnitt zwischen zwei gewählten Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig komplementäre DNA-Bereiche binden. Die PCR-Methode wurde zum Nachweis des reduzierten *CEBPA*-Transkriptionslevels nach

Transduktion mit shRNA sowie im Rahmen der DIP-PCR zum Screening von Bakterienkolonien verwendet.

PCR

Die PCR-Methode wurde verwendet, um beispielsweise die benötigten Schnittstellen für bestimmte Enzyme an die Enden von Vektoren zu bringen. Die PCR-Reaktionen wurden in 25 bis 35 Zyklen mit je 30 sec DNA-Doppelstrangtrennung bei 95°C, 15 sec Hybridisierung der Primer ca. 4°C unterhalb ihres Schmelzpunkts und Amplifikation je nach Fragmentgröße für 45 bis 90 sec bei 70°C durchgeführt. Für die meisten Anwendungen wurde der T3 Thermocycler (Biometra) verwendet.

DIP-PCR

Die DIP-PCR wurde verwendet, um eine große Anzahl von transformierten Bakterienkolonien zu testen. Der PCR-Mix pro Kolonie hatte ein Endvolumen von 20 µl und beinhaltete 5 U Taq-Polymerase (Gibco/Invitrogen (Karlsruhe)), 10 x PCR-Puffer, 0,4 µl dNTPs (1mM, Gibco, Invitrogen, Karlsruhe), jeweils 0,4 µl des Primers M13-20 und -48 reverse (10 µM), 10% Yellow Sub.

Die zu untersuchenden Kolonien wurden mit einer gelben Pipettenspitze von der Transformationsplatte gepickt und in mit jeweils 20 µl dH₂O gefüllte Vertiefungen einer 96-Lochplatte getippt. Anschließend wurde jeweils 1 µl dieser Bakteriensuspension sowie die Positiv- und Negativkontrollen in den jeweiligen PCR-Mix in eine neue 96-Lochplatte pipettiert. Das PCR-Programm, welches 20 Zyklen umfasste, beinhaltete folgende Schritte:

93°C	3 min	
93°C	15 sec	← 20x
58°C	15 sec	
72°C	60 sec	
72°C	3 min	
4°C	∞	

Die DIP-PCR erfolgte im T3 Thermocycler (Biometra). Anschließend wurden ca. 10 µl des DIP-PCR-Ansatzes auf ein 2% Agarosegel aufgetragen und die positiven, das Insert enthaltenden Kolonien mit einer Basenpaarlänge von 490 bp von den negativen Kolonien mit einer Basenpaarlänge von 430 bp identifiziert. Die Vertiefungen der 96-Lochplatte mit der restlichen Bakteriensuspension wurde mit jeweils 200 µl LB_{AMP}-

Medium gefüllt und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator aufgezogen, so daß nach mehreren Schritten aus den positiven Bakterienkolonien eine Mini-DNA präpariert werden konnte.

RT²-PCR

Die real time PCR (RT²-PCR) dient der gleichzeitigen Amplifizierung und Detektion der Zielsequenzen in einem einzigen Gerät, so dass keine Aliquots während der Reaktion entzogen oder prozessiert werden müssen. Die amplifizierten Produkte der RT²-PCR wurden mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten Oligonukleotiden (SYBR I Green, Qiagen) im LightCycler (Roche) ermittelt. Für die Erststrangsynthese wurde 1 µg aufgereinigter RNA in einem Endvolumen von 20 µl mit 10 U AMV reverse Transkriptase (5 U/ µl, Promega), 20 U RNase Inhibitor (RNasin® 10⁻¹⁴M), 2 µl random primer (0,5 µg pro Reaktion, Promega), 1 mM dNTP, 4 µl AMV RT 5 x Reaktionspuffer (250 mM Tris pH 8,3, 250 mM KCl, 50 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 2,5 mM Spermidin, Promega) und dH₂O für 1 h bei 39°C inkubiert. Die Reaktion wurde für 10 min bei 70°C hitzeinaktiviert. In einem Endvolumen von 20 µl wurden jeweils 1 µg cDNA, die als Template für die PCR-Reaktion dienten, 1 µM *forward* Primer, 1 µM *reverse* Primer, 2 µl SYBR I green mix, MgCl (50 mM) und dH₂O eingesetzt. Das Programm bestand aus 40 Zyklen und beinhaltete folgende Reaktionsschritte:

95°C 10 min

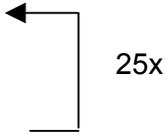
95°C 8 min

60°C 6 min

72°C 8 min

Sequenzierung

Zur Überprüfung der Nukleotidsequenz nach Ligationen und bei PCR-Produkten wurde das modifizierte Kettenabbruchverfahren nach Sanger und Coulson (Sanger und Coulson, 1975), das Cycle-Sequencing (Sears et al., 1992) angewandt. Bei dieser Dideoxy-Kettenabbruch-Methode werden fluoreszenzmarkierte Nukleotide eingesetzt. Die Sequenzierung wurde gemäß dem von der Firma empfohlenen Protokoll durchgeführt. Das PCR-Programm setzte sich aus folgenden Schritten zusammen:

95°C	1 min	
96°C	30 sec	
50°C	50 sec	
60°C	4 min	
4°C	∞	

Die Reaktion erfolgte im Thermoblock (Biometra, Göttingen). Nach Fällung der DNA erfolgte die weitere Bearbeitung der Proben im Servicelabor des Instituts für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie am Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg.

Arbeiten mit RNA

Isolierung von RNA aus infizierten CD34⁺-Zellen

Für die RNA-Isolierung wurden 1×10^4 sortierter CD34⁺-Zellen in 500 μ l peqGOLD TriFast™ (PEQLAB Biotechnologie GmbH) aufgenommen und mit 200 μ l Chloroform versetzt. Die wässrige Phase wurde anschließend mit 500 μ l Isopropanol gefällt und in RNase-freiem Wasser resuspendiert.

Alkoholpräzipitation von RNA

RNA wurde durch Zugabe des 2,5-fachen Volumens EtOH gefällt. Anschließend wurde es für 15 min auf Eis inkubiert und für 15 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70% EtOH gewaschen, getrocknet und in 1mM EDTA pH 8 aufgenommen.

Protein- Analyse

Für die Proteinisolierung wurden ca. 5×10^6 Zellen geerntet, 2 min lang bei 5000 rpm abzentrifugiert und mit NaCl-Lösung gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das Pellet in 500 μ l NaCl-Lösung resuspendiert, mit 1/10 Volumen TCA-Lösung (100% Trichloressigsäure in ddH₂O) versetzt und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte wiederum ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 4°C und 14000 rpm und die

Resuspension des Pellet mit 50-100 μ l 1 x SDS-Puffer (2x SDS-Puffer: 12,5% 2 M Tris-Lösung pH 6,8, 10% SDS, 25% Glycerol, 1% Mercaptoethanol, Bromphenolblau in dH_2O). Die gelbe Suspension wurde bis zum Umschlagen der Farbe in Blau mit Tris-Lösung angereichert und danach auf Eis zweimal für 30 sec mit Ultraschall auf Stufe 4-5 behandelt. Die Proben wurden denaturiert, indem sie 5 min aufgekocht wurden, und bei -20°C gelagert.

Proteinkonzentrationsbestimmung mit Hilfe des DC-Protein Assays

Die DC-Protein-Probe von Bio-Rad (München) ist ein kolorimetrischer Assay zur Ermittlung der Proteinkonzentration in Gesamtzelllysaten. Er basiert auf der Proteinkonzentration nach Lowry (Lowry et al., 1951). Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Zellysate mit Lysispuffer (Nonidat P-40, SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen) 1:10 verdünnt. 5 μ l der Verdünnung wurden in einer Mikrotiterplatte mit 25 μ l alkalischer Kupfertartrat-Lösung sowie 200 μ l Folin-Reagenz nach Angaben des Herstellers versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur wurde die Extinktion der Probe bei 620 nm gemessen (Microplate Reader SUNRISE™, Tecan, Schweiz). Die Proteinkonzentration der verdünnten Probe wurde anschließend anhand einer parallel erstellten BSA-Eichgerade bestimmt und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors auf das Gesamtzelllysate umgerechnet.

SDS-Acrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung von Proteinen wurde die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese verwendet. Die Proteine konnten durch einen Transfer auf eine Membran und durch Zugabe spezifischer Antikörper detektiert werden. Für die Detektion von C/EBP α wurde ein 12,5% SDS-PAGE-Gel hergestellt, welches aus einem Trenngel und einem Sammelgel bestand. Das Trenngel setzte sich aus 1 M Tris HCl pH 8,8, Acrylamid (5:1), 10% SDS, 10% APS, 4 μ l TEMED (Tetramethylethylendiamin, Merck, Darmstadt) sowie ddH_2O zusammen. Das Sammelgel beinhaltete die gleichen Komponenten wie das Trenngel, jedoch in anderen Mengen. Zudem wurde mit Lade- und Laufpuffern gearbeitet. Das Sammelgel wurde nach Polymerisation des Trenngels auf dieses geschichtet und polymerisierte ebenfalls. Vor dem Beginn der SDS-Page wurde das Gel mit Laufpuffer bedeckt und die Proben in die Taschen pipettiert. Die Gelelektrophorese lief 1 h lang bei 120 V.

Western-Blot

Die Proteine wurden nach der gelelektrophoretischen Auftrennung auf eine PVDF-Membran übertragen (blotting). Das Acrylamidgel wurde auf die mit Transfer-Puffer äquilibrierte PVDF-Platte gelegt und mit 3 Lagen Chromatographiepapier sowie einem Schwamm bedeckt. Der Western-Blot lief für 1 h bei 400 mA oder über Nacht bei 100 mA. Anschließend wurde das Gel verworfen und die PVDF-Membran zum Blocken in eine Magermilchpulver-TTBS-Lösung (10 x TBS in 0,5% Tween 20 und dH₂O, 2% Magermilchpulver) gelegt und über Nacht inkubiert. (Für die Vorbereitung eines der Western Blots danke ich Dr. D. Speidel)

Immunodetektion

Die Immunodetektion wurde zuerst mit dem C-terminalen C/EBP α -Antikörper (C-18: sc-9314 von Santa Cruz, 1:1000) und anschließend 1:5000 verdünntem donkey-goat IgG-HRP (Streptavidin-Horse Raddish Peroxidase,) als Zweitantikörper in Milchpulver-TTBS-Lösung für 1h auf dem Taumler inkubiert, wobei zwischen der Erst- und Zweitantikörper-Inkubation zwei Waschschrte mit TTBS-Lösung erfolgten. Für die Detektion der Antikörper wurde das ECL-System (Amersham) verwendet, indem Lösung A und B miteinander vermischt, auf die Membran gegeben und 1 min lang inkubiert wurden. Anschließend wurde die Membran nach dem Verwerfen des Lösungsgemischs als Röntgenbild entwickelt.

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Durch die Behandlung mit CaCl₂ wurden die Zellen der E.coli Bakterienstämme zur Aufnahme von Plasmid-DNA (Transformation) kompetent gemacht. Am Vortag wurden 10 ml LB-Medium mit einer Bakterienkultur angeimpft und über Nacht im Schüttler bei 37°C inkubiert. 4 ml dieser Bakterienkultur wurden am nächsten Morgen in 200 ml LB-Medium überführt und ca. 2,5 h im Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,5 inkubiert. Nach Ernte und Zentrifugation der Bakterien (4°C, 4000 rpm, 15 min) wurde das Pellet in 50 ml eiskalter CaCl₂-Lösung (60 mM CaCl₂, 10 mM PIPES pH 7) resuspendiert und für 10 min bei 4°C und 4000 rpm erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend wiederum in 7,5 ml eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert, wobei

diese zusätzlich 15% Glycerin enthielt. Die Bakteriensuspension wurde in 100 µl-Aliquots in vorgekühlte Eppendorftubes gefüllt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Bakterien wurden bei -70°C gelagert.

Transformation

Ein Aliquot von 100 µl transformationskompetenter Bakterien (XL1Blue, 100 Gold) wurde langsam auf Eis aufgetaut. 5 bis 10 µl Ligationsansatz wurden hinzugefügt und für weitere 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Transformationsansatz für 3 min einem Hitzeschock im Wasserbad bei 37°C unterzogen, anschließend zügig mit 500 µl LB-Medium aufgefüllt und für 1 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Danach wurden jeweils 50 und 500 µl eines jeden Transformationsansatzes auf LB-Amp-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

Zelllinien

In dieser Arbeit wurden die im Materialabschnitt unter 2.1.3 aufgeführten Zelllinien verwendet (siehe Tab.3 und 4). Sie wurden in den jeweiligen beschriebenen Medien bei 37°C , 5% $\text{CO}_2(\text{v/v})$ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert und alle zwei bis drei Tage mit frischem Medium gefüttert. Die adhärent wachsenden Zelllinien wurden jeden zweiten bis dritten Tag durch Behandlung mit Trypsin-EDTA vom Kulturschalenboden gelöst und verdünnt in neue Schalen mit frischem Medium ausgesät. Die Suspensionszelllinien wurden im alten Medium resuspendiert, wobei ein Teil der Suspension verworfen und der Rest mit frischem Medium aufgefüllt wurde.

Transfektion und Titerbestimmung viraler Überstände

Um Zielzellen infizieren zu können, mussten Virusüberstände hergestellt werden. Dafür eignete sich die Zelllinie Phoenix, die transient mit den entsprechenden Plasmiden nach der Kalziumphosphat-Methode transfiziert wurde. Für die Infektion muriner Zelllinien wurde die Verpackung mit dem pEcoEnv Expressionsplasmid bzw. für die Infektion humaner Stammzellen das Expressionsplasmid pRD-114 Env versehen, jeweils 5 µg pro Schale, außerdem 5 µg des benötigten retroviralen Vektors sowie 10 µg Gag-Pol-Plasmid pro Schale. Zusätzlich wurden 62 µl 2M CaCl_2 hinzugefügt und

der gesamte Ansatz mit aqua dest auf ein Endvolumen von 500 µl gebracht. Die Präzipitation erfolgte durch tropfenweises Pipettieren des Ansatzes in 500 µl 2 x Präzipitationspuffer (HEPES 50 mM, NaCl 280 mM, Na₂HPO₄ 1,5 mM pH 7,05), in dem mit Hilfe einer Pasteurpipette Luftblasen erzeugt wurden, um die Oberfläche des Präzipitationspuffers zu vergrößern. Kurz vor Transfektion der am Vortag in einer Zelldichte von 5 x 10⁶ Zellen/ml gesäten Phoenix-Zellen, wurde zu dem frischen Medium Chloroquin (Sigma-ALDRICH, Taufkirchen) im Verhältnis 1:1000 gegeben. Anschließend wurde der Präzipitationsansatz vorsichtig auf die Zellen pipettiert. Nach ca. 6 h wurde das Medium gegen frisches DMEM-Medium mit 50 mM HEPES (2-(N-Hydroxyethylpiperazin)-2-ethansulfonsäure) ausgetauscht. Ab dem folgenden Tag wurde in den nächsten 2-3 Tagen alle 12 h der Virusüberstand abgenommen und durch einen sterilen Millex-GP Filter (0,22µm) gegeben und die Zellen mit frischem DMEM-HEPES gefüttert. Der Überstand wurde zügig bei -70°C eingefroren.

Für die Virustiterbestimmung wurden in einer 24-Loch-Zellkulturschale pro Vertiefung 5x10⁴ TE 671-Zellen/ml ausgesät. Nach 4 h wurden unterschiedliche Volumina der viralen Überstände zusammen mit frischem DMEM-Medium auf ein Endvolumen von 500 µl auf die TE 671-Zellen gegeben. Es folgte eine einstündige Zentrifugationsphase bei 37°C und 200 rpm, um die Transduktionseffizienz zu verbessern. Der Mediumwechsel erfolgte 6-12 h nach Inkubation im Brutschrank. 3 Tage nach der Infektion der TE 671-Zellen erfolgte die Bestimmung der Infektionsrate mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse am FACSCalibur (BD Becton-Dickinson, Heidelberg). Die Berechnung des Virustiters setzt sich zusammen aus dem Prozentsatz der eGFP-positiven Zellen bezogen auf die Anzahl der ausgesäten Zellen multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor des eingesetzten Volumens Virusüberstand in 500 µl Gesamtvolumen. Das Ergebnis wird auf einen Milliliter umgerechnet und der Virustiter in „fluorescence transfer units/ml“ angegeben.

Kotransfektion

Die Kotransfektion wurde benutzt, um Hinweise auf die Effizienz der siRNAs zu erhalten. Dabei wurde genau wie bei der Transfektion die Kalziumphosphat- Methode verwendet. Die zuvor in den pSuper-Vektor klonierten Oligonukleotide wurden mit pSF/mutCEBPA-eGFP bzw. pSF/mutTEL-eGFP kotransfiziert. Es wurde aber kein EcoEnv-Expressionsplasmid und Gag-Pol-Plasmid verwendet, also keine Viruspartikel produziert. 10 µg des siRNA- enthaltenden pSUPER-Vektors und 1 µg von pSF/mutCEBPA-eGFP bzw. pSF/mutTEL-eGFP wurden mit 62 µl CaCl₂ (2 M) und aqua dest ad 500 µl versetzt. Die weiteren Schritte waren genau wie bei der

Transfektion. 48 h später erfolgte die Analyse der transfizierten Phoenix-Zellen am FACSCalibur, wobei die siRNA- Funktionalität anhand der reduzierten Fluoreszenz in Prozent im Vergleich zur Kontrolle (pSUPER-Vektor ohne siRNA) getestet werden konnte.

Infektion von Zielzellen

Infektion von adhärennten Zelllinien

Die adhärennt wachsenden Zellen (siehe Tab.3) wurden am Vortag in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/ml pro 6-Loch-Platte in 1 ml Medium ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Infektion mit dem jeweiligen filtrierten, virushaltigen Überstand in einem Volumen von bis zu 2 ml. Alle 12 h konnten die Zellen auf diese Weise bis zu dreimal infiziert werden. Die Suspensionszellen wurden am Infektionstag in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/ml ausgesät. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Infektionsrate anhand der Prozentrate der eGFP-, YFP- bzw. RFP- positiver Zellen am FACSCalibur. Mit Hilfe der FACS-Analyse wurde ebenfalls die Wirkung der siRNA nachgewiesen (siehe Kapitel 3.1.4). Um weitere Versuche mit den transduzierten Zellen durchzuführen, wurden die Fluoreszenz-positiven Zellen 24 h nach der letzten Infektion im FACS Aria (BD Beckton-Dickinson, Heidelberg) sortiert. Zuvor wurden die Zellen mit Puffer gewaschen, für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert und das Pellet anschließend in $1 \times$ PBS/ 4% FBS- Lösung resuspendiert. Die Fluoreszenz-positiven Zellen wurden nach dem Sortieren in ein steriles FACS- Röhrchen mit 1 bis 2 ml frischem Medium aufgefangen. Die Sortierung wurde von Herrn A. Düsedau durchgeführt.

Arbeiten mit hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen

Immunmagnetische Gewinnung CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut

Um aus dem Nabelschnurblut CD34⁺-Zellen zu gewinnen, wurde das EasySep™- Human CD34 Selection Kit (StemCell Technologies, Vancouver, Kanada) verwendet. Dabei handelt es sich um eine immunmagnetische Methode zur Detektion von Zielzellen. Die Zielzellen wurden durch CD34-Rezeptor-spezifische Tetramer-Antikörper- Komplexe gebunden, welche über eine Dextranbindungsstelle magnetische Nanopartikel binden und auf diese Weise mit Hilfe von spezifischen Magneten von den übrigen Zellen isoliert werden können. Zunächst wurde das sich in IMDM- Medium

befindende Nabelschnurblut mit dem doppelten Volumen Puffer verdünnt und jeweils 35 ml dieser Verdünnung vorsichtig auf 15 ml Ficoll-Paque™ (100 ml Ficoll-Lösung enthalten 5,7 g Ficoll PM400, 9,0 g Natriumdiatrizoat-Dihydrat, 0,0231 g $\text{CaNa}_2\text{-EDTA}$, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) in vorbereiteten Röhrchen pipettiert, ohne dass sich die Phasen mischten. Anschließend wurde der Ansatz für 30 min bei 1800 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert und die in der Interphase liegenden Zellen mit einer Pipette entnommen. Nach einem zweimaligen Waschschrift mit Puffer wurde die Zellzahl bestimmt.

Es wurden jeweils 10^8 Zellen in ein FACS-Röhrchen zusammen mit 1 ml Puffer gefüllt und anschließend 100 μl EasySep™ Positive Selection Cocktail hinzugefügt. Nach Durchmischung erfolgte eine Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur und eine Zugabe von 50 μl gemischte EasySep™ Magnetic Nanoparticles. Die Zellsuspension wurde wiederum gemischt und bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Anschließend wurde sie mit 1,5 ml Puffer auf ein Gesamtvolumen von 2,5 ml aufgefüllt, gemischt und das FACS-Röhrchen ohne Deckel in das magnetische Feld des EasySep™ Magneten gestellt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde der Überstand abgegossen, wobei das Röhrchen im Magneten verblieb, so dass die magnetisch markierten Zellen dadurch am Röhrchen haften blieben. Danach wurden 2,5 ml Puffer in das Röhrchen außerhalb des Magneten pipettiert, aber so, dass dabei die Wände des Röhrchens gespült wurden, und nach einem weiteren Inkubationsschritt im magnetischen Feld für 5 min inkubiert und wiederum abgegossen. Der gesamte Vorgang der CD34^+ -Zellseparation mittels EasySep™ wurde dreimal wiederholt. Nach dem 5. Abgießen wurden die CD34^+ -Zellen in beliebigem Volumen Medium resuspendiert und in Aliquots von $> 5 \times 10^5$ Zellen eingefroren.

Infektion humaner CD34^+ -Zellen mit RD114 pseudo-typisierten Retroviren

Um die Transduktionseffizienz der CD34^+ -Zellen zu erhöhen, wurde die Beschichtung der 6-Loch-Platten mit rekombinantem humanen Retronektin durchgeführt. Retronektin besitzt Bindungsstellen für Oberflächenproteine hämatopoetischer Zellen und für Viruspartikel, so dass es die Infektion erleichtert (Fehse et al., 1998; Kiem et al., 1998). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Retronektin das regenerative Potential humaner Stammzellen aufrecht erhält und sowohl terminale Differenzierung als auch Apoptose blockiert (Dao et al., 1998; Donahue et al., 2001). 2,5 mg Retronektin (Retronektin© TaKaRa, Cambrex BioScience, Verviers, Belgien) wurden in 2,5 ml aqua dest gelöst und ad 26 ml mit 1 x PBS (steril) versetzt, so dass die Endkonzentration 48 μg Protein pro Milliliter betrug. Anschließend wurde die Retronektin-Lösung durch ein

0,22 µm Millex-GV Filter gegeben. 2 ml der filtrierten Retronektin-Lösung wurden pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte für mindestens 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Entfernen der Lösung wurde der Boden der Schale mit 2 ml PBS/ 2% BSA für 30 min geblockt und anschließend verworfen, so dass die Vertiefungen mit 3 ml 3% HBSS-Waschlösung (1M HEPES in HBSS) befüllt wurden. Die HBSS-Waschlösung wurde am Tag der ersten Infektion verworfen und durch 2 ml des jeweiligen Virusüberstands ersetzt. Anschließend wurde der Virusüberstand für 20 min bei 2000 rpm und 4°C zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde dreimal mit frischem Virusüberstand wiederholt und danach der Virusüberstand verworfen. Die CD34⁺-Zellen wurden ca. 48 h vor der Infektion aufgetaut, in 3 ml SFEM-Medium (SFEM StemSpan, CellSystems, St.Katherinen) aufgenommen und in einer Dichte von 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen/ml in jeweils 2 ml Expansionsmedium kultiviert. Am Tag der Infektion wurden sie auf den mit Retronektin beschichteten Boden gegeben und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte auf gleiche Weise die zweite Infektion der CD34⁺-Zellen. Die Transduktionseffizienz lag zwischen 10 und 30% und die MOI (multiplicity of infection) zwischen 4 und 6. Die MOI bezieht sich auf die Viruspartikelzahl pro Zellzahl.

SFEM- Medium (Serum Free Medium)

PenStrep 2% (v/v)

Glutamin 1% (v/v)

steril filtriert in SFEM

Expansionsmedium

hFlt3- Ligand (100 ng/ml)

hSCF (100 ng/ml)

hTPO (20 ng/ml)

hIL-6 (20 ng/ml)

in SFEM-Medium

Differenzierung der CD34⁺-Zellen

Die Differenzierung der infizierten, eGFP-positiven CD34⁺-Zellen erfolgte entweder in Flüssigmedium oder als sog. CFU-C Assay (Colony Forming Unit- Colony Assay) in einem halbfesten Medium, der Methylcellulose. Für die Flüssigkultur wurden jeweils 3×10^5 eGFP-positive CD34⁺-Zellen sowie die Negativkontrolle in 1,5 ml

Differenzierungsmedium einer 24-Loch-Platte aufgenommen und alle 2-3 Tage gefüttert. Die Analyse der Zellen (Aliquots) erfolgte an bestimmten, in der Arbeitsgruppe Molekulare Pathologie festgelegten Tagen in Form von FACS-Analysen und/oder Zytospins.

Differenzierungsmedium

hSCF (50 ng/ml)

hIL-3 (50 ng/ml)

hGM-CSF (50 ng/ml)

in SFEM-Lösung

Für den CFU-C Assay wurden die Methylzellulosen H4230 und H4434 (Methocult™ CellSystems, St.Katherinen) verwendet.

Inhalt der Methylzellulose H4230

Methylzellulose in IMDM 1%

FBS 30%

BSA 1%

2- Mercaptoethanol 10^{-4} M

L- Glutamin 2 mM

Inhalt der Methylzellulose H4434

Methylzellulose in IMDM 1%

FBS 30%

BSA 1%

2- Mercaptoethanol 10^{-4} M

L- Glutamin 2 mM

hSCF 50 ng/ml

hGM-CSF 10 ng/ml

hIL-3 10 ng/ml

hEPO 3 U/ml

Pro Konstrukt wurde ein dreifacher Ansatz von insgesamt 3×10^3 eGFP-positiver CD34⁺- Zellen (sowie der gleiche Ansatz ungefärbter Zellen) in 300 μ l 1 x PBS-Lösung pipettiert und anschließend mit 3 ml Methylzellulose sowie 1% PenStrep versetzt. Die

Zellsuspension wurde nach Durchmischung luftblasenfrei auf drei Petrischalen mit 35 mm Durchmesser verteilt und für 15 Tage in einem Brutschrank mit besonders hoher Feuchtigkeit (> 95%) inkubiert. Nach diesem Zeitraum wurden die Kolonien bestimmt, gezählt und es wurden Zytospins gemacht.

Erstellen und Färben von Zytospins

Es wurde eine Zellzahl zwischen 1×10^4 und 5×10^5 Zellen/ml pro Objektträger je nach gewünschter Zelldichte in einem Volumen von 500 μl in eine Probenkammer mit fixiertem Objektträger und einem Filter pipettiert. Anschließend wurden die Zellen 5 min lang mit einer Geschwindigkeit von 700 rpm auf den Objektträger im Shanon Cytospin3 (Pittsburgh, USA) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation trockneten die Objektträger, um am folgenden Tag mit der Pappenheim-Färbung der Zellen fortzufahren. Bei der Pappenheim-Färbung erfolgt im ersten Schritt eine Färbung mit May-Grünwald-Färbelösung (May-Grünwald Stain, 0,25% Accustain®, SIGMA ALDRICH, Taufkirchen) für 5 min. Danach wird die Färbelösung mit dH_2O abgespült, luftgetrocknet und anschließend für 15 min mit einer 5%igen Giemsa-Färbelösung (Giemsa Stain Stock Solution 0,4%, SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen) überschichtet. Nach erneutem Abspülen mit dH_2O trockneten die Objektträger über Nacht, um am nächsten Tag mit EUKIT (O.Kindler, Freiburg) fixiert zu werden.

2.2.4 Etablierung des Testmodells für shRNAs der RNAi-Methode

Auswahl und Klonierung der Oligonukleotide

Die Oligonukleotide für die Synthese von siRNA wurden mit Hilfe des DEQOR-Programms ausgesucht (Henschel et al., 2004) und richteten sich gegen das humane *CEBPA*, das humane *TEL* sowie als Kontrolle gegen das Markergen *eGFP*. In dieser Arbeit wurden die Oligonukleotide in Form von DNA in den pSUPER-Vektor kloniert, damit die Information stabil und dauerhaft zusammen mit der Vektor-DNA in das Wirtsgenom integriert wird.

Weitere Kriterien, die für die Auswahl der Oligos berücksichtigt wurden:

1. Eine Anzahl von 19-21 Nukleotiden
2. Keine Abschnitte mit 4 oder mehr aufeinanderfolgenden T- oder A- Enden, um frühzeitige Pol III- Transkriptions-(Stop)-Signale zu umgehen
3. Einen GC- Anteil von 30-70%
4. Das jeweilige Oligonukleotid muss innerhalb der kodierenden Sequenz des jeweiligen Zielgens liegen
5. Die Sequenz soll mit einem G oder C beginnen
6. Das Oligonukleotid soll möglichst nach einem AA-Dimer in 5`- Ausrichtung beginnen
7. und vor einem TT-, TG- oder GT- Basenpaar in 3`- Ausrichtung enden
8. Das Oligonukleotid soll spezifisch für das jeweilige Gen sein

Die synthetischen Oligonukleotide wurden dem Prozess des Annealings unterzogen und in den geschnittenen und Phosphatase-behandelten pSUPER-Vektor ligiert. pSUPER ermöglicht die Klonierung von Oligonukleotiden, die unter Kontrolle des Polymerase-III-H1-Promotors in shRNA transkribiert werden. Die shRNA wird dann in der Zelle zu siRNA prozessiert (Brummelkamp et al., 2002). pSUPER wurde mit Bgl II und Hind III geschnitten. Die Oligonukleotide *cebp1*, *cebp2*, *cebp3*, *tel1-4* und *tel8* sowie *gfp2* wurden hybridisiert und in den Vektor kloniert. Anschließend erfolgte die Transformation des kompetenten Bakterienstamms XL10 Gold mit dem Ligationsansatz, der Selektion von Kolonien auf Agar-Platten gefolgt von der DIP-PCR. Aus den positiven Klonen wurden Midi- bzw. Maxipräparationen gemacht. Die

pSUPER-Kassette wurde mitsamt dem Oligonukleotid für weitere Klonierungen mit den Enzymen Sma I und Hinc II ausgeschnitten und aus 1,5% TAE-modifiziertem Agarosegel isoliert.

Etablierung der Zelllinien SC1/mutCEBPA-YFP und SC1/mutTEL- eGFP

Nach transienter Transfektion von Phoenix-Zellen mit den Plasmiden pSF/mutCEBPA-YFP bzw. pSF/mutTEL-eGFP und den viralen Verpackungsplasmiden pEcoEnv und pSV40-gag-pol sowie anschließender Infektion der SC-1-Zellen mit den viralen Überständen, wurde die Infektionsrate anhand der Prozenrate YFP- bzw. eGFP-positiver Zellen am FACSCalibur überprüft. Die YFP- bzw. eGFP-positiven Zellen wurden am FACSaria sortiert, um mit siRNA-exprimierenden retroviralen Vektoren infiziert zu werden.

Siehe auch Kap.3.1.3 und Abb.11 in Kap.3.1.3.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung der RNA-Interferenz (RNAi) – Methode für die Transkriptionsfaktoren CEBP/α und TEL

Für die RNAi-Methode ist es erforderlich, kurze (19-21 Basen) Oligonukleotide zu finden, die nach Klonierung in geeignete Plasmidvektoren als shRNA exprimiert werden und als solche die Expression des zu untersuchenden Gens ausschalten bzw. reduzieren. Mit Hilfe des Computerprogramms DEQOR wurden zunächst Oligonukleotide für die Gene *CEBPA* und *TEL* ausgewählt und in das Plasmid pSUPER (*suppression of endogenous RNA*) oder einen retroviralen Vektor mit einer pSUPER-Kassette kloniert, welche die Synthese von shRNA ermöglicht. Die Effektivität der jeweiligen shRNAs wurde in Zelllinien getestet, die *CEBPA* bzw. *TEL* transient oder stabil in Form von bizistronischen mRNAs überexprimieren und die neben dem zu untersuchendem Protein auch für das Fluoreszenzprotein YFP (*yellow fluorescent protein*) bzw. eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) kodieren. Die RNAi-vermittelte Reduktion der Expression von *CEBPA* bzw. *TEL* vermindert daher auch die Expression des von derselben mRNA kodierten YFPs bzw. eGFPs. Da eine Veränderung der jeweiligen Fluoreszenz mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen werden kann und die gemessene Fluoreszenz direkt proportional zur Menge der YFP- bzw. eGFP-mRNA ist (Soboleski et al., 2005), dient sie in den im Folgenden beschriebenen Versuchen als Kriterium für die Effektivität der getesteten Oligonukleotide.

3.1.1 Identifizierung von genspezifischen Zielsequenzen für die RNA-Interferenz

Genspezifische Oligonukleotide, die potentiell für die RNA-Interferenz geeignet sind, wurden auf Grund von theoretischen Überlegungen und mit Hilfe eines Computerprogramms ausgewählt (siehe Kap.2.2.4). Die Sequenz und Position dieser Oligonukleotide sind für *CEBPA* in Abb.5 und für *TEL* in Abb.6 beschrieben.

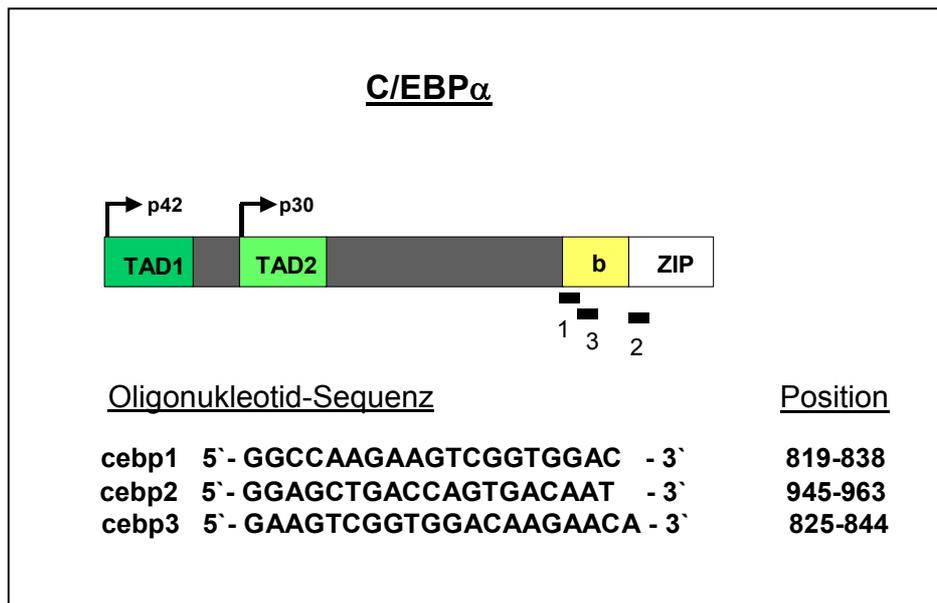


Abb.5: Darstellung des translatierten Bereichs der *CEBPA*-cDNA und der ausgewählten Oligonukleotide für die RNA-Interferenz

Sequenzmotive für die Transaktivierungsdomänen (TAD1 und TAD2), die basische Region (b) und die Leuzin-Zipper Region (ZIP) sind gekennzeichnet. Die Startstellen für die Proteine p42 und p30, die beide von der *CEBPA*-cDNA kodiert werden können, sind durch Pfeile markiert. Die Position des jeweiligen Oligonukleotids ist rechts unten angegeben und bezieht sich auf die *CEBPA*- Sequenz in der Datenbank (accession number: NM004364). Das A des Startcodons ATG ist in Position 1.

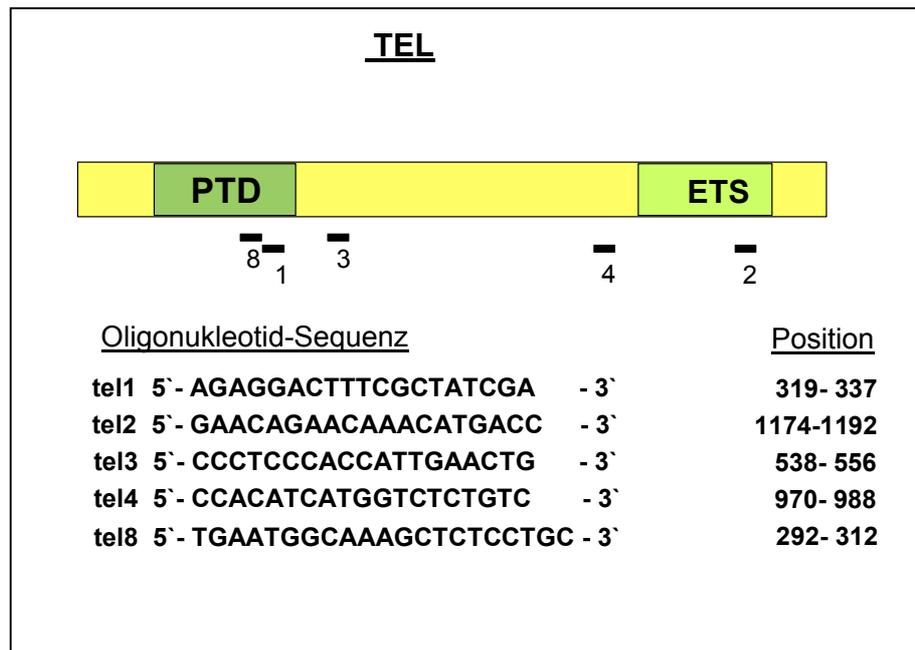


Abb.6: Darstellung des translatierten Bereichs der *TEL*-cDNA und der ausgewählten Oligonukleotide für die RNA-Interferenz

Sequenzmotive, die für die Pointed Domain (PTD) und die DNA-Bindungsdomäne ETS kodieren, sind gekennzeichnet. Die Position des jeweiligen Oligonukleotids ist rechts unten angegeben und bezieht sich auf die *TEL*-Sequenz in der Datenbank (accession number NM001987). Das A des Startcodons ATG hat die Position 1.

3.1.2 Transiente Expression zur funktionellen Charakterisierung von shRNAs

Die Oligonukleotide wurden zunächst in das Plasmid pSUPER kloniert, das die Synthese von shRNA erlaubt, die anschließend in siRNA prozessiert wird. Diese Plasmide, die im Folgenden als pSUPER/ceb1 etc. bzw. pSUPER/tel1 etc. bezeichnet werden, wurden zusammen mit den Plasmiden pSF/mutCEBPA-eGFP bzw. pSF/mutTEL-eGFP (siehe Abb.7) in Phoenix-Zellen transient exprimiert. Die Plasmide pSF/mutCEBPA-eGFP bzw. pSF/mutTEL-eGFP enthalten jeweils eine provirale DNA, von der unter Kontrolle der viralen LTR eine bizistronische mRNA transkribiert wird, die sowohl für eGFP wie auch für ein mutiertes *CEBPA* (mutCEBPA) bzw. ein mutiertes *TEL* (mutTEL) kodiert (Morgan et al., 1992; siehe Abb.7). RNAi-vermittelte Reduktion der Expression von *CEBPA* bzw. *TEL* beeinflusst daher auch die Expression von eGFP, die mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen wird. Als Positivkontrolle diente siRNA gegen eGFP im pSUPER (pSUPER/gfp2), die zu einer Reduktion der

eGFP-Expression führt (Scherr et al., 2003). Als Negativkontrolle wurde pSUPER ohne siRNA mit dem gleichen bizistronischen Vektor kotransfiziert.

Für die Versuche wurden mutierte Formen von *CEBPA* bzw. *TEL* eingesetzt, da Überexpression der Wildtyp-Proteine in Langzeitkulturen die Proliferation der Zellen negativ beeinflusst und einen Selektionsnachteil zur Folge hat. Im Fall von mutCEBPA handelt es sich um die Mutante 10 (Pabst et al., 2001) und im Fall von mutTEL um die Mutante 3D9 (van Waalwijk et al., 2005). Die für die RNAi-Experimente benutzten Oligonukleotide kommen sowohl in der Wildtypsequenz als auch in der mutierten Sequenz vor. Um Missverständnisse zu vermeiden, sollte betont werden, dass die unter Kontrolle der LTR synthetisierten bizistronischen mRNAs im Kotransfektionsversuch nicht in Retroviruspartikel verpackt werden, da in den für die transiente Transfektion benutzten Zellen die für eine Verpackung erforderlichen Proteine fehlen.

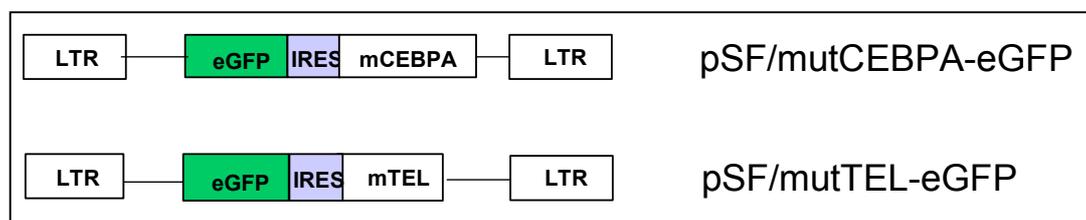


Abb.7: Struktur der proviralen DNA der Plasmide pSF/mutCEBPA-eGFP und pSF/mutTEL-eGFP

Unter Kontrolle der LTR (long terminal repeat) wird eine bizistronische mRNA synthetisiert, die sowohl für eGFP (enhanced green fluorescent protein) als auch für das humane mutCEBPA bzw. mutTEL kodiert. IRES= internal ribosomal entry site; die Größenverhältnisse sind nicht maßstabgerecht.

Ein Beispiel für Veränderungen der eGFP-Fluoreszenz nach transienter Koexpression von pSF/mutTEL-eGFP mit verschiedenen pSUPER/tel-Konstrukten ist in Abb.8 gezeigt. In Gegenwart von pSF/mutTEL-eGFP und pSUPER allein (Negativkontrolle) sind in der Analyse am FACSCalibur etwa 43% der Zellen eGFP-positiv. Als Positivkontrolle dienen die mit pSUPER/gfp2 kotransfizierten pSF/mutTEL-eGFP, deren eGFP-Fluoreszenz 27% beträgt, also eine Reduktion um etwa 37% gegenüber der Negativkontrolle hat. Wie in Abb.8 ersichtlich, zeigen die verschiedenen pSUPER/tel-Konstrukte unterschiedliche Effekte: tel4 weist eine besonders starke

Reduktion auf, während tel2 kaum einen Effekt zeigt. Alle Kotransfektionsexperimente wurden dreimal wiederholt, um so auszuschließen, dass die Ergebnisse durch unterschiedliche Transfektionseffizienzen beeinträchtigt werden.

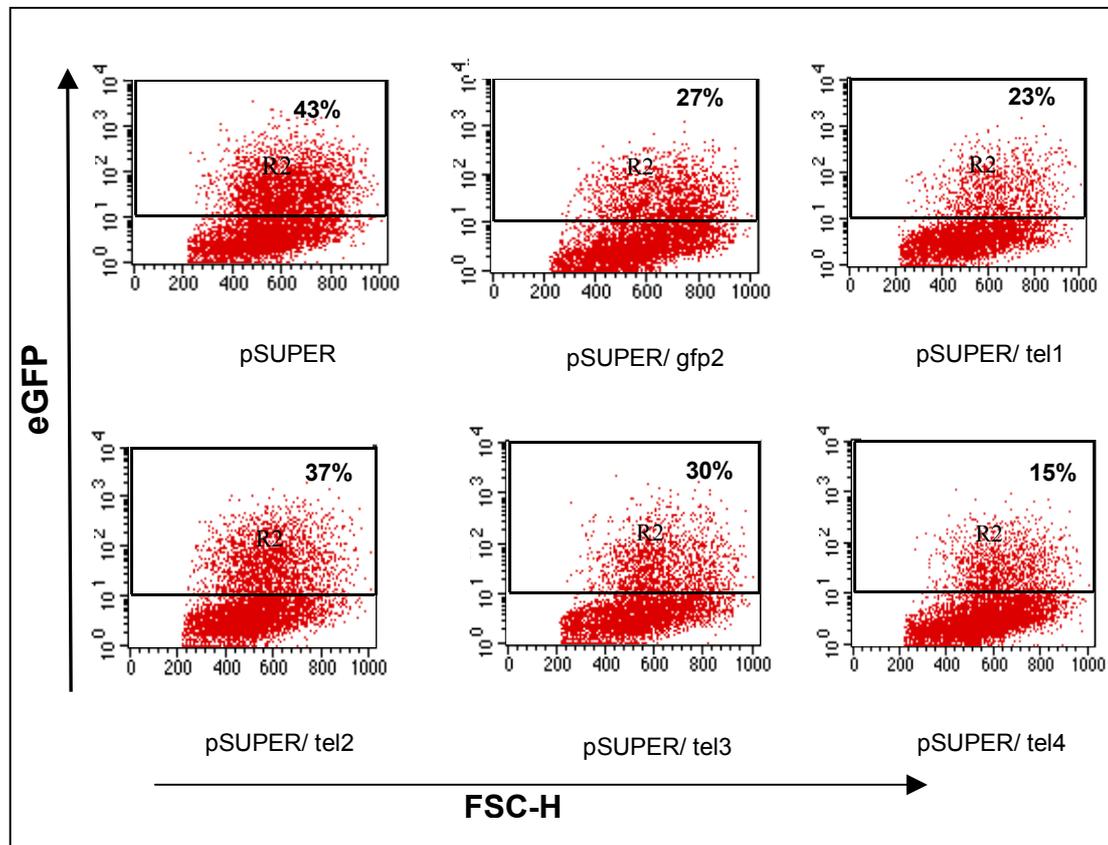


Abb.8: Durchflusszytometrische Analyse der eGFP-Fluoreszenz nach transienter Koexpression von pSF/mutTEL-eGFP mit verschiedenen TEL-siRNAs

Phoenix-Zellen wurden mit pSF/mutTEL-eGFP und den jeweils angegebenen pSUPER-Konstrukten kotransfiziert. Nach 48 Stunden wurde die eGFP-Fluoreszenz mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen. Die % eGFP-positiven Zellen sind angegeben.

Die Analyse der kotransfizierten Phoenix-Zellen am FACSCalibur zeigt eine herabgesetzte Fluoreszenz der Zellen in Gegenwart von shRNA gegen *TEL* im Vergleich zur Negativkontrolle. Von den hier untersuchten Oligonukleotiden verursacht tel4 die stärkste Reduktion. In Abb. 9 ist das Ergebnis der Kotransfektionen in Form eines Diagramms dargestellt.

Auch die *CEBPA*-Gen-spezifischen Oligonukleotide cebp1, 2, und 3 wurden wie für *TEL* beschrieben durch transiente Koexpressionen getestet. In diesem Fall wurde das Plasmid pSF/mutCEBPA-eGFP eingesetzt, von dem unter Kontrolle der viralen LTR eine bizistronische mRNA transkribiert wird, die sowohl für eGFP als auch für ein mutiertes *CEBPA* (mutCEBPA) kodiert. Es zeigte sich, dass cebp3 die eGFP-

Fluoreszenz um etwa 40% im Vergleich zur Negativkontrolle (pSUPER allein) reduzierte und damit von den 3 getesteten Oligonukleotiden am effizientesten ist.

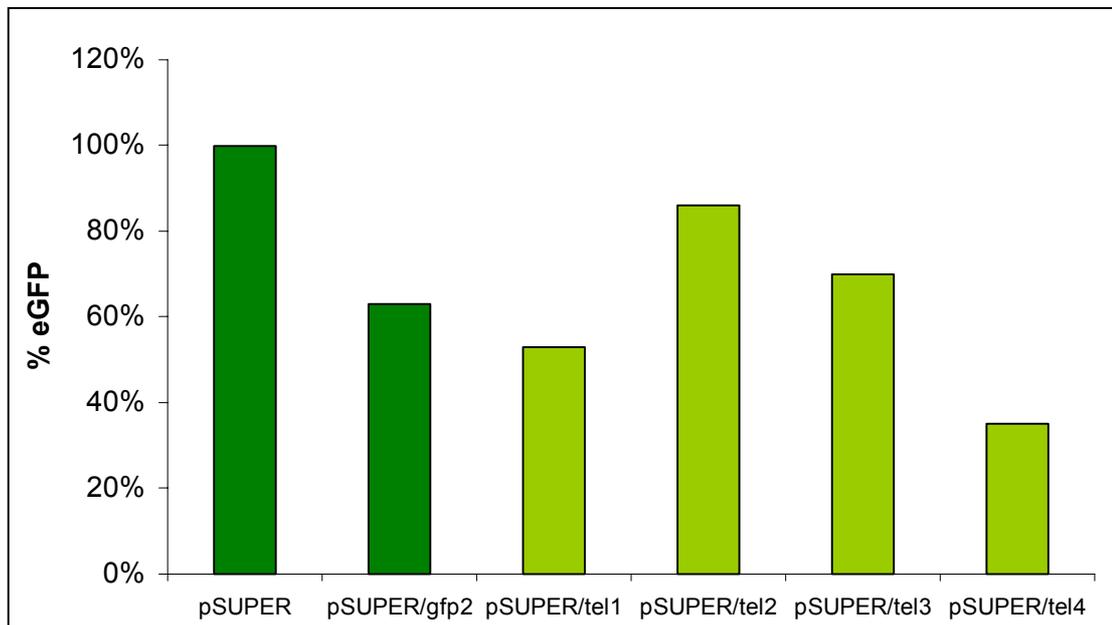


Abb.9: Darstellung der eGFP-Fluoreszenz nach transienter Koexpression von pSF/mutTEL-eGFP mit verschiedenen siRNAs gegen TEL

Es wurden Phoenix-Zellen mit den oben aufgeführten Konstrukten und pSF/mutTEL-eGFP kotransfiziert und nach 48 Stunden am FACSCalibur analysiert. Die eGFP-Fluoreszenz der Negativkontrolle (pSUPER allein) wurde gleich 100% gesetzt und die Prozentwerte der weiteren Messwerte in Relation zu diesem Wert gesetzt.

3.1.3 Retrovirale Vektoren zur stabilen Expression von shRNA

Zur Beantwortung der im Rahmen dieser Doktorarbeit gestellten Fragen ist es erforderlich, shRNA mit Hilfe von retroviralen Vektoren über längere Zeit zu exprimieren. Daher wurden im nächsten Schritt Oligonukleotide, die sich im Kotransfektionstest als effektiv erwiesen hatten, in retrovirale Vektoren eingesetzt. Es wurden zwei verschiedene Vektoren ausgetestet, deren provirale Struktur schematisch in Abb.10 gezeigt ist. Der Vektor RSR (*RetroSUPER-Red fluorescent protein*) besitzt eine intakte LTR mit Promotor und Enhancer, unter deren Kontrolle die gesamte provirale DNA einschließlich des Fluoreszenzmarkers (RFP) transkribiert wird. RSR enthält eine SUPER-Kassette, in der die jeweiligen Oligonukleotide (gfp2 in Abb.10) kloniert und unter Kontrolle des H1-Promotors in shRNA transkribiert werden. Der Vektor RSR-SIN (*RetroSUPER-Red-Self Inactivating*) enthält eine defekte LTR, bei der die Enhancer-Region deletiert wurde. Dieser Vektor kann zwar weiterhin in die

Wirtszell-DNA integrieren, aber aufgrund der defekten LTR erfolgt keine oder nur eine sehr schwache Transkription der proviralen DNA. In diesem Vektor erfolgt die Expression des Reportergens unter Kontrolle des internen PGK (Phosphoglyceratkinase) Promotors. RSR-SIN enthält ebenfalls eine SUPER-Kassette mit H1-Promotor, in der die Oligonukleotide (gfp2 in Abb.10) kloniert werden.

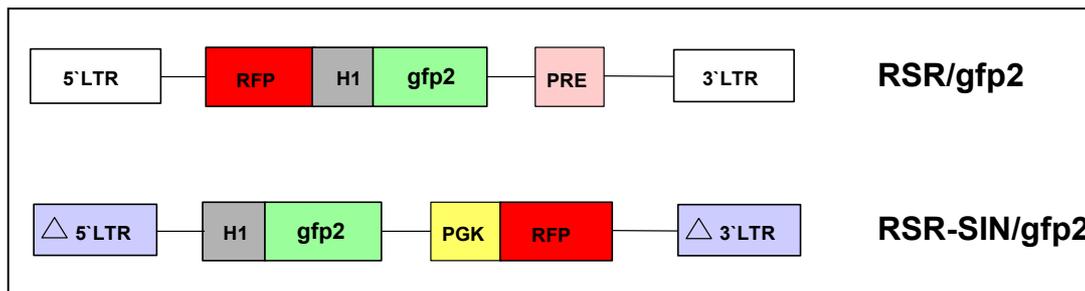


Abb.10: Darstellung der retroviralen Vektoren RSR/gfp2 und RSR-SIN/gfp2

Der Vektor pRSR besitzt eine intakte LTR. Der Vektor pRSR-SIN hat in seiner LTR eine Deletion, die mit Delta gekennzeichnet ist. In beide Vektoren wurde gfp2 kloniert. LTR= long terminal repeat, RFP= red fluorescent protein, H1= Histon1-RNA-Promotor, gfp2= siRNA gegen eGFP, PRE= posttranscriptional regulatory element, PGK= Phosphoglycerat-Kinase-Promotor, die Größenverhältnisse sind nicht maßstabgerecht.

Um ein Testsystem zu haben, das es erlaubt, relativ einfach den Effekt der RNA-Interferenz nach Infektion mit den oben beschriebenen retroviralen Vektoren quantitativ zu analysieren, wurden Zelllinien etabliert, die bizistronische mRNAs synthetisieren. Diese wiederum kodieren neben *CEBPA* bzw. *TEL* für ein Fluoreszenzprotein (siehe Abb.11). Ausgangspunkt für die Etablierung dieser Zelllinien waren die bereits weiter oben beschriebenen Plasmide pSF/mutCEBPA-eGFP bzw. pSF/mutTEL-eGFP (siehe Abb.7). Im Fall von pSF/mutCEBPA-eGFP wurde allerdings das für *eGFP* kodierende Gen durch das Gen für *YFP* (*yellow fluorescent protein*) ersetzt. Das resultierende Plasmid wurde als pSF/mutCEBPA-YFP bezeichnet. *YFP* und *eGFP* unterscheiden sich in der Sequenz ihres Chromophors, sind aber in der übrigen Sequenz sehr ähnlich. Die Sequenz für Oligonukleotid gfp2, das für die RNA-Interferenz benutzt wird, ist in beiden Genen identisch. Phoenix-Zellen wurden mit den oben genannten Plasmiden (pSF/mutCEBPA-YFP bzw. pSF/mutTEL-eGFP) und Plasmiden, die für die viralen Verpackungsproteine kodieren, transformiert. Die Viruspartikel im Überstand wurden dann für die Infektion von SC-1-Zellen benutzt. Anschließend wurden die YFP- bzw. eGFP-positiven Zellen im Zellsorter angereichert. Auf diese Weise entstanden die Zelllinien SC1/mutCEBPA-YFP bzw. SC1/mutTEL-eGFP (siehe Abb.11). Es zeigte

sich, dass bei diesen Zelllinien nie 100% aller Zellen YFP- bzw. eGFP-positiv waren. Dies beruht darauf, dass die *YFP/CEBPA* bzw. *eGFP/TEL* exprimierenden Zellen gegenüber den nicht infizierten SC-1-Zellen, die auch nach der Zellsortierung noch in geringem Prozentsatz vorhanden sind, einen Wachstumsnachteil haben und ihr Anteil im Laufe der Zeit abnimmt. Die für die folgenden Experimente benutzten Zellen waren zu etwa 63% YFP- und zu etwa 52% eGFP-positiv.

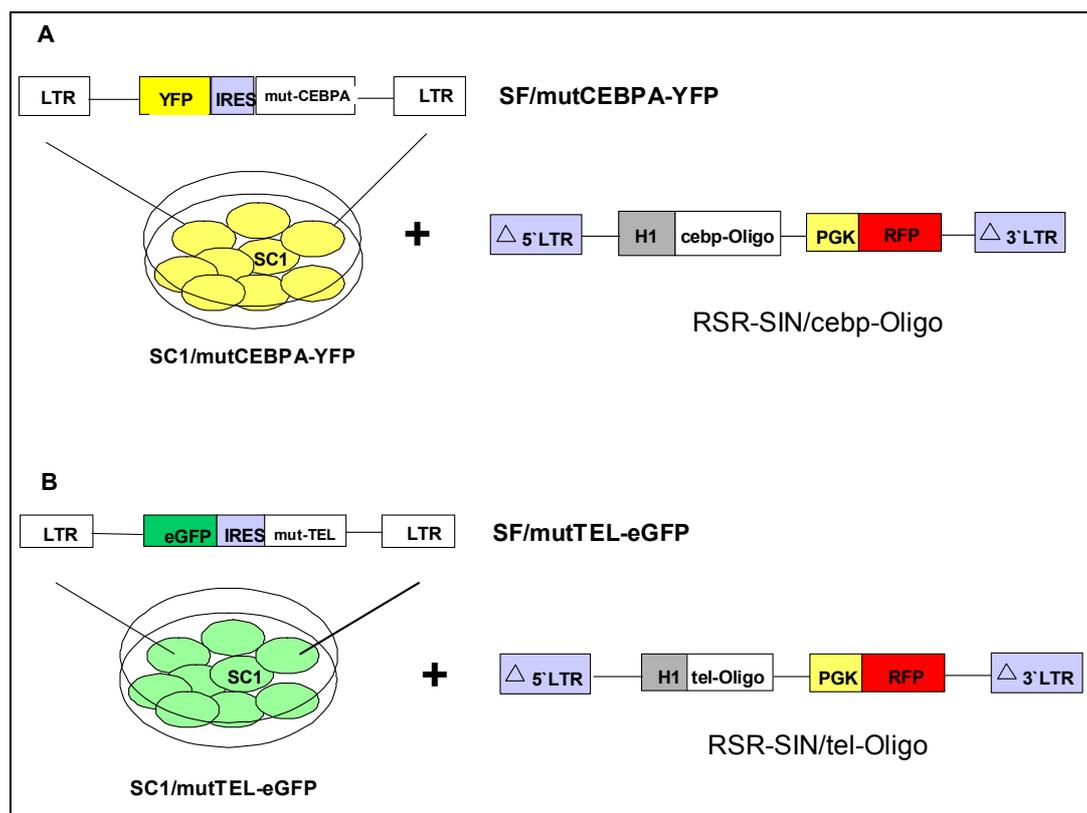


Abb.11: Etablierung der Zelllinien SC1/mutCEBPA-YFP bzw. SC1/mutTEL-eGFP für die siRNA-Testung

Der retrovirale SIN-Vektor enthält siRNAs gegen *CEBPA* bzw. *TEL*. Die Größenverhältnisse sind nicht maßstabgerecht, Einzelheiten siehe Text.

Mit Hilfe des gerade beschriebenen Testsystems wurde zunächst untersucht, welcher von den beiden oben genannten retroviralen Vektoren am besten für die Expression von shRNA geeignet ist. Zu diesem Zweck wurde das Oligonukleotid *gfp2* sowohl in pRSR wie auch pRSR-SIN kloniert und Virusüberstände hergestellt. Die im Überstand befindlichen Viren, RSR/*gfp2* bzw. RSR-SIN/*gfp2*, wurden dazu benutzt, die oben beschriebene Zelllinie SC1/mutTEL-eGFP zu infizieren. Die Effektivität der beiden Vektoren wurde wiederum bestimmt, indem die eGFP-Fluoreszenz im

Durchflusszytometer gemessen wurde. Wie in Abb.12 schematisch dargestellt, zeigte der Vektor RSR-SIN/gfp2 im Vergleich zur Negativkontrolle (RSR-SIN allein) eine Reduktion der eGFP-Fluoreszenz um etwa 82% auf 18%. Der Vektor RSR/gfp2 zeigte hingegen nur einen geringen Effekt und reduzierte die eGFP-Fluoreszenz nur um etwa 12% auf etwa 88% der Negativkontrolle (RSR allein). Zusammenfassend zeigen diese Versuche eindeutig, dass der Vektor RSR-SIN am besten für die Expression von shRNA geeignet ist. Dieser Vektor wurde daher auch für alle folgenden Versuche benutzt.

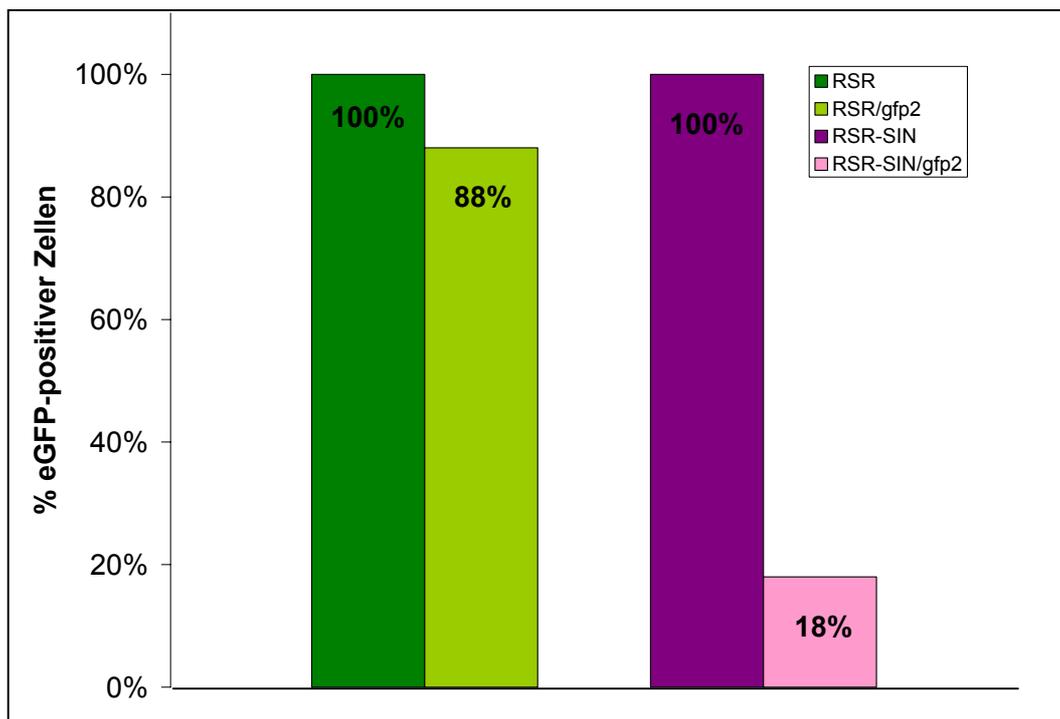


Abb.12: Darstellung der eGFP-Fluoreszenz nach Infektion von SC1/mutTEL-eGFP mit RSR/gfp2 und RSR-SIN/gfp2

SC1/mutTEL-eGFP-Zellen wurden mit RSR/gfp2 bzw. RSR-SIN/gfp2 infiziert. Die eGFP-Fluoreszenz ist in Prozent angegeben. Die eGFP-Fluoreszenz der Kontrolle wurde jeweils gleich 100% gesetzt.

3.1.4 Reduktion der Expression von *CEBPA* und *TEL* mit Hilfe retroviral exprimierter shRNAs

Nachdem gezeigt war, dass der retrovirale Vektor RSR-SIN am besten geeignet ist, um shRNAs zu exprimieren, mussten nun die effizientesten shRNAs gegen *CEBPA* bzw. *TEL* aus der bereits durch transiente Expression vorgenommen engeren Auswahl

ermittelt werden, die dann für die Infektion der hämatopoetischen Stammzellen eingesetzt werden sollten. Durch Klonierung der Oligonukleotide in pRSR-SIN entstanden die Vektoren RSR-SIN/cebp2 und RSR-SIN/cebp3 sowie RSR-SIN/tel4 und RSR-SIN/tel8. Als Positivkontrolle wurde der Vektor RSR-SIN/gfp2 verwendet, welcher in den weiter oben geschilderten Versuchen zu einer deutlichen Reduktion der eGFP-Fluoreszenz geführt hatte (Abb.12). Über Transfektion von Phoenix-Zellen wurden Viruspartikel produziert, die die jeweiligen Vektoren enthielten. Mit diesen Virusüberständen wurden die oben beschriebenen etablierten Zelllinien SC1/mutCEBPA-YFP bzw. SC1/mutTEL-eGFP infiziert. Zehn Tage nach der Infektion wurden die Zellen am Durchflusszytometer analysiert.

Ein repräsentatives Beispiel für *CEBPA* ist in Abb.13 dargestellt. Die Analyse mit Hilfe des FACSCalibur zeigt, dass die für die Infektion benutzten SC1/mutCEBPA-YFP Zellen zu etwa 63% YFP-positiv sind (A). Infektion von SC-1-Zellen mit RSR-SIN führt dazu, dass etwa 90 -100% der Zellen RFP-positiv sind (B). Nach Infektion von SC1/mutCEBPA-YFP Zellen mit RSR-SIN (Negativkontrolle) sind etwa 63% der Zellen sowohl RFP- als auch YFP-positiv (C, oberer rechter Quadrant). Durch Infektion mit dem Vektor RSR-SIN/gfp2 (Positivkontrolle) wird die YFP-Expression reduziert und daher sind nur noch etwa 18% der Zellen RFP- und YFP-positiv (D). Infektion mit RSR-SIN/cebp2 bzw. RSR-SIN/cebp3 führt ebenfalls zu einer deutlichen Abnahme der YFP-Fluoreszenz, was dazu führt, dass nur noch etwa 14% bzw. 10% der Zellen doppelpositiv sind für RFP und YFP (E und F).

Zusammenfassend sind die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Versuchen in Abb.14 graphisch dargestellt. Die shRNAs der Oligonukleotide *cebp2* und *cebp3* zeigen beide eine sehr ähnliche Aktivität und reduzieren die Expression von *CEBPA* in diesem Testsystem um etwa 75% im Vergleich zur Negativkontrolle.

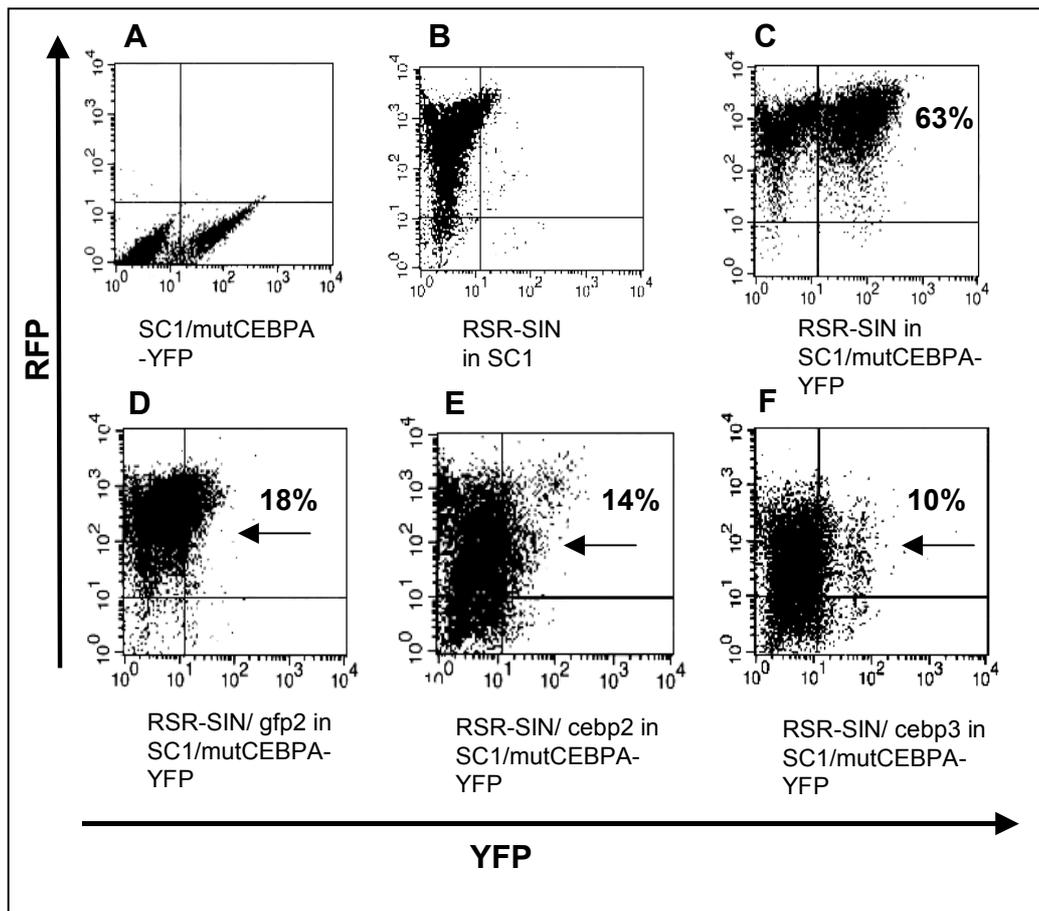


Abb.13: Vergleich von retroviral-exprimierten siRNAs gegen *CEBPA* mit Hilfe der FACS-Analyse

SC-1-Zellen bzw. SC1/mutCEBPA-YFP Zellen wurden mit den angegebenen retroviralen Vektoren infiziert und nach 10 Tagen mit Hilfe des FACS analysiert. (A) SC1/mutCEBPA-YFP-Zellen, uninfiziert; (B) SC1-Zellen infiziert mit RSR-SIN; (C) SC1/mutCEBPA-YFP infiziert mit RSR-SIN; (D) SC1/mutCEBPA-YFP infiziert mit RSR-SIN/gfp2; (E) SC1/mutCEBPA-YFP infiziert mit RSR-SIN/cebpb2; (F) SC1/mutCEBPA-YFP infiziert mit RSR-SIN/cebpb3. Die Pfeile geben die Richtung der Verschiebungen an. Weitere Erläuterungen im Text.

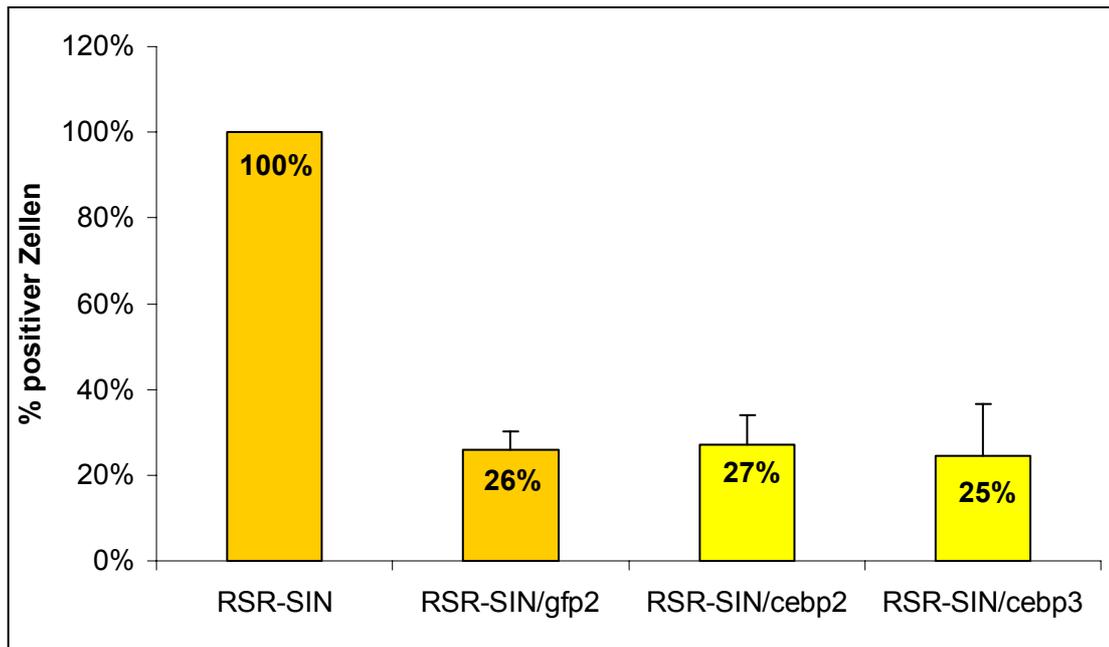


Abb.14: Darstellung der Fluoreszenz nach Infektion von SC1/mutCEBPA-YFP mit retroviralen Vektoren, die verschiedene siRNAs gegen CEBPA exprimieren

Der Mittelwert der Messwerte aus der Infektion von SC1/mutCEBPA-YFP ist auf 100 gesetzt, alle weiteren Messwerte sind relativ hierzu angegeben. Alle Werte beruhen auf Zweifachbestimmung.

Die shRNAs gegen *TEL* wurden nach dem gleichen Prinzip getestet wie gerade für *CEBPA* beschrieben. Die Zelllinie SC1/mutTEL-eGFP wurde mit RSR-SIN/tel4 und RSR-SIN/tel8 sowie RSR-SIN (Negativkontrolle) und RSR-SIN/gfp2 (Positivkontrolle) infiziert und am 10.Tag in der 2-Farben-Durchflusszytometrie analysiert. Ein repräsentatives Beispiel ist in Abb. 15 gezeigt. Nach Infektion von SC1/mutTEL-eGFP Zellen mit RSR-SIN (Negativkontrolle) sind etwa 52% der Zellen sowohl RFP- als auch eGFP-positiv (C). Durch Infektion mit dem Vektor RSR-SIN/gfp2 (Positivkontrolle) wird die eGFP-Expression reduziert und es sind nur noch etwa 25% der Zellen RFP- und eGFP-positiv (D). Infektion mit RSR-SIN/tel4 bzw. RSR-SIN/tel8 führt ebenfalls zu einer deutlichen Abnahme der eGFP-Fluoreszenz, was dazu führt, dass nur noch etwa 28% bzw. 15% der Zellen doppelpositiv sind für RFP und eGFP (E und F). In Abb.16 sind die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Versuchen graphisch dargestellt. Obwohl sich die gemessenen Werte bei den beiden Versuchen unterscheiden wird deutlich, dass in beiden Versuchen tel8 die Expression von *TEL* am stärksten reduziert.

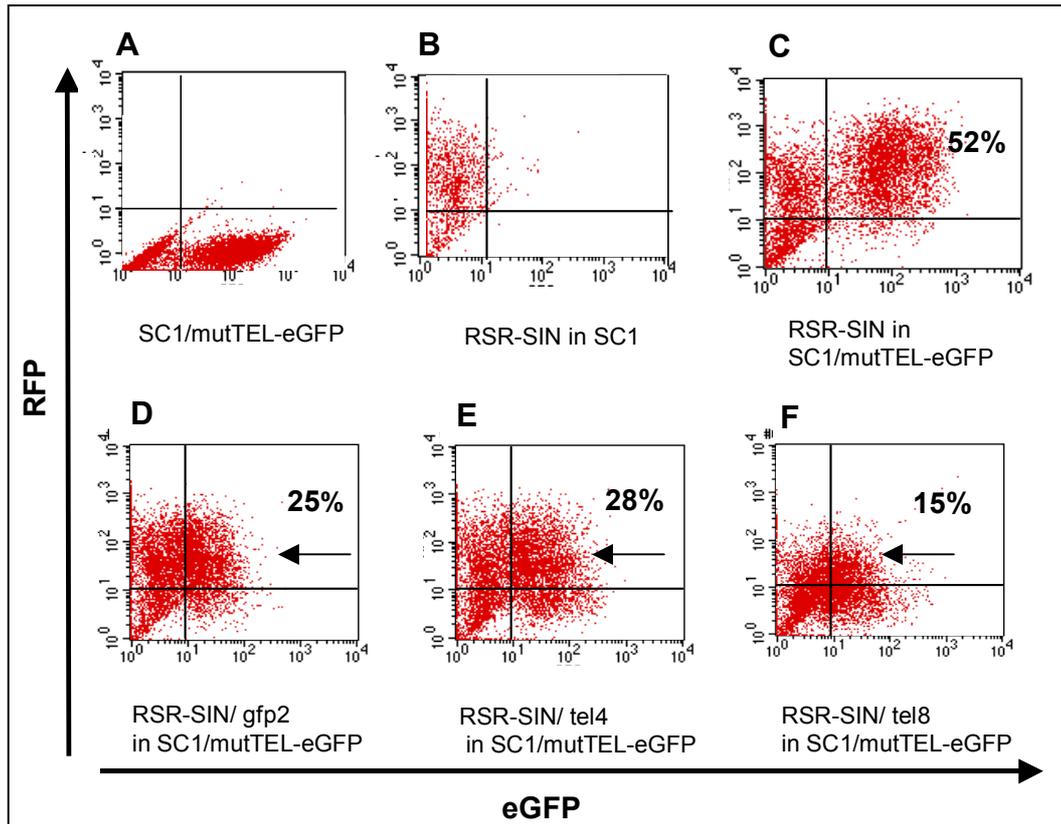


Abb.15: Vergleich von retroviral-exprimierten siRNAs gegen TEL mit Hilfe der FACS-Analyse

SC1-Zellen bzw. SC1/mutTEL-eGFP Zellen wurden mit den angegebenen retroviralen Vektoren infiziert und nach 10 Tagen mit Hilfe des FACS analysiert. (A) SC1/mutTEL-eGFP-Zellen, uninfiziert; (B) SC1-Zellen infiziert mit RSR-SIN; (C) SC1/mutTEL-eGFP infiziert mit RSR-SIN; (D) SC1/mutTEL-eGFP infiziert mit RSR-SIN/gfp2; (E) SC1/mutTEL-eGFP infiziert mit RSR-SIN/tel4; (F) SC1/mutTEL-eGFP infiziert mit RSR-SIN/tel8. Die Pfeile geben die Richtung der Verschiebungen an. Weitere Erläuterungen im Text

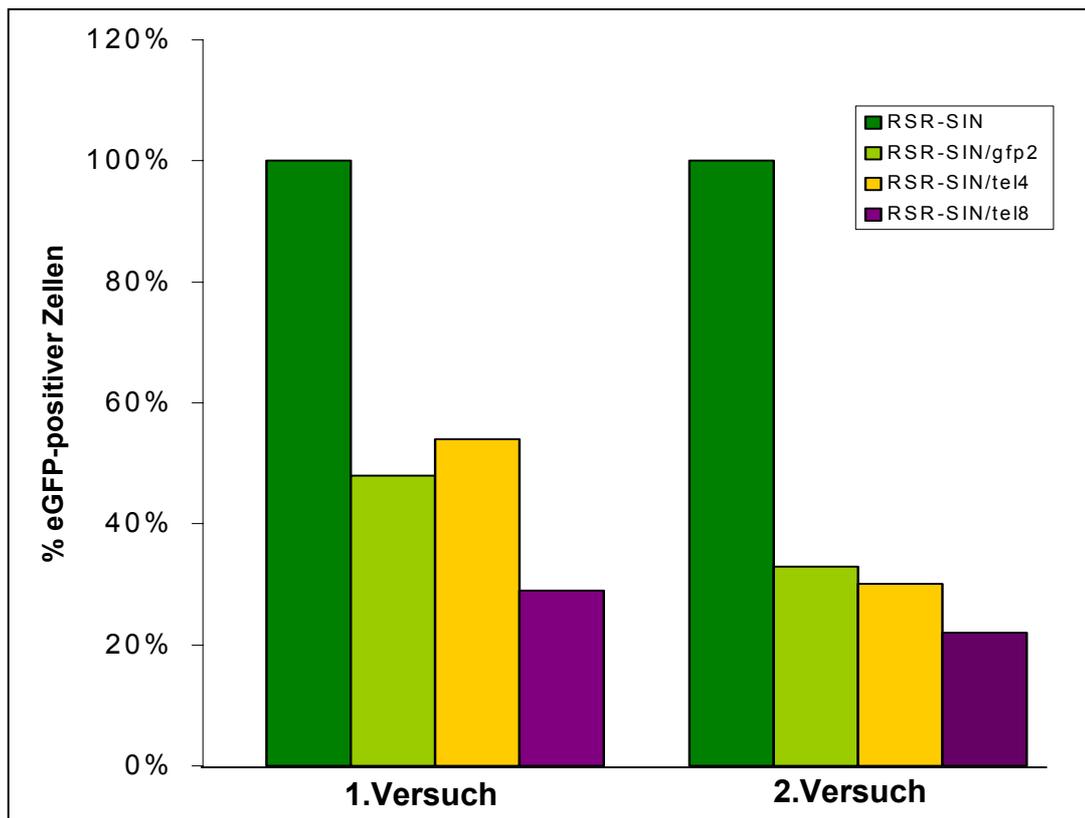


Abb.16: Darstellung der Fluoreszenz nach Infektion von SC1/mutTEL-eGFP Zellen mit retroviralen Vektoren, die verschiedene siRNAs exprimieren

Es sind zwei unabhängige Versuche gezeigt. SC1/mutTEL-eGFP Zellen wurden mit RSR-SIN (Negativkontrolle), RSR-SIN/gfp2 (Positivkontrolle) sowie RSR-SIN/tel4 und RSR-SIN/tel8 infiziert. Die Fluoreszenz der Negativkontrolle wurde gleich 100% gesetzt. Alle weiteren Messwerte sind relativ hierzu angegeben.

In den zuvor gezeigten Ergebnissen wurden verschiedene siRNAs zur Reduktion der Expression von *CEBPA* und *TEL* im Rahmen der RNA-Interferenz getestet. Die folgenden Abschnitte der Arbeit befassen sich ausschließlich mit den Untersuchungen zur Rolle des Transkriptionsfaktors C/EBP α .

3.1.5 siRNA-vermittelte Reduktion von endogenem C/EBP α

In allen bisher beschriebenen Versuchen zur Wirkung von siRNA wurde das Zielgen (*CEBPA* bzw. *TEL*) durch Transfektion oder Infektion von außen in die Zellen eingebracht. Für die geplanten Versuche war es jedoch erforderlich zu zeigen, dass auch die Expression des endogenen Gens reduziert wird. Um Zellen zu finden, die

endogenes *CEBPA* in nachweisbaren Mengen exprimieren, wurden zunächst Proteinextrakte von verschiedenen Zelllinien untersucht, die aufgrund von veröffentlichten Daten *CEBPA* exprimieren sollten (siehe Abb.17). Es zeigte sich, dass die humane Hepatomazelllinie HepG2 von den hier getesteten Zelllinien die stärkste Expression aufweist (Abb.17, Bahn 2). Daher wurde sie für die weiteren Experimente benutzt.

Um zu zeigen, dass auch die Expression des endogenen *CEBPA* durch RNA-Interferenz reduziert werden kann, wurden HepG2-Zellen mit Retrovirusvektoren infiziert, die die shRNAs *cebp2* bzw. *cebp3* exprimieren. Allerdings wurde für diese – und alle weiter unten beschriebenen Versuche mit CD34⁺-Zellen – der Vektor RSG-SIN (RetroSUPER-eGFP) benutzt, der die gleiche Struktur hat wie der bisher benutzte Vektor RSR-SIN, bei dem allerdings das RFP-Gen gegen das eGFP-Gen ausgetauscht worden war. Die für die Infektion der HepG2-Zellen benutzten retroviralen Vektoren werden im Folgenden als RSG-SIN/*cebp2* und RSG-SIN/*cebp3* bezeichnet. Die Transduktionseffizienz der HepG2-Zellen mit den oben genannten Vektoren lag zwischen 40 und 60%. Nach der Infektion wurden die eGFP-positiven Zellen sortiert und Proteinextrakte hergestellt. In Abb. 18 ist die Western Blotanalyse dieser Proteinextrakte gezeigt. Es wird ersichtlich, dass im Vergleich zur Negativkontrolle (RSG-SIN allein) die Expression des endogenen *CEBPA*-Gens nach Infektion mit RSG-SIN/*cebp3* um etwa 40-50% reduziert ist. RSG-SIN/*cebp2* zeigt unter diesen Bedingungen keine oder nur eine sehr geringe Reduktion der Expression. Daher wurde RSG-SIN/*cebp3* für die im Folgenden beschriebenen Versuche zur Reduktion der *CEBPA*-Expression in hämatopoetischen Stammzellen benutzt.

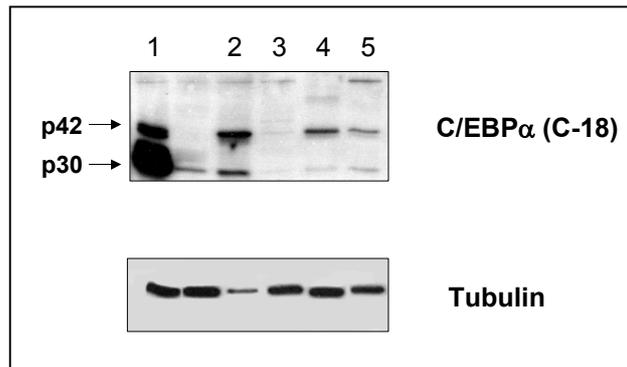


Abb.17: Endogenes C/EBP α in verschiedenen Zelllinien

Obere Abbildung: Western Blotanalyse von Proteinextrakten aus verschiedenen Zelllinien. Die Filter wurden mit dem Antikörper C-18 gegen C/EBP α hybridisiert. Bahn 1: CD34⁺-Zellen, die C/EBP α -Mut10 exprimieren; Bahn 2: humane Hepatomazelllinie HepG2; Bahn 3: humane Brustkrebszelllinie MDA-MB-231; Bahn 4: murine hämatopoetische Zelllinie FDCP1; Bahn 5: humane AML-Zelllinie TF-1.

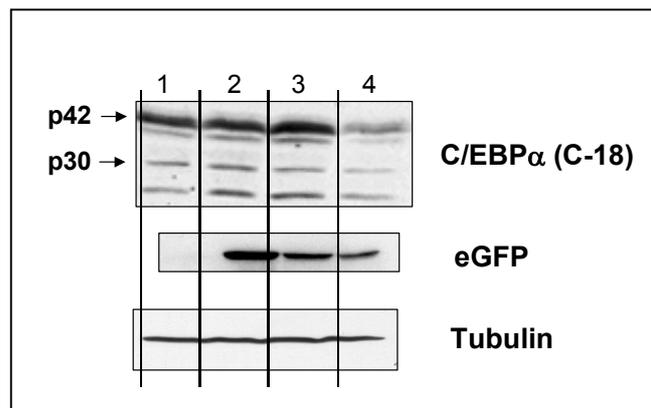


Abb.18: Endogenes C/EBP α in HepG2-Zellen nach Infektion mit retroviralen Vektoren, die siRNAs gegen CEBPA exprimieren.

Western Blotanalyse von Proteinextrakten aus HepG2-Zellen (Bahn 1), HepG2-Zellen infiziert mit RSG-SIN (Bahn 2), HepG2-Zellen infiziert mit RSG-SIN/ceb2 (Bahn3) und HepG2-Zellen infiziert mit RSG-SIN/ceb3 (Bahn 4). Zur Kontrolle wurde das Filter mit Antikörpern gegen eGFP bzw. Tubulin hybridisiert.

3.2 RNAi-vermittelte Reduktion der Expression von CEBPA in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen des Menschen

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des humanen Transkriptionsfaktors C/EBP α bezüglich seiner Rolle in der hämatopoetischen Entwicklung und der Entwicklung einer leukämischen Transformation. Zu diesem Zweck wurden CD34⁺-Zellen mit retroviralen Überständen infiziert, die RSG-SIN/ceb3 bzw. RSG-SIN (Negativkontrolle) enthielten, um auf diese Weise eine Reduktion der Expression dieses Transkriptionsfaktors zu erzielen. Die infizierten hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen wurden anschließend in verschiedenen Differenzierungsmedien zur Ausreifung gebracht. Die humanen CD34⁺-Zellen entstammen dem Nabelschnurblut und wurden durch immunmagnetische Selektion gewonnen (siehe Kap.2.2.3). CD34 ist ein Oberflächenmarker, der vornehmlich auf hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert wird (Krause et al., 1996) und sich deshalb sehr gut für die Gewinnung dieser Zellen eignet. Der Versuchsablauf ist schematisch in Abb.19 gezeigt.

3.2.1 Infektion und Sortierung der CD34⁺-Zellen

In der Durchflusszytometrie am FACSCalibur ist aufgefallen, dass RFP 24-48 Stunden länger akkumulieren muss als das eGFP, um eine deutliche Fluoreszenzkraft zu entwickeln (hier nicht gezeigt). Deshalb wurde für die Infektion der CD34⁺-Zellen die RFP-Sequenz im RSR-SIN-Vektor gegen die eGFP-Sequenz ausgetauscht, so dass die Vektoren als „RSG-SIN/ceb3“ bzw. „RSG-SIN“ bezeichnet wurden. Diese Vektoren wurden unter Benutzung des Hüllproteins RD114 in Viruspartikel verpackt. Das Hüllprotein RD114 eignet sich sehr gut für die Infektion humaner Stammzellen (Zhang et al., 2004; Sandrin et al., 2002; Logan et al., 2004b), da es nicht so zytotoxisch ist wie das für Infektionen oft verwendete VSV-G (Burns et al. 1993). Der Virustiter lag zwischen 0,5 und 1,5 x10⁵ fluorescence transfer units/ml. Im FACSAria wurden die transduzierten CD34⁺-Zellen einen Tag nach der Infektion anhand der Expression des Selektionsmarkers eGFP vermessen und sortiert, so dass die Reinheit

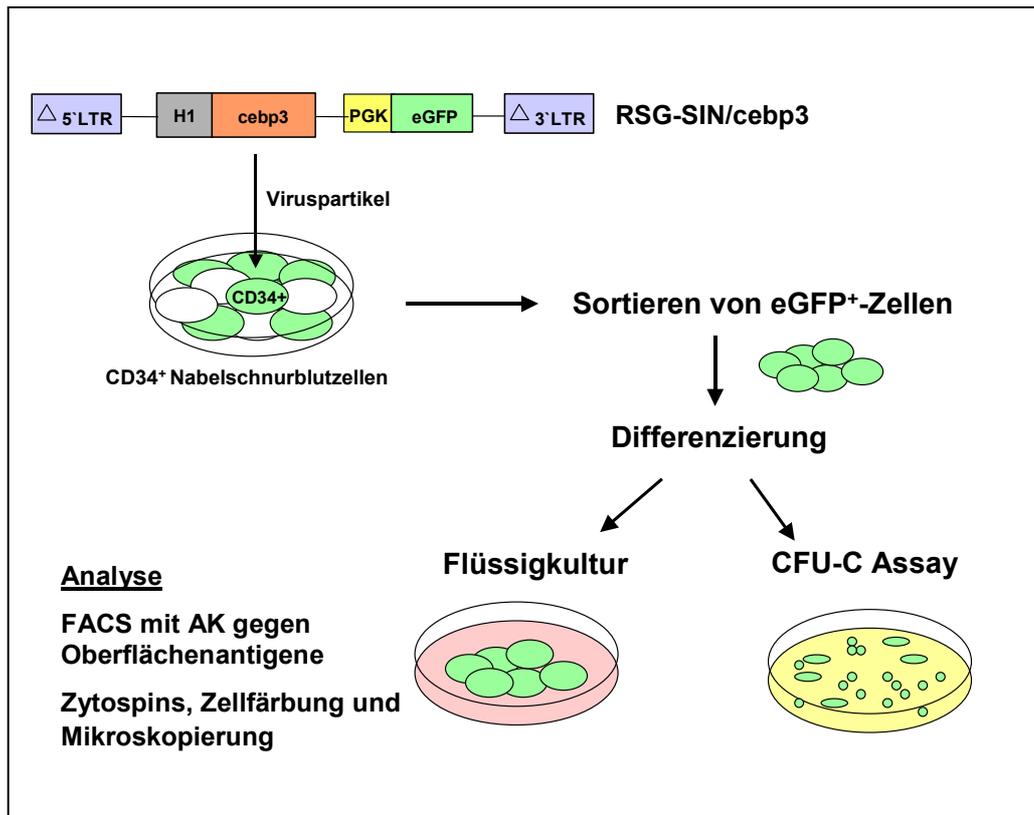


Abb.19. Schematischer Ablauf der Versuche mit CD34⁺-Stamm- und Vorläuferzellen

Die CD34⁺-Nabelschnurblutzellen wurden mit Virusüberständen infiziert, die entweder das in der Abbildung dargestellte Konstrukt RSG-SIN/ceb3 enthielten oder die Negativkontrolle RSG-SIN (hier nicht abgebildet). Die eGFP-positiven CD34⁺-Zellen wurden 2 Tage nach der Infektion sortiert und in der Flüssigkultur bzw. im CFU-C Assay zur Differenzierung gebracht.

der resultierenden Zellpopulation nahezu bei 100% lag. Die Transduktionseffizienz lag zwischen 10 und 30%.

Die eGFP-positiven CD34⁺-Zellen wurden nach dem Sortieren gezählt und in zwei Arten von Differenzierungsversuchen eingesetzt (siehe Abb.19). Zum einen erfolgte die Differenzierung in Flüssigkulturen und zum anderen in einem semisoliden Medium im CFU-C Assay. In beiden Fällen wurde durch Zugabe geeigneter Zytokine die jeweils gewünschte Differenzierung erreicht.

3.2.2 siRNA-vermittelte Reduktion des *CEBPA*-Transkriptionslevels in $CD34^+$ -Zellen

Die Wirksamkeit der siRNA auf die Expression von *CEBPA* in hämatopoetischen $CD34^+$ -Progenitorzellen wurde auf mRNA-Ebene mit Hilfe der Real time RT-PCR (RT²-PCR) analysiert. 24 bzw. 96 Stunden nach Infektion der $CD34^+$ -Zellen mit Virusüberständen, die RSG-SIN/cebp3 bzw. RSG-SIN enthielten, wurde die RNA dieser zuvor sortierten eGFP-positiven Zellen aufgereinigt und in der RT²-PCR eingesetzt. Wie in Abb.20 gezeigt, ist das *CEBPA*-Transkriptionslevel der mit RSG-SIN/cebp3 transduzierten $CD34^+$ -Zellen nach 24 Stunden im Vergleich zur Negativkontrolle (RSG-SIN) auf 0,5 und nach 96 Stunden sogar auf 0,3 verringert. Dieses Resultat beweist eine sehr gute Effektivität der cebp3-siRNA auf mRNA Ebene in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen.

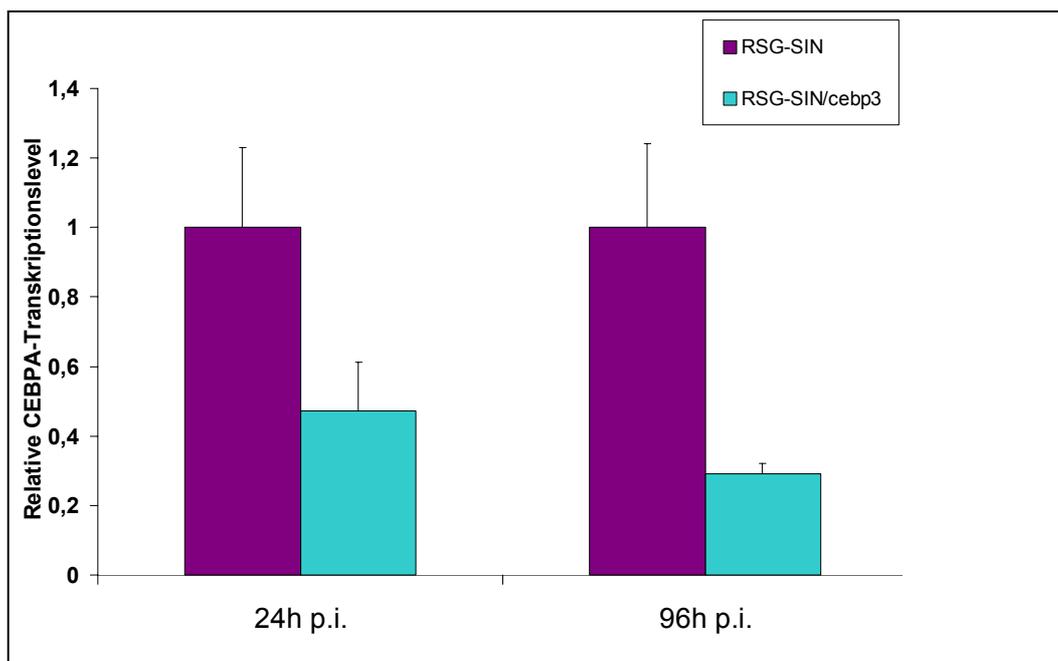


Abb.20. Darstellung der *CEBPA*-Transkriptionslevel in $CD34^+$ -Zellen nach Transduktion mit RSG-SIN/cebp3 bzw. RSG-SIN

Die relativen *CEBPA*-Transkriptionslevel der $CD34^+$ -Zellen wurden 24 bzw. 96 Stunden nach Infektion mit RSG-SIN/cebp3- bzw. RSG-SIN-haltigen Virusüberständen mit Hilfe der RT²-PCR ermittelt. Die Werte sind relativ zum GAPDH-Expressionslevel angegeben.

3.2.3 Differenzierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen in Flüssigkultur

Da $C/EBP\alpha$ einen wesentlichen Einfluss auf die terminale Differenzierung der neutrophilen Granulozyten hat (Nerlov, 2004; Cammenga et al.; 2003, Pabst et al.; 2001), wurde in dieser Arbeit ein Differenzierungsmedium verwendet, welches insbesondere die Reifung der myeloiden Abstammungsreihe in Flüssigkultur fördert. Es enthielt neben den Zytokinen hSCF und hIL-3 zusätzlich humanes GM-CSF (Einzelheiten siehe Kap.2.2.3).

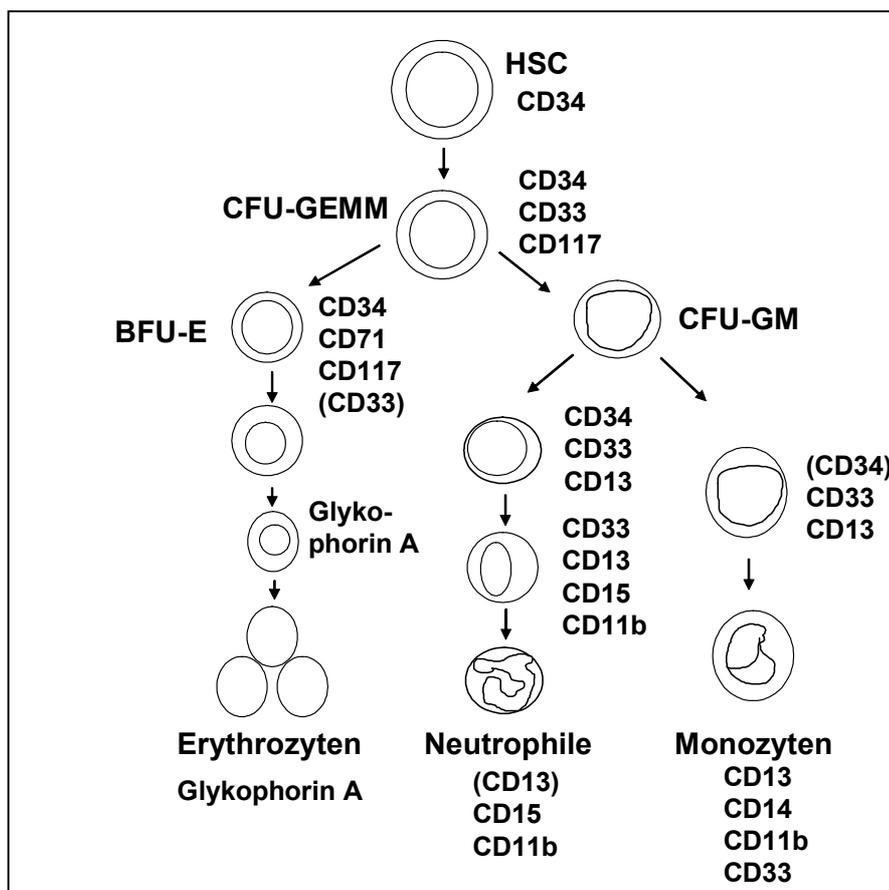


Abb.21. Oberflächenmarker von verschiedenen Zelltypen der Hämatopoese

Schematische Darstellung eines Ausschnitts aus der Hämatopoese mit den aus der hämatopoetischen Stammzelle ausgehenden myeloiden und erythroiden Abstammungsreihen und deren differenzierten Zellen mit zugehörigen Oberflächenmarkern.

Aus Platzgründen wurde die lymphatische Abstammungsreihe sowie die Differenzierung der Megakaryozyten/Makrophagen, der eosinophilen und basophilen Granulozyten weggelassen.

Das Kulturmedium enthielt kein Erythropoetin, um nicht die Differenzierung der erythroiden Abstammungsreihe zu unterstützen. Es wurden ca. 3×10^5 eGFP-positive CD34⁺-Zellen pro Konstrukt (RSG-SIN/cebp3 bzw. RSG-SIN) in Kultur gehalten. Die Differenzierung der Zellkulturen kann mit Hilfe der Expression myeloider Antigene, die bestimmte Expressionslevel während der verschiedenen Differenzierungsstufen aufweisen, überwacht werden (siehe Abb.21).

Nach 10 Tagen war die Mehrheit der Zellen beider Kulturen CD34-negativ sowie CD33-positiv, was mit dem Vorhandensein früher Vorstufen der myeloiden bzw. erythroiden Differenzierung übereinstimmt (siehe Abb.22). Im Gegensatz zu den Kontrollkulturen (RSG-SIN), in denen 10 bis 20% der Kultur reifere Stadien der myeloiden Differenzierung zeigten, was anhand der monozytären und granulozytären Marker CD14 und CD15 deutlich wird, enthielten die RSG-SIN/cebp3-exprimierenden Kulturen sehr wenige Zellen (<3%) mit diesen reiferen Phänotypen. Derselbe Unterschied wurde ebenfalls am 19.Tag der Differenzierung beobachtet (siehe Abb.22 u. 23). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die Signale, die die myeloide Differenzierung übermitteln, in Zellen mit niedrigem C/EBP α -Level geschwächt sind.

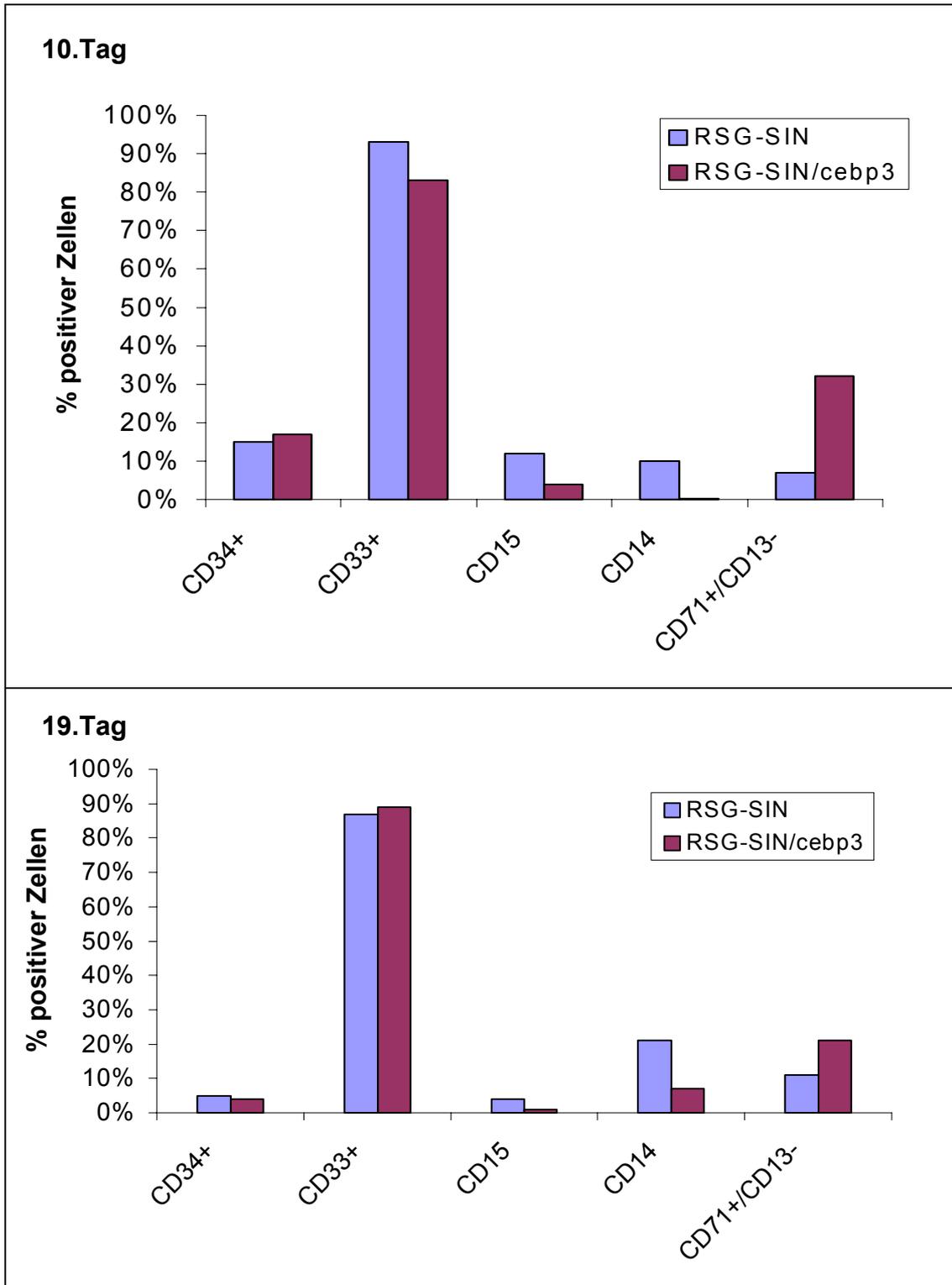


Abb.22: Reduktion von C/EBP α vermindert die Bindung myeloider Marker an hämatopoetischen Vorläuferzellen und erhöht den Anteil erythroider Progenitoren

Das Säulendiagramm zeigt die deutlich unterschiedlichen Antikörper-Bindungen an die Antigene CD34, CD33, CD15, CD14, CD71 und CD13 der hämatopoetischen Vorläuferzellen, die mit RSG-SIN/ceb3 transduziert worden sind, im Vergleich zu den Kontrollzellen, die RSG-SIN exprimieren, am 10. und 19.Tag nach Infektion.

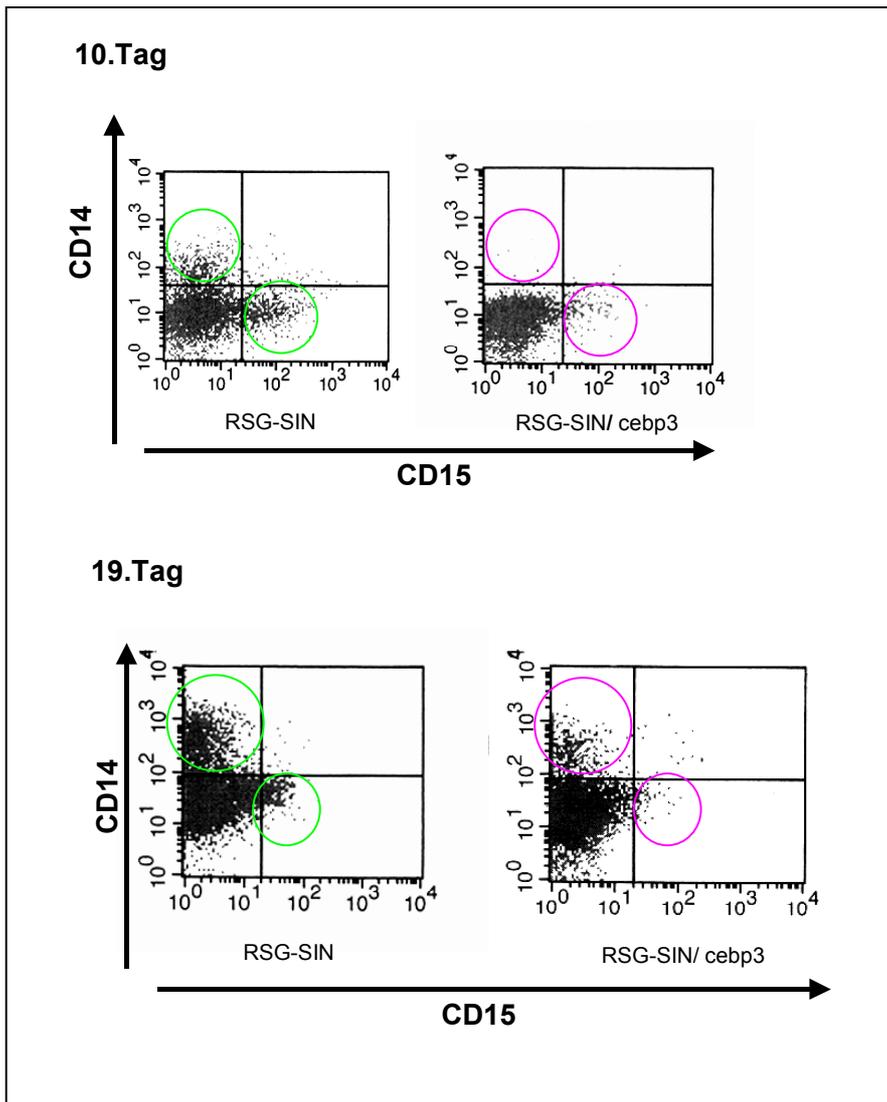


Abb.23: Reduktion der C/EBP α -Expression vermindert die Bindung myeloider Marker an hämatopoetischen Vorläuferzellen am 10. und 19.Tag nach Infektion

Im Unterschied zu den links oben und unten dargestellten FACS-Analysen der Negativkontrolle (RSG-SIN- grün eingekreist) vom 10. und 19.Tag, zeigen die mit RSG-SIN/ceb3 infizierten Zellen eine deutlich reduzierte Bindung der Antikörper CD14 und CD15 rechts oben und unten (pink eingekreist).

Es wurden ebenfalls die relativen Anteile der Zellen untersucht, die sich in Richtung der erythroiden Abstammungsreihe entwickelten. Diese Zellen sind charakterisiert durch die Abwesenheit des Antigens CD13 sowie durch eine starke Expression des Transferrinrezeptors (CD71) (siehe Abb.21). Auffälligerweise waren ca. 30% der RSG-SIN/ceb3-exprimierenden Zellen in der FACS-Analyse am 10.Tag erythroide Vorläuferzellen verglichen mit lediglich ca. 7% der Kontrollzellen (RSG-SIN) (siehe Abb.22 u. 24). Diese Anteile nahmen am 19. Tag nach Infektion ab, da die Bedingungen der Flüssigkultur nicht optimal für die Proliferation und Differenzierung

der erythroiden Zellen gewesen sind - beispielsweise aufgrund des Fehlens von Erythropoietin (siehe Abb.22 und 24).

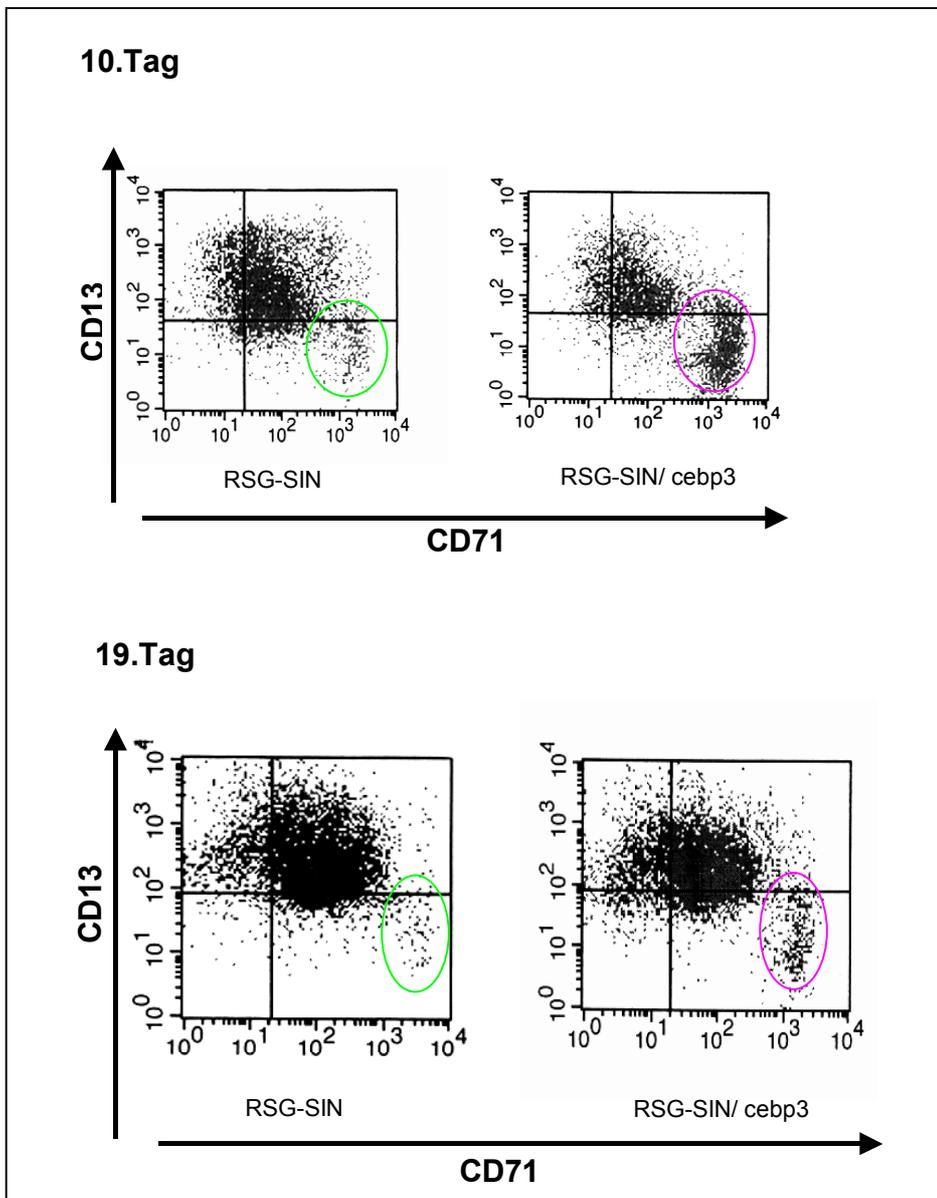


Abb.24: Reduktion der C/EBP α -Expression führt am 10. und 19.Tag nach Infektion zu einem erhöhten Anteil von Zellen, die erythroide Marker auf hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimieren

Die Fluoreszenz-markierten Antikörper gegen CD71 und CD13 zeigen im FACS eine stark verdichtete CD71⁺/CD13⁻-(Sub-)Population (pink eingekreist), die aus RSG-SIN/ceb3-exprimierenden erythropoetischen Zellen besteht, im Vergleich mit der Negativkontrolle (RSG-SIN-exprimierende Zellen – grün eingekreist).

Die Ergebnisse der FACS-Analysen der Flüssigkulturen deuten auf eine verschlechterte myeloide Differenzierung der Zellen mit niedrigem C/EBP α -Anteil auf zwei Ebenen hin: 1) Ein verringerter Anteil reifer myeloider Formen und 2) Ein relativ erhöhter Anteil an erythroiden Progenitoren. Diese Ergebnisse wurden durch mikroskopische Analysen der Zytospins der Flüssigkulturen mit den oben genannten Zytokinen bestätigt. Die Analyse der Kulturen vom 28./29.Tag zeigt die eindeutigsten Ergebnisse. Die Zytospins sind in Abb.25 dargestellt. In den Kontrollkulturen (RSG-SIN) kann eine Reifung der myeloiden Reihe bis hin zu den neutrophilen Granulozyten beobachtet werden, die in den Kulturen, die RSG-SIN/cebp3 exprimieren, fehlt (siehe Abb.25 oben).

In dem Zytospin der Negativkontrolle sind außerdem Schaumzellen, die überreife Makrophagen mit Vakuolen darstellen (in Abb.25 unten mit Sternen markiert), sowie myeloide Vorläuferzellen mit hellblauem Zytoplasma und einem in Relation zu diesem großen violetten Zellkern (mit einem Plus in Abb.25 gekennzeichnet) zu finden. Die mit RSG-SIN/cebp3 transduzierten hämatopoetischen Progenitoren weisen dagegen außer dem Fehlen der neutrophilen Granulozyten eine Zunahme erythroider Vorläuferzellen im Vergleich zur Negativkontrolle auf (dicke Pfeile in Abb.25 oben). Diese lassen sich als kleine Zellen mit blauem Zytoplasma und einem dunkelblauen, verdichteten Zellkern darstellen. Schaumzellen sind in dieser Zellpopulation ebenso vorhanden wie in der Negativkontrolle (symbolisiert mit Sternen in Abb.25).

Die morphologische Analyse der Zytospins aus den Flüssigkulturen ergänzt die durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenantigene der RSG-SIN/cebp3-exprimierenden hämatopoetischen Vorläuferzellen und bestätigt die reduzierte myeloische Differenzierung dieser Zellen mit einer relativen Zunahme unreifer erythroider Vorstufen im Vergleich zur Negativkontrolle.

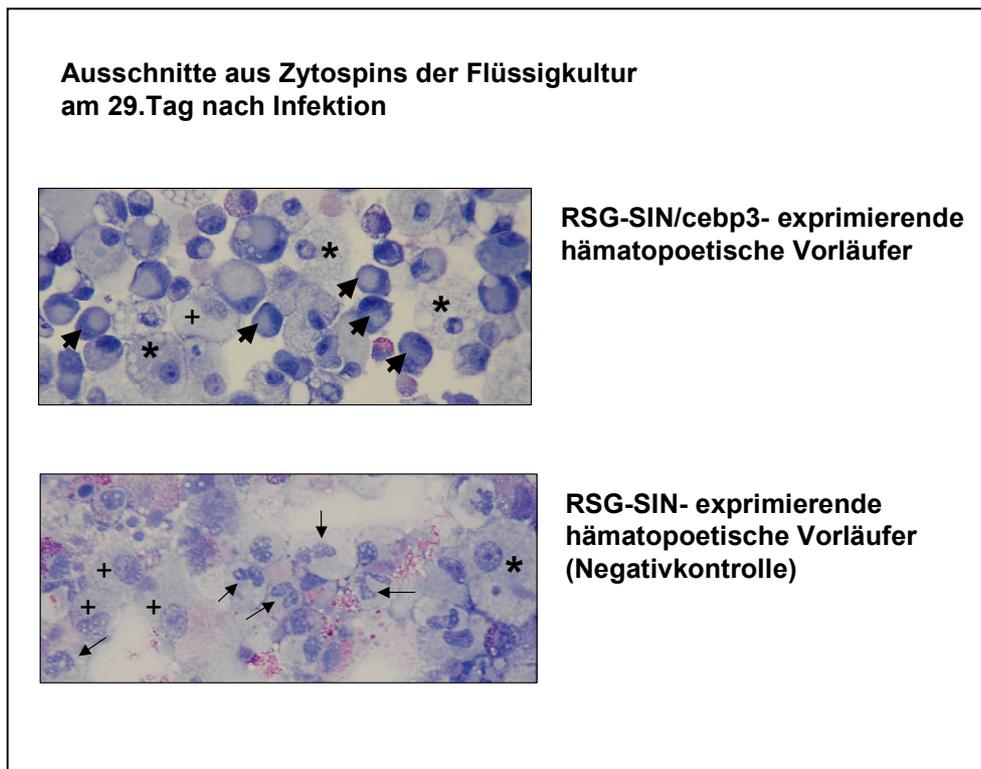


Abb.25: Ausschnitte aus Zytospins der Flüssigkultur von hämatopoetischen Vorläuferzellen 29 Tage nach Infektion

CD34⁺-Zellen wurden mit RSG-SIN/ceb3 bzw. RSG-SIN (Negativkontrolle) transduziert und 29 Tage lang in Flüssigkultur mit Zytokinen kultiviert. Anschließend wurden Zytospins gemacht. Mit Sternen sind Makrophagen und Schaumzellen markiert; die dünnen Pfeile zeigen auf neutrophile Granulozyten, mit einem Plus sind Vorläufer der myeloiden Abstammungsreihe gekennzeichnet; die dicken Pfeile zeigen auf erythroide Vorläuferzellen. 40-fache Vergrößerung.

3.2.4 Differenzierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen im CFU-C Assay

Zwei voneinander unabhängige, aber nicht alleinige Mechanismen können für den reduzierten Anteil der myeloiden Differenzierung, der in den Flüssigkulturen beobachtet wurde, verantwortlich sein. Die reduzierte C/EBP α -Expression kann entweder die Festlegung in Richtung der myeloischen Abstammungsreihe (*Lineage Commitment*) vermindern, woraufhin verhältnismäßig weniger myeloide als erythroide Vorläufer nachweisbar sind, oder aber die Proliferation und Ausreifung bereits festgelegter myeloider Zellen schwächen.

Im Gegensatz zum Flüssigkultur-Assay, der den Differenzierungsstatus aller Kulturzellen mit einbezieht, ist der CFU-C Assay ein sehr effektiver Ansatz, um selektiv multipotente und festgelegte (*committed*) Vorläuferzellen zu identifizieren und zu zählen. Der Assay basiert auf der Tatsache, dass diese Zellen eine hohe Proliferationskapazität besitzen und deshalb die Fähigkeit haben, Kolonien zu bilden, wenn sie in einem semisoliden Medium (z. B. Methylzellulose) in Anwesenheit von Zytokinen kultiviert werden. Multipotente Vorläufer können aufgrund ihrer Fähigkeit, sowohl Zellen der erythroiden als auch der myeloiden Abstammungslinie hervorzubringen, identifiziert werden. Sie bilden die sog. CFU-GEMM (*Colony-forming unit-granulocyte, -erythroid, -macrophage, megakaryocyte*). Auf die jeweilige myeloide bzw. erythroide Abstammungsreihe bereits festgelegte Vorläuferzellen können dagegen nur die Zellen ihrer jeweiligen Linie ausbilden. Diese festgelegten Progenitorzellen können weiterhin in verschiedene Untergruppen eingeteilt werden. Im Falle der erythroiden Progenitoren können im CFU-C Assay zwei Kolonietypen unterschieden werden: 1) Frühe Vorläufer, genannt BFU-E (Burst-forming unit-erythroid), die am 14.Tag große Kolonien mit mehr als 200 Erythroblasten enthalten und die oft Haufen (*bursts*) bzw. *cluster* bilden, und 2) Späte Vorläuferzellen, die sog. CFU-E (*Colony-forming unit-erythroid*), die nach 14 Tagen kleine Kolonien mit 8-200 Erythroblasten bilden. Die myeloiden Vorläufer können als bipotente, sog. CFU-GM (*Colony-forming unit-granulocyte/macrophage*) klassifiziert werden, da sich aus ihnen sowohl Granulozyten als auch Monozyten/Makrophagen entwickeln können, sowie in monopotenten CFU-G bzw. CFU-M.

Die unterschiedliche Morphologie der Kolonien erlaubt eine einfache Zuordnung zu der erythroiden bzw. der myeloiden Abstammungsreihe, wobei im menschlichen System die Unterscheidung zwischen den einzelnen myeloiden Untergruppen schwierig ist. Deshalb werden diese Kolonien vereinfachend den CFU-GM zugeordnet.

Es wurden zwei voneinander unabhängige CFU-C Assays mit CD34⁺ RSG-SIN/cebp3- und CD34⁺ Kontrollzellen (RSG-SIN) in einem Zytokin-Cocktail durchgeführt, welcher die myeloide und die erythroide Differenzierung fördert (H4434; Einzelheiten siehe Kap.2.2.3). Am 15.Tag wurden die Kolonien je nach Morphologie den erythroiden BFU-E/CFU-E oder den myeloiden CFU-GM zugeordnet. Wie erwartet gehörte die Mehrheit der aus dem Nabelschnurblut gewonnenen CD34⁺-Zellen der Negativkontrolle der Gruppe der erythroiden Vorläufer an (siehe Tab.6). Interessanterweise wurde in beiden Versuchen kein signifikanter Unterschied in der absoluten Kolonienzahl der CFU-GM zwischen den beiden Kulturen beobachtet, so dass man davon ausgehen

kann, dass ein in seiner Expression reduziertes C/EBP α die Festlegung auf die myeloide Zelllinie nicht beeinflusst.

	eGFP	BFU-E+/- CFU-E	CFU-GM	Ratio (BFU-E/ CFU-E : CFU-GM)
Versuch 1				
RSG-SIN/cebp3	15%	18+/- 2	7+/- 2	2,6
RSG-SIN	23%	18+/- 6	9+/- 4	2,0
Versuch 2				
RSG-SIN/cebp3	25%	94+/- 29	31+/- 10	3,0
RSG-SIN	33%	65+/- 10	31+/- 1	2,1

Tab.6: Auszählung der CFU-C Assay H4434 am 15.Tag nach Infektion

Angegeben sind die Kolonienzahlen pro 1×10^3 Zellen aus zwei durchgeführten Versuchen mit der jeweiligen Standardabweichung und dem Verhältnis der erythroiden zu den myeloiden Kolonien. In Prozent ist die eGFP-Fluoreszenzrate der Zellen vor dem Sortieren angegeben.

Die zwischen den beiden Versuchen relativ unterschiedliche Kolonienzahl pro 1×10^3 Zellen lässt sich u. a. mit der Infektionsfrequenz der Zellen erklären, die beim zweiten Versuch um durchschnittlich 10% besser gewesen ist (siehe Tab.6). Dieser Unterschied könnte den relativen Prozentanteil der Progenitorzellen in der Population beeinflusst haben, da auch nachgewiesen worden ist, dass weiter differenzierte Zellen für eine retrovirale Infektion empfänglicher sind. Eine andere Erklärung können subtile Unterschiede in den Kulturbedingungen vor dem Ausplattieren in Methylzellulose sein. Betrachtet man aber das Verhältnis der erythroiden zu der myeloiden Kolonienzahl innerhalb einer Kultur, so zeigt sich, dass innerhalb der RSG-SIN/cebp3-exprimierenden Kulturen in beiden Versuchen der Anteil der BFU-E/ CFU-E größer ist als der Anteil der CFU-GM verglichen mit den Verhältnissen in den Negativkontrollen (siehe Ratio in Tab.6). Mit anderen Worten ist die myeloide Differenzierung im Verhältnis zur erythroiden in den hämatopoetischen Vorläuferzellen mit niedrigem C/EBP α -Level beeinträchtigt.

Ähnlicherweise war die erythroide Kolonienzahl in den RSG-SIN/cebp3-exprimierenden Kulturen vergleichbar mit der Kolonienzahl der Kontrollkulturen des ersten Versuchs, wobei ein Zuwachs von 50% in der absoluten Zahl der BFU-E/ CFU-E im zweiten Versuch in den RSG-SIN/cebp3-exprimierenden Zellen nachgewiesen worden ist (siehe Tab.6). Es ist nicht eindeutig, ob es sich hierbei um einen signifikanten

Unterschied handelt oder um eine technische Schwierigkeit in der Zählung der BFU-E Kolonien. Eine gestreute Kolonie (burst) kann dabei irrtümlich als eine Ansammlung von mehreren Kolonien gezählt werden. Dies ist insbesondere in Kulturen mit einer hohen Koloniendichte schwierig, wie es beim zweiten Versuch der Fall war.

Um zu überprüfen, ob die Differenzierung der mit RSG-SIN/cebp3 transduzierten CD34⁺-Zellen im semisoliden Medium ebenfalls zu einer verminderten myeloiden Ausreifung führt, wurde die Morphologie der Zellen aus den verschiedenen Kolonien analysiert. Es wurden Zytospins hergestellt, die auf Objektträgern fixiert wurden. Anschließend erfolgte die Färbung der Zellen nach Pappenheim (siehe Kap.2.2.3.).

Im Zytospin-Ausschnitt der Zellen, die mit RSG-SIN/cebp3 transduziert worden sind, fallen neben den typischen Progenitorzellen atypische, noch größere Zellen mit inhomogenem, hellem Zytoplasma und einem großen, inhomogenen, gelappten Kern auf (gekennzeichnet mit dicken Pfeilen in Abb.26 oben), die in der Größe und Form in der Negativkontrolle fehlen. Außerdem ist in dieser Zellpopulation der Anteil an Makrophagen und deren überreifer Form, den Schaumzellen, im Vergleich zur Negativkontrolle (Sterne in Abb.26 unten) deutlich vermindert (siehe Abb.26 oben und Abb.27).

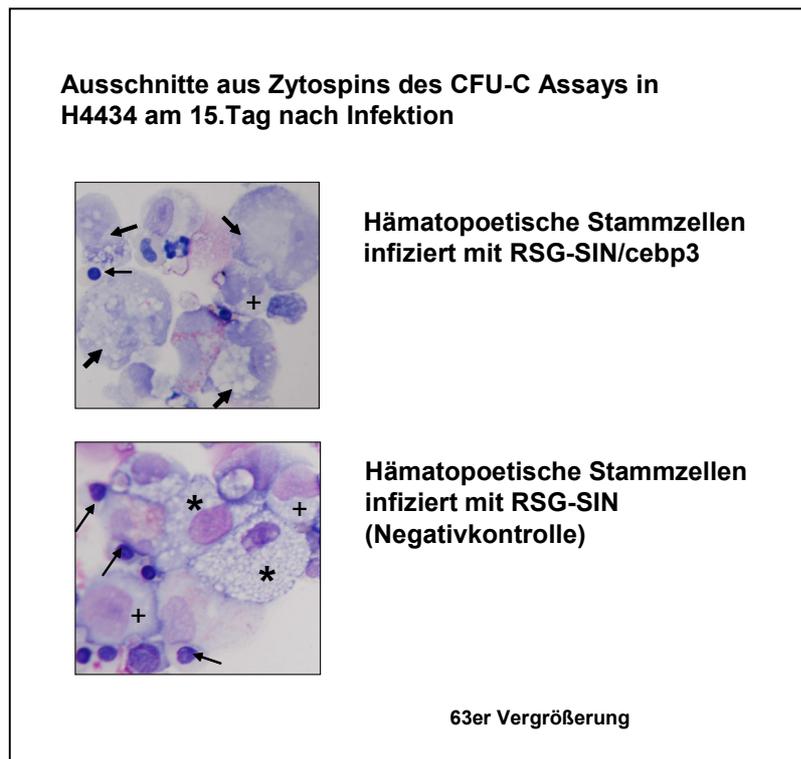


Abb.26: Ausschnitte aus Zytospins der CFU-C Assay am 15.Tag nach Infektion

Hämatopoetische Vorläufer wurden mit RSG-SIN/ceb3 bzw. RSG-SIN (Negativkontrolle) transduziert und 15 Tage lang in der Methylzellulose H4434 kultiviert. Anschließend wurden aus den Zellen Zytospins hergestellt. Mit Sternen sind Makrophagen und Schaumzellen versehen; die dünnen Pfeile zeigen auf Zellen der erythroiden Abstammungsreihe, mit einem Plus sind Vorläufer der myeloiden Abstammungsreihe gekennzeichnet; die dicken Pfeile zeigen auf besonders atypische Zellen der CD34⁺-Population, die mit RSG-SIN/ceb3 transduziert worden ist. 63er Vergrößerung.

Die morphologische Analyse sowie die Auszählung der Zytospins der insgesamt dreimal durchgeführten Differenzierung in Methylzellulose samt Zytokin-Kocktail führt zu der Annahme, dass die Transduktion von CD34⁺-Zellen mit RSG-SIN/ceb3 im Gegensatz zur Negativkontrolle (RSG-SIN-exprimierende CD34⁺-Zellen) zu einer verzögerten Ausreifung der myeloiden Abstammungsreihe (siehe Abb.26) und diese Zellen eine relative Zunahme von Vorläuferzellen um nahezu das Doppelte aufweisen (siehe Diagramm in Abb.27). Es lässt sich in diesem Rahmen nicht feststellen, ob die in Abb.26 oben mit dicken Pfeilen gekennzeichneten atypischen Zellen (transduziert mit RSG-SIN/ceb3) maligne sind oder noch frühere myeloide Vorstufen darstellen verglichen mit den in Abb.26 mit einem Plus versehenen myeloiden Vorläufern.

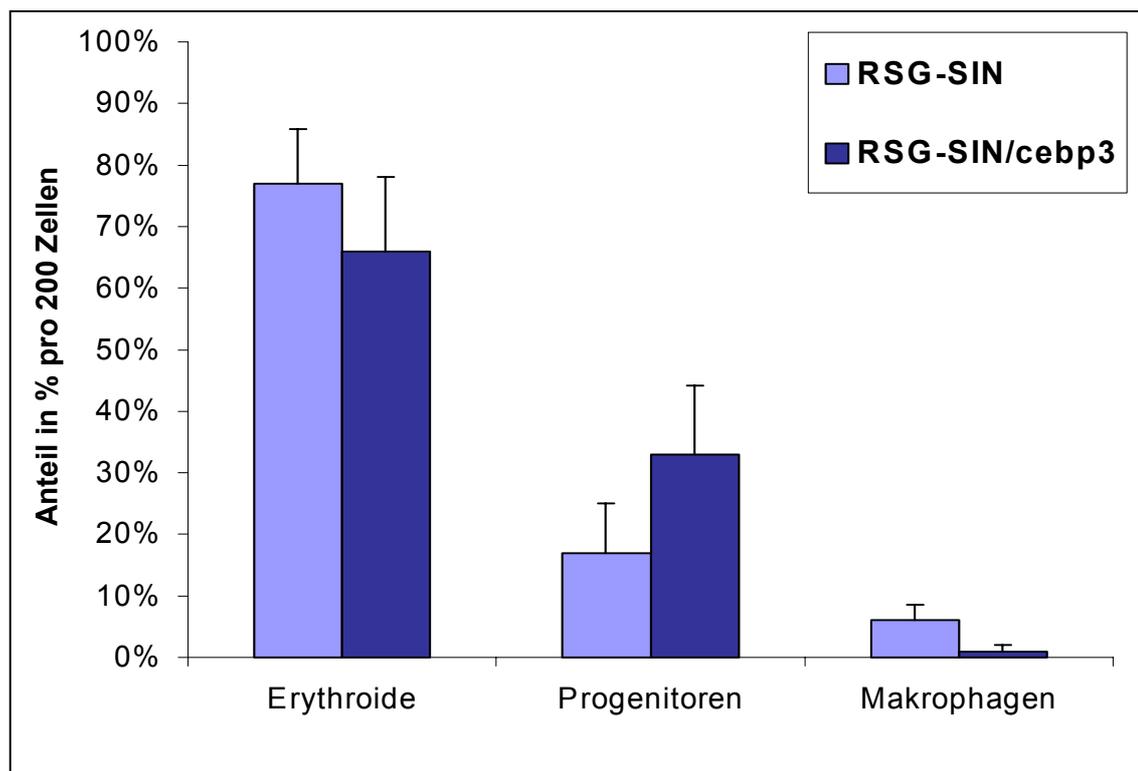


Abb.27: Auszählung der CFU-C Assay von Zytospins: Relative Anteile von Differenzierungsstufen der hämatopoetischen Vorläuferzellen

CD34⁺-Zellen wurden mit RSG-SIN/ceb3 bzw. RSG-SIN (Negativkontrolle) transduziert, 15 Tage lang in der Methylzellulose H4434 kultiviert und in Form von Zytospins fixiert. Anschließend wurden jeweils 200 Zellen ausgezählt, anhand ihrer Morphologie Gruppen: den Erythroiden, Progenitoren und Makrophagen zugeordnet. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte aus drei Versuchen mit Standardabweichung.

Im CFU-C Assay mit dem oben genannten Zytokin-Cocktail in Methylzellulose ließ sich weder in der Negativkontrolle noch in den mit RSG-SIN/ceb3 transduzierten hämatopoetischen Zellen eine Reifung der neutrophilen Granulozyten beobachten (siehe Abb.26). Um daher die Differenzierung der neutrophilen Granulozyten hinsichtlich des Einflusses eines reduzierten C/EBP α -Levels zu studieren, wurde einerseits G-CSF und andererseits GM-CSF in eine ansonsten Zytokin-freie Methylzellulose (H4230; siehe Kap.2.2.3) pipettiert, in der anschließend die mit RSG-SIN/ceb3 bzw. RSG-SIN transduzierten Stammzellen 15 Tage lang kultiviert wurden. In der Auszählung der Kolonien, die ausschließlich der Gruppe der CFU-GM zugeordnet worden sind, ist zu erkennen, dass die Zahl der CFU-GM in den mit RSG-SIN/ceb3 transduzierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (RSG-SIN) in der Kultur mit G-CSF um das Doppelte bzw. in der Kultur mit GM-CSF um nahezu das 4-fache abgenommen hat (siehe Tab.7). Da dieser Versuch nur einmal durchgeführt

worden ist, bleibt es unklar, ob die deutlich geringere Kolonienzahl der RSG-SIN/cebp3-exprimierenden Zellen eine Entwicklungshemmung aufgrund des verminderten C/EBP α -Levels darstellt im Vergleich zur Negativkontrolle, oder ob dieses Ergebnis aufgrund technischer Probleme (z. B. ineffiziente Infektion der Vorläuferzellen, unterschiedliche Kulturbedingungen) entstanden ist. Warum die CFU-GM Zahlen der RSG-SIN/cebp3-exprimierenden Zellen unterschiedlich ausgefallen sind bei relativ ähnlichen CFU-GM Kolonienzahlen in den Negativkontrollen zwischen den beiden Zytokin-Cocktails (G-CSF: 18 +/-4 Kolonien versus GM-CSF: 9+/-1 Kolonien), lässt sich aus denselben Gründen letztendlich nicht klären (siehe Tab.7).

H4230 + G-CSF	CFU-GM
RSG-SIN	38+/- 2
RSG-SIN/cebp3	18+/- 4
Ratio RSG-SIN : RSG-SIN/cebp3	2,1
H4230 + GM-CSF	
RSG-SIN	34+/- 7,5
RSG-SIN/cebp3	9+/- 1
Ratio RSG-SIN : RSG-SIN/cebp3	3,8

Tab.7. Auszählung der CFU-C Assay mit G-CSF bzw. GM-CSF

Dargestellt sind die Auszählungen der CFU-C Assay mit G-CSF bzw. GM-CSF nach 15 Tagen Kultur in der Methylzellulose H4230, in der sich ausschließlich CFU-GM (*colony-forming unit-granulocyte/macrophage*) bildeten. Die Kolonienzahlen beziehen sich auf 1×10^3 Zellen mit Standardabweichung.

Die Zytospin-Analyse dieser Versuchsreihe zeigt ein weiteres Ergebnis: Die in der Methylzellulose mit G-CSF bzw. GM-CSF inkubierten hämatopoetischen Vorläuferzellen differenzierten überraschenderweise sowohl in der RSG-SIN/cebp3-exprimierenden Kultur wie auch in der Negativkontrolle (RSG-SIN) zu neutrophilen Granulozyten, was beispielhaft in Abb.28 (gekennzeichnet mit dünnen Pfeilen) anhand der Differenzierung mit G-CSF gezeigt wird. Außerdem sind dort ebenfalls Makrophagen bzw. Schaumzellen sichtbar (mit Sternen markiert). Mit G-CSF bzw. GM-CSF in der Methylzellulose lässt sich jedoch in Form von Zytospins zeigen, dass der Anteil an unreifen Formen in den mit RSG-SIN/cebp3 transduzierten Vorläuferzellen größer ist als in der Negativkontrolle, was wiederum die Hypothese der verminderten Differenzierung bereits festgelegter myeloider Progenitoren unterstützt (siehe Abb.28

oben). Dieser Versuch deutet auf eine Differenzierungshemmung der myeloiden Abstammungsreihe hin bedingt durch die mittels siRNA reduzierte *C/EBPA*-Expression.

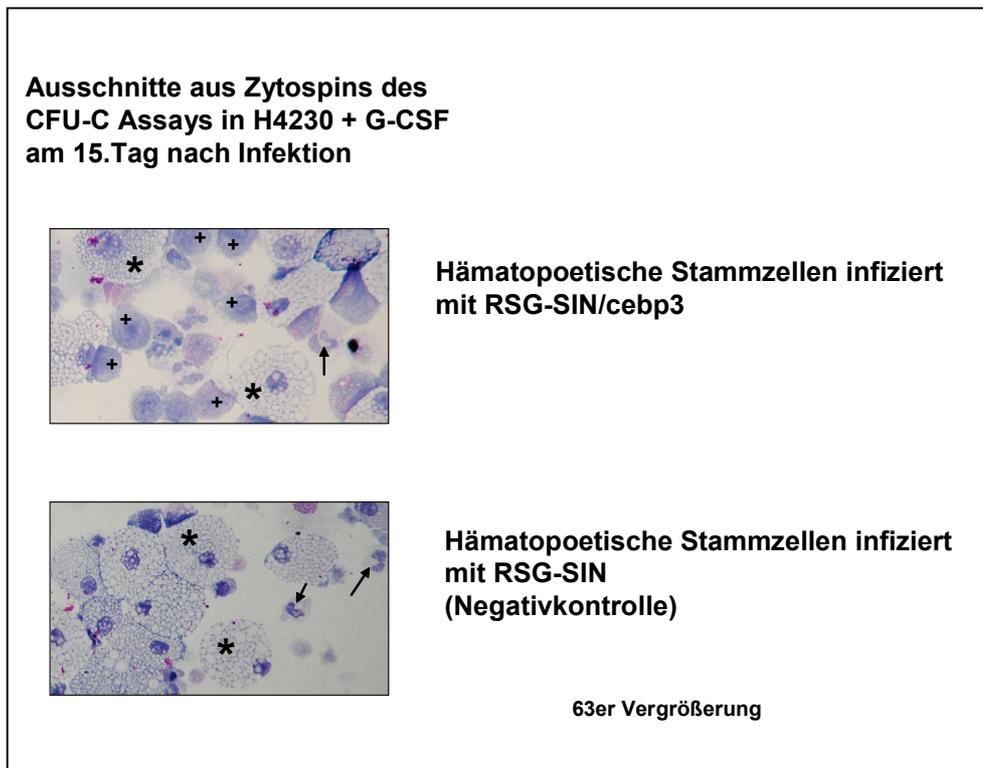


Abb.28. Ausschnitte aus Zytospins der CFU-C Assay mit G-CSF am 15.Tag nach Infektion

CD34⁺-Zellen wurden mit RSG-SIN/ceb3 bzw. RSG-SIN (Negativkontrolle) transduziert und 15 Tage lang in der Methylzellulose H4230 unter Zusatz von hG-CSF inkubiert. Anschließend wurden aus den Zellen Zytospins hergestellt. Mit Sternen sind Makrophagen und Schaumzellen versehen; die dünnen Pfeile zeigen auf neutrophile Granulozyten, mit einem Plus sind Vorläufer der myeloiden Abstammungsreihe gekennzeichnet. 63er Vergrößerung.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse der CFU-C Assay mit siRNA gegen *CEBPA* in hämatopoetischen Vorläuferzellen auf eine verzögerte Differenzierung der bereits festgelegten myeloischen Abstammungsreihe hin, wobei die Festlegung auf die myeloide Abstammungslinie davon weitgehend unbeeinflusst bleibt.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der RNAi-Methode die Expression des hämatopoetischen Transkriptionsfaktors *CEBPA* in humanen Stamm- und Vorläuferzellen herunterreguliert. Auf diese Weise sollte die Rolle dieses Faktors bei der menschlichen Hämatopoese und Leukämogenese erforscht werden. Nach Kotransfektions- und Infektionsversuchen wurden die am besten funktionierenden Oligonukleotide in einem retroviralen SIN-Vektor (RSR-SIN bzw. RSG-SIN) für die Runterregulation von endogenem *CEBPA* eingesetzt und dieser Knockdown auf Proteinebene bewiesen. Humane Nabelschnurblutzellen wurden mit viralen Überständen, die siRNA gegen *CEBPA* im retroviralen SIN-Vektor enthielten, infiziert und in flüssigem sowie semisoliden Medium zur Ausreifung gebracht. Der Knockdown von *CEBPA* in humanen, hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen zeigte schließlich, dass *CEBPA* eine Schlüsselrolle in der terminalen Differenzierung der myeloischen Progenitorzellen zu Granulozyten spielt. Ist die Expression dieses Transkriptionsfaktors reduziert, bleiben die Zellen auf einem unreifen Promyelozyten- bzw. Blastenstadium stehen - die reifen Formen bleiben aus.

4.1 Knockdown von Genen mit Hilfe der RNAi-Methode

Wie wirksam ist aber die RNAi-Methode tatsächlich? Und wie effektiv sind die verschiedenen Oligonukleotide? Essentiell für die Wirksamkeit der RNAi-Methode in verschiedenen Zelllinien war das in dieser Arbeit verwendete Vektorsystem pSUPER, das eine stabile Expression der siRNAs in Säugetierzellen gewährleistet. Brummelkamp und Mitarbeiter entwickelten den sog. pSUPER-Vektor für RNAi in Säugetierzellen, der unter der Kontrolle eines Polymerase-III-Promotors die Synthese von shRNA-Transkripten von einer DNA-Matrize über einen längeren Zeitraum (2 Monate) lanciert (Brummelkamp et al., 2002). Auch andere Arbeitsgruppen bewiesen, dass die Anwendung von DNA-Vektoren, die die Synthese dieser Haarnadelschleifen-RNA induzieren, der Wirkung synthetischer siRNAs gleichgestellt ist (Sui et al., 2002; Zeng et al., 2002). Um zu zeigen, dass pSUPER streng sequenzspezifisch den Knockdown von Zielgenen über die siRNA-Expression verursacht, wurden pSUPER-Vektoren mit integrierter mutierter siRNA in einer Zelllinie transduziert und zeigten keinen RNAi-Effekt (Brummelkamp et al., 2002).

Die Auswahl der siRNAs für das Zielgen ist ein entscheidender Schritt im Prozess der siRNA-vermittelten Runterregulation eines Gens. Die siRNAs müssen gewisse Voraussetzungen, die von Tuschl und Mitarbeitern zusammengetragen worden sind, erfüllen (Elbashir et al., 2002). Sie betreffen u. a. Sequenzlänge, GC-Inhalt und Nukleotidzusammensetzung (siehe Kap.2.2.4). Darüber hinaus muss eine Kreuzreaktion der dsRNAs mit anderen Genen bezüglich ihrer Runterregulation ausgeschlossen werden. Mit dem Programm DEQOR lassen sich siRNA-Oligonukleotide im Hinblick auf ihr Potential zur Induktion des genetischen Knockdowns und ihre mögliche Kreuzreaktion mit anderen Genen überprüfen. DEQOR mimt siRNAs nach, indem es die angegebene Sequenz in 16 bis 25 nt große Stücke fragmentiert und jede einzelne siRNA anhand der vorgegeben Kriterien vergleicht (Henschel et al., 2004).

Bereits in den Ergebnissen der Kotransfektionen stellte sich eine bestimmte Rangfolge der Effektivität der ausgewählten shRNAs heraus, die sich nach Infektion der etablierten SC-1-Zelllinien mit Virusüberständen, die die jeweilige pSUPER-Kassette inklusive des Oligonuklotids enthielten, bestätigte. Nicht alle ausgesuchten DNA-Oligonukleotide funktionierten überzeugend (siehe tel2 in Kap. 3.1.2, Abb.8 und 9). Scherr und Mitarbeiter präsentierten in ihrer Arbeit eine stabile siRNA-Expression, die mit einer stabilen Runterregulation der Zielgene einherging. Sie zeigten aber auch eine große Schwankungsbreite des siRNA-vermittelten genetischen Knockdowns von einer schwachen Wirkung bis hin zu einem kompletten „loss-of-function“ Phänotyp (Scherr et al., 2003). Deshalb ist es von Bedeutung, mehrere siRNAs bezüglich ihrer Funktion miteinander zu vergleichen.

In dem Testsystem dieser Arbeit ist es gelungen, die Fluoreszenz des Markergens eGFP, welches bizistronisch an die *CEBPA*- bzw. *TEL*-Gensequenz gekoppelt ist, in den Kotransfektionsversuchen mit Oligonukleotiden gegen *TEL* um bis zu 60% und gegen *CEBPA* um bis zu 40% transient zu reduzieren (siehe Kap.3.1.2., Abb.8 und 9). Die Ergebnisse der stabilen Expression der Oligonukleotide in den beiden neu etablierten Fibroblasten-Zelllinien, SC1/mutCEBPA-YFP bzw. SC1/mutTEL-eGFP, die ebenfalls das Ziel- und das Markergen von einer bizistronischen mRNA exprimierten, zeigten nach Infektion mit siRNA-haltigen Vektoren in Virusüberständen eine sogar noch stärkere RNA-Interferenz. Im Falle von *CEBPA* ist die RFP/YFP-Fluoreszenz um bis zu 75% und bei *TEL* die RFP/eGFP-Fluoreszenz über 70% langfristig verringert gewesen (siehe Kap.3.1.4; Abb.13-16).

Zu betonen ist jedoch, dass das in dieser Arbeit angewandte Testsystem ein artifizielles ist, da das Protein mutC/EBP α bzw. mutTEL in den beiden Zelllinien

SC1/mutCEBPA-YFP bzw. SC1/mutTEL-eGFP konstitutiv überexprimiert wird, wodurch die Wirkung der RNAi reduziert wird.

Man kann mit dieser Testmethode keine Aussagen über die tatsächliche Wirkung der siRNA auf ein endogen reguliertes Gen machen, sie eignet sich aber sehr gut zum Vergleich mehrerer Oligonukleotide untereinander sowie der verfügbaren Vektorsysteme.

Die Ausschaltung eines endogen exprimierten Proteins und der Nachweis der RNAi auf dieser Ebene bieten eher den Einblick in die Beeinflussung der Gene durch siRNA. So wurde das endogene C/EBP α der Zelllinie HepG2 mit Hilfe des cebp3-Oligonukleotids runterreguliert (siehe Kap. 3.1.5; Abb.18). Außerdem konnte die RNAi-Methode in dieser Arbeit erfolgreich in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen zur Untersuchung des Transkriptionsfaktors *CEBPA* angewandt werden, was in der RT²-PCR und anhand von FACS-Analysen mit Antikörpern gegen Oberflächenantigene der hämatopoetischen Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle gezeigt werden konnte (siehe Kap. 3.2.2; Abb.20 sowie Kap. 3.2.3; Abb. 23 und 24). Auch die Zytospin-Analysen der Flüssigkulturen sowie die Ergebnisse der CFU-C Assay zeigen deutliche Unterschiede zwischen den Zellen, die siRNA gegen C/EBP α exprimieren und den Kontrollzellen (siehe Kap.3.2.3; Abb.25 und Kap.3.2.4).

Nach der Betrachtung dieser Ergebnisse stellt sich als nächstes die Frage nach der Spezifität der RNA-Interferenz. Schließlich sollte vor der experimentellen sowie auch klinischen Anwendung sichergestellt sein, dass das eingesetzte shRNA-Oligonukleotid nicht auch andere humane Gene runterreguliert. Obwohl es gegensätzliche Meinungen gibt zu dem Problem der Kreuzreaktion von siRNAs mit anderen Gensequenzen, kann diese zurzeit nicht endgültig ausgeschlossen werden (Semizarov et al., 2003; Chi et al., 2003; Jackson et al., 2003). Brown und Mitarbeiter zeigten, dass die RNAi-Methode tatsächlich spezifisch ist, indem sie siRNA gegen eGFP in humanen Nierenzellen exprimieren ließen und anschließend über DNA-Mikroarrays 20.000 Gene dieser Zellen untersuchten. Keines der Gene war durch die siRNA beeinträchtigt (Chi et al., 2003). Jackson und Mitarbeiter benutzten mehrere verschiedene siRNAs, um zwei humane Gene runterzuregulieren, und zeigten die Ausschaltung anderer Gene in Abhängigkeit von der verwendeten siRNA-Sequenz (Jackson et al., 2003). Es wurde auch nachgewiesen, dass das Einbringen von siRNAs in die Zelle eine Interferonantwort hervorruft (Sledz et al., 2003). Die Sequenz-Spezifität wurde in dieser Arbeit durch Zuhilfenahme des DEQOR-Programms sowie durch die Anwendung zweier Oligonukleotide (ceb2 und 3) gewährleistet.

4.2 Expression von siRNA mit Hilfe des retroviralen SIN-Vektors

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit musste ein Vektorsystem gefunden werden, welches optimal den Transfer der pSUPER-Kassette samt des Oligonukleotidpaares in das zelluläre Genom sowie eine problemlose Transkription der shRNA gewährleistet. Dieser Gentransfer kann entweder über Lenti- oder γ -Retroviren vermittelt werden (Tiscornia et al., 2003; Scherr et al., 2003; Devroe und Silver, 2002; Brummelkamp et al., 2002). Zur Auswahl standen zwei retrovirale Vektoren, zum einen der RSR zum anderen der RSR-SIN - beide mit dem Markergen für RFP versehen (siehe Kap. 3.1.3, Abb.10). Der RSR-Vektor besitzt eine intakte LTR, RSR-SIN dagegen eine defekte LTR mit einer Deletion in der Enhancer-Region, so dass nur eine geringe Transkription der proviralen DNA möglich ist. Dieser Unterschied innerhalb der beiden Vektoren erwies sich als entscheidend bezüglich der RNA-Interferenz. Der RSR-SIN-Vektor senkte die eGFP-Fluoreszenz viel stärker (um 82%) als der herkömmliche retrovirale Vektor, der die Fluoreszenz um ca.12% reduzierte (siehe Kap. 3.1.3.; Abb.12).

Wie aber lässt sich ein derart großer Unterschied bezüglich der Vermittlung der RNAi-Stärke innerhalb der beiden Vektoren erklären? Der RSR-Vektor hat eine komplette LTR mit Enhancer und Promotor. Daher wird die gesamte provirale DNA einschließlich der pSUPER-Kassette und dem Oligonukleotid in RNA transkribiert. Diese LTR-gesteuerte Transkription könnte mit der Transkription des Oligonukleotids unter Kontrolle des H1-Promotors interferieren und dazu führen, dass keine oder nur sehr geringe Mengen an siRNA synthetisiert werden. Eine transkriptionelle Interferenz dieser Art wurde in einem anderen Kontext für Retroviren beschrieben (Yee et al., 1987). Der retrovirale SIN-Vektor hat dagegen aufgrund seiner deletierten LTR ein viel geringeres Risiko einer transkriptionellen Interferenz.

Die Ergebnisse dieses Abschnitts sprechen eindeutig für den Einsatz eines retroviralen SIN-Vektors für die stabile Integration der shDNA in das Genom und einer langfristigen Wirksamkeit der RNA-Interferenz in Zelllinien.

4.3 Rolle des Transkriptionsfaktors C/EBP α bei der Hämatopoese und Leukämogenese

Der Transkriptionsfaktor CCAAT/enhancer-binding protein- α (C/EBP α) ist ein wichtiger Regulator der Hämatopoese und scheint vor allem für die Differenzierung der neutrophilen Granulozyten essentiell zu sein (Zhang et al., 1997; Radomska et al., 1998; Pabst et al., 2001; Cammenga et al., 2003; Nerlov, 2004). In unserer Arbeitsgruppe wurden die dominant negativen Eigenschaften der p30-Mutante gegenüber dem Wildtyp C/EBP α in CD34⁺-Zellen widerlegt, indem wir zeigten, dass Wildtyp C/EBP α in Anwesenheit der Mutante seine Transkriptionsaktivität für die Festlegung der granulocytären Zelllinie behält (Cammenga et al., Manuskript in Vorbereitung). Neueste Studien belegen, dass C/EBP α auch die Repopulation und Selbsterneuerung der HSC reguliert (Zhang et al., 2004). Da Mutationen dieses Transkriptionsfaktors in Zellen von AML-Patienten gefunden worden sind, die keine Veränderungen des Karyotyps aufweisen, und eine Reduktion von C/EBP α durch das Fusionsprotein AML1/ETO in der AML Typ2 bewiesen worden ist (Pabst et al., 2001b; Gombart et al., 2002; Preudhomme et al., 2002), liegt der Verdacht nahe, dass C/EBP α auch eine Rolle bei der Leukämogenese spielen könnte (Nerlov et al., 2004). Es existieren bereits verschiedene Mausmutanten von C/EBP α (Zhang et al., 1997; Zhang et al., 2004), um die Pathogenese der AML zu studieren. Man sollte jedoch mit dem Gleichsetzen von humanen und murinen Mechanismen der Hämatopoese und den Mechanismen der C/EBP α -Regulation vorsichtig sein (Schwieger et al., 2004; Timchenko et al., 1995; Legraverend et al., 1993). Aus diesen Gründen befasst sich diese Arbeit mit den Funktionen und Eigenschaften von C/EBP α in humanen Stamm- und Vorläuferzellen. Diese Daten sind die ersten, die den genetischen Knockdown von *CEBPA* mittels siRNA in humanen Stamm- und Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut beschreiben. Mit Hilfe der RNAi-Methode konnte die Expression von *CEBPA* in CD34⁺-Zellen runterreguliert werden, um die Zellen anschließend in Differenzierungsmedien zu kultivieren. Die Ergebnisse der Differenzierung in Flüssigkultur ergänzen sich mit denen der CFU-C Assay zu einem Gesamtbild der Funktion von C/EBP α in humanen Stamm- und Vorläuferzellen: C/EBP α ist essentiell für die terminale Differenzierung der neutrophilen Granulozyten aus myeloiden Vorläuferzellen. Die Verminderung der *CEBPA*-Expression hat dagegen keinen Einfluss auf die Festlegung in Richtung der myeloiden Abstammungsreihe (*Lineage Commitment*), da sowohl die myeloide wie auch die erythroide Abstammungsreihe mit einer verminderten C/EBP α -Expression in

ihrer Zell- und Kolonienzahl unverändert bleiben (näheres siehe im folgenden Kapitel). Es wurde aber eine Zunahme an unreifen Progenitorzellen um nahezu das Doppelte im Vergleich zur Kontrollpopulation beobachtet, was darauf hinweist, dass ein vermindertes C/EBP α -Level zu einem myeloiden Differenzierungsblock führt (siehe Kap. 3.2.4; Abb.27).

Ein posttranskriptional reduziertes C/EBP α wurde in Proben von Patienten nachgewiesen, die vom Stadium der CML in die myeloische Blastenkrise übergingen (Perrotti et al., 2001). Diese Erkenntnisse stimmen mit der Hypothese überein, dass die in der *de novo* AML, aber auch in den der AML ähnlichen Syndromen beobachteten Differenzierungshemmung durch eine Störung in der Signalkaskade der Transkriptionsfaktoren beeinflusst wird. Interessanterweise zeigte die Studie von Rosenbauer und Mitarbeitern, dass für die Entwicklung einer AML immer noch eine gewisse Restfunktion eines Leukämie-assoziierten Transkriptionsfaktors, in dem Fall 20% von der PU.1-Aktivität, vorhanden sein muss und dass weder Knockout-Mäuse noch Heterozygote eine AML entwickeln konnten (Rosenbauer et al., 2004). Mit Hilfe der RNA-Interferenz Methode konnte in dieser Arbeit C/EBP α teilweise und nicht komplett runterreguliert werden. Als Folge kam es zum Auftreten unreifer Vorstufen im Vergleich zur Kontrolle (siehe Kap. 3.2.3; Abb.25 und Kap. 3.2.4). Diese Ergebnisse stimmen eher überein mit der Arbeit von Nerlov und Mitarbeitern, die zeigen, dass einzelne Mutationen von C/EBP α nach Transplantation in letal bestrahlte Mäuse keine echte AML verursachen, dafür aber den Differenzierungsblock der neutrophilen Granulozyten und die Ansammlung von unreifen Vorstufen bewirken (Porse et al., 2005). Für die Induktion einer AML bedarf es eines sog. *second hit*.

4.4 Rolle von C/EBP α beim myeloiden Lineage Commitment

Die Ergebnisse der Flüssigkultur zeigen, dass eine reduzierte C/EBP α -Expression die myeloide Differenzierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen stört, was anhand der geringeren Antikörperbindungen an CD14- und CD15-Antigene der RSG-SIN/cebp3-exprimierenden Zellen eineinhalb und knapp drei Wochen nach der Infektion im Vergleich zur Kontrollkultur erkennbar ist (siehe Kap.3.2.3; Abb.22 und 23). Die in der FACS-Analyse derselben Zellen sichtbare Population an CD71⁺/CD13⁻-Zellen sowie die in den Zytospins sichtbare Zunahme an erythroiden Vorläufern ergänzt das Bild der myeloiden Differenzierungshemmung mit einer relativen Zunahme

an erythroiden Progenitorzellen (siehe Abb.22, 24 und 25). Kann man aber aus diesen Ergebnissen schließen, dass ein Mangel an C/EBP α die Festlegung auf die myeloide Abstammungsreihe negativ beeinflusst und gleichzeitig dem erythroiden *Lineage Commitment* den Vorzug lässt? Mit anderen Worten, reguliert C/EBP α bestimmte myeloide Gene, die die hämatopoetische Stammzelle in Richtung der myeloiden Abstammungsreihe hin entwickeln lassen? Und auf welcher Entwicklungsstufe hat es Einfluss auf die Hämatopoese (siehe Abb.29)? Es wurde bereits nachgewiesen, dass *CEBPA* in myeloiden Zellen exprimiert wird und eine Reihe von myeloiden Genen beeinflusst (Iwama et al., 1998; Tenen et al., 1997). Daten der Arbeitsgruppe von J.R. Keller würden die oben beschriebenen Ergebnisse belegen, da die in ihren Versuchen untersuchte fetale C/EBP α ^{-/-}-Leber eine erhöhte Anzahl an erythroiden Vorläuferzellen/ Erythroblasten im Gegensatz zur Negativkontrolle enthielt. Zudem nahm die Anzahl neutrophiler Granulozyten deutlich ab, was wiederum mit den oben genannten Daten sowie anderen Publikationen übereinstimmt (Suh et al., 2006; Zhang et al., 1997). Die Daten von Cammenga und Kollegen zeigen ergänzend, dass die Überexpression von *CEBPA* in humanen primären HSC und Vorläuferzellen zu einer Hemmung der erythroiden Differenzierung führt (Cammenga et al., 2003).

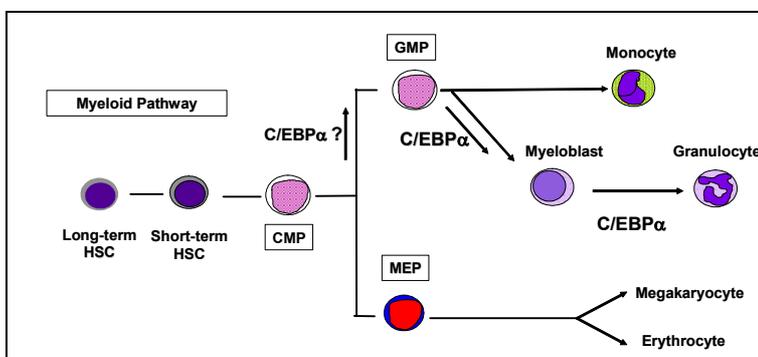


Abb.29. Rolle von C/EBP α bei der humanen Myelopoese

Abgebildet ist schematisch die Entstehung der myelozytären Abstammungsreihe. Die Pfeile zeigen auf mögliche, durch C/EBP α beeinflussbare Wege im humanen System hin. Abgeändert aus Tenen, 2003. Einzelheiten siehe Text.

Einen Aufschluss darüber, ob C/EBP α die Festlegung der myeloiden Abstammungslinie bestimmt, liefern die Ergebnisse der CFU-C Assay. Die Auszählung der CFU-GM Kolonien in Kap. 3.2.4 zeigt in zwei voneinander unabhängigen Versuchen keinen signifikanten Unterschied in den RSG-SIN/cebpb3-exprimierenden hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen verglichen mit den Kontrollkolonien (Tab.6 Kap.3.2.4). Diese Daten beweisen, dass eine reduzierte Menge an C/EBP α keinen Einfluss auf die myeloide Festlegung hat. Zudem gibt es keine signifikante Änderung der erythroiden Kolonienzahlen der RSG-SIN/cebpb3-exprimierenden Zellen. In der Arbeit von Suh und Mitarbeitern wurden fetale C/EBP α ^{-/-}-Leberzellen mit normalen Knochenmarkzellen in vorbestrahlte Mäuse kotransplantiert. Das Knochenmark dieser Tiere wurde im myeloiden CFU-C Assay kultiviert sowie durchflusszytometrisch untersucht. Es stellte sich eine reduzierte Anzahl an CFU-GM sowie eine Zunahme erythroider Kolonien ein. Zudem konnte die Gruppe zeigen, dass Überexpression von C/EBP α die erythroide Differenzierung *in vivo* hemmt. (Suh et al., 2006). Diese Diskrepanz bezüglich der Rolle des C/EBP α beim *Lineage Commitment* lässt sich damit erklären, dass es sich bei dem von Suh und Kollegen durchgeführten Versuch um einen kompletten Knockout *in vivo* handelt und bei den in dieser Arbeit präsentierten Daten um eine inkomplette Runterregulation des CEBPA-Gens *in vitro*. Das restliche translatierte C/EBP α -Protein kann das myeloide *Lineage Commitment* vermutlich weiterhin gewährleisten, ist aber nicht ausreichend für das Differenzierungssignal, weswegen es zu dem Differenzierungsblock in der myeloiden Abstammungsreihe gekommen ist (siehe Abb. 26 und 27). Zum anderen besteht Grund zu der Annahme, dass es Unterschiede in der Funktion des humanen im Vergleich zum murinen C/EBP α gibt (siehe oben).

Die Morphologie der RSG-SIN/cebpb3-exprimierenden Kolonien der CFU-C Assay bestätigt jedoch erneut die myeloide Differenzierungshemmung, insbesondere den terminalen Differenzierungsblock der neutrophilen Granulozyten (Kap.3.2.4; Abb.26), der bereits in den Flüssigkulturen gesehen worden ist (Kap.3.2.3; Abb. 25). Die Frage nach dem Zeitpunkt bzw. der Entwicklungsstufe des Differenzierungsblocks der neutrophilen Granulozyten aufgrund eines verringerten C/EBP α -Levels haben Zhang und Mitarbeiter durch Versuche mit konditionierten C/EBP α ^{-/-}-Mäusen versucht zu beantworten. In der fetalen Leber entstand die Differenzierungshemmung am Übergang von den CMP zu den GMP. Zudem zeigte die Arbeitsgruppe vergleichbar mit den in dieser Arbeit präsentierten Ergebnissen in humanen Nabelschnurblutzellen, dass im Knochenmark der Mäuse selektiv die myeloide Abstammungslinie betroffen

war, es zu einer Ansammlung unreifer Myeloblasten kam und dass die erythroide Linie weder in der Differenzierung noch in der Zellzahl Veränderungen zeigte (Zhang et al., 2004).

Der aufgrund einer niedrigen C/EBP α -Expression entstehende Differenzierungsblock der myeloiden Absatzungslinie in den hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen könnte zusammen mit einer weiteren genetischen Läsion im hämatopoetischen System im Sinne eines *second hit* zu einem leukämoiden Phänotyp führen.

5. Literaturverzeichnis

Akashi K., Traver D., Miyamoto T., and Weissman IL (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404: 193-197.

Anderson K.L., Smith K.A., Perkin H., Hermanson G., Anderson C.G., Jolly D.J., Maki R.A., and Torbett B.E. (1999). PU.1 and the granulocyte- and macrophage colony-stimulating factor receptors play distinct roles in late-stage myeloid cell differentiation. *Blood* 94: 2310-2318.

Barrett J.M., Puglia M.A., Singh G., and Tozer R.G. (2002). Expression of Ets-related transcription factors and matrix metalloproteinase genes in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 72: 227-232.

Bernstein E., Denil A.M., and Hannon G.J. (2001). The rest is silence. *RNA* 7:1509-1521.

Birnboim H.C., and Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523.

Brummelkamp T.R., Bernards R., and Agami R. (2002). A System for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296: 550– 553.

Buechner T., Berdel W.E., Schoch C., Haferlach T., et al., (2005). Treatment of AML in biological subgroups. *Hematology* 10 Suppl 1: 281-285.

Burel S.A., Harakawa N., Zhou L., Pabst T., Tenen D.G., and Zhang D.E. (2001). Dichotomy of AML1-ETO functions: growth arrest versus block of differentiation. *Mol Cell Biol* 21: 5577-5590.

Burns J.C., Friedmann T., Driever W., Burrascano M., and Yee J.K. (1993). 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 USA* 90: 8033-8037.

Cai Z., de Bruijn M., Ma X., Dortland B., Luteijn T., Downing R.J., and Dierzak E. (2000). Haploinsufficiency of AML1 affects the temporal and spatial generation of hematopoietic stem cells in the mouse embryo. *Immunity* 3: 423-431.

Cameron S., Taylor D.S., TePas E.C., Speck N.A., and Mathey-Prevot B. (1994). Identification of a critical regulatory site in the human interleukin-3 promoter by in vivo footprinting. *Blood* 83: 2851-2859.

Cameron E.R., and Neil J.C. (2004), The Runx genes: lineage-specific oncogenes and tumor suppressors. *Oncogene* 23: 4308-4314.

Cammenga J., Mulloy J.C., Berguido F.J., MacGrogan D., Viale A., and Nimer S.D. (2003). Induction of C/EBP α activity alters gene expression and differentiation of human CD34+ cells. *Blood* 101: 2206-2214.

Cammenga J. (2005). Gatekeeper pathways and cellular background in the pathogenesis and therapy of AML. *Leukemia* 19: 1719-1728.

Cammenga J., Niebuhr B., Iwanski G., Täger M., Delwel R., and Stocking C.: Dissecting the Molecular Mechanisms of Mutant C/EBP α in normal and malignant hematopoiesis. Manuskript in Vorbereitung

Care R.S., Valk P.J., Goodeve A.C., Abu-Duhier F.M., Geertsma-Kleinekoort W.M., Wilson G.A., Gari M.A., Peake I.R., Lowenberg M., and Reilly J.T. (2003). Incidence and prognosis of c-KIT and FLT3 mutations in core binding factor (CBF) acute myeloid leukaemias. *Br J Haematol* 121: 775-777.

Carroll M., Tomasson M.H., Barker G.F., Golub T.R., and Gilliland D.G. (1996). The TEL/platelet-derived growth factor beta receptor (PDGF beta R) fusion in chronic myelomonocytic leukemia is a transforming protein that self-associates and activates PDGF beta R kinase-dependent signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 14845-14850.

Chi J.T., Chang H.Y., Wang N.N., Chang D.S., Dunphy N., and Brown P.O. (2003). Genomewide view of gene silencing by small interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 6343-6346.

Dao M.A., Hashino K., Kato L., and Nolte J.A. (1998). Adhesion to fibronectin maintains regenerative capacity during ex vivo culture and transduction of human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 92: 4612-4621.

de Bruijn M.F., and Speck N.A. (2004). Core-binding factors in hematopoiesis and immune function. *Oncogene* 23: 4238-4248.

De Guzman C.G., Warren A.J., Zhang Z., Gartland L., Erickson P., Drabkin H., Hiebert S.W., and Klug C.A. (2002). Hematopoietic stem cell expansion and distinct myeloid developmental abnormalities in a murine model of the AML1-ETO translocation. *Mol Cell Biol* 22: 5506-5517.

DeKoter R.P., Walsh J.C., and Singh H. (1998). PU.1 regulates both cytokine-dependent proliferation and differentiation of granulocyte/macrophage progenitors. *EMBO J* 17: 4456-4468.

DeKoter R.P., and Singh H. (2000). Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science* 288: 1439-1441.

Devroe E., and Silver P.A. (2002). Retrovirus-delivered siRNA. *BMC Biotechnol* 28: 15.

Dexter T.M., Heyworth C.M., Spooner E., and Ponting I.L. (1990). The role of growth factors in self-renewal and differentiation of haemopoietic stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 327: 85-98.

Diehl A.M., Johns D.C., Yang S., Lin H., Yin M., Matelis M.A., and Lawrence J.H. (1996). Adenovirus-mediated transfer of CCAAT/enhancer-binding protein- α identifies a dominant antiproliferative role for this isoform in hepatocytes. *J Biol Chem* 271: 7343-7350.

Domen J., and Weissman I.L. (1999). Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate. *Mol Med Today* : 201-208.

Donahue R.E., Sorrentino B.P., Hawley R.G., An D.S., Chen I.S., and Wersto R.P. (2001). Fibronectin fragment CH-296 inhibits apoptosis and enhances ex vivo gene

transfer by murine retrovirus and human lentivirus vectors independent of viral tropism in nonhuman primate CD34+ cells. *Mol Ther* 3: 359-367.

Dykxhoorn D.M., Novina C.D., and Sharp P.A. (2003). Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 457-467.

Elbashir S.M., Lendeckel W., and Tuschl T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15: 188-200.

Elbashir S.M., Harboth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., and Tuschl T. (2001b). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494-498.

Elbashir S.M., Harborth J., Weber K., and Tuschl T. (2002). Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 26: 199-213.

Erickson P., Gao J., Chang K.S., Look T., Whisenant E., Raimondi S., Lasher R., Trujillo J., Rowley J., and Drabkin H. (1992). 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* 80: 1825-1831.

Fehse B., Schade U.M., Li Z., Uhde A., Koch S., Goller B., Ruger R., Fehse N., Stockschrader M., and Zander A.R. (1998). High-efficiency retroviral vector-mediated gene transfer into human T lymphocytes. *Adv Exp Med Biol* 451: 375-378.

Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., and Mello C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.

Fischer M., Schwieger M., Horn S., Niebuhr B., Ford A., Roscher S., Bergholz U., Greaves M., Lohler J., and Stocking C. (2005). Defining the oncogenic function of the TEL/AML1 (ETV6/RUNX1) fusion protein in a mouse model. *Oncogene* 24: 7579-7591.

Fröhling S., Schlenk R.F., Breitnick J., Benner A., Kreitmeier S., Tobias K., Dohner H., and Dohner K. (2002). Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger

adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood* 100: 4372-4380.

Gari M., Goodeve A., Wilson G., Winship P., Langabeer S., Linch D., Vandenberghe E., Opeake I., and Reilly J. (1999). c-kit proto-oncogene exon 8 in-frame deletion plus insertion mutations in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 105: 894-900.

Gilliland D.G., and Griffin J.D. (2002). Role of FLT3 in leukemia. *Curr Opin Hematol* 9: 274-281.

Gilliland D.G., and Tallman M.S. (2002). Focus on acute leukemias. *Cancer Cell* 1: 417-420.

Gilliland D.G., Jordan C.T., and Felix C.A. (2004). The Molecular Basis of Leukemia, *Hematology 2004*, (ed) American Society of Hematology, Education Program Book: 80-97.

Golub T.R., Barker G.F., Bohlander S.K., Hiebert S.W., Ward D.C., Bray-Ward P., Morgan E., Raimondi S.C., Rowley J.D., and Gilliland D.G. (1995). Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4917-4921.

Gombart A.F., Hofmann W.K., Kawano S., Takeuchi S., Krug U., Kwok S.H., Larsen R.J., Asou H., Miller C.W., Hoelzer D., and Koeffler H.P. (2002). Mutations in the gene encoding the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein alpha in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *Blood* 99: 1332-1340.

Graf T. (2002). Differentiation plasticity of hematopoietic cells. *Blood* 99: 3089-3101.

Growney J.D., Shigematsu H., Li Z., Lee B.H., Adelsperger J., Rowan R., Curley D.P., Kuotok J.L., Akashi K., Williams I.R., Speck N.A., and Gilliland D.G. (2005). Loss of Runx1 perturbs adult hematopoiesis and is associated with a myeloproliferative phenotype. *Blood* 106: 494-504.

Hammond S.M., Caudy A.A., and Hannon G.J. (2001). Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet* 2: 110-119.

Hao Q.L., Zhu J., Price M.A., Payne K.J., Barsky L.W., and Crooks G.M. (2001). Identification of a novel, human multilymphoid progenitor in cord blood. *Blood* 97: 3683-3690.

Hartley J.W., and Rowe W.P. (1975). Clonal cells lines from a feral mouse embryo which lack host-range restrictions for murine leukemia viruses. *Virology* 65: 128–134.

Hatta Y., Takeuchi S., Yokota J., and Koeffler H.P. (1997). Ovarian cancer has frequent loss of heterozygosity at chromosome 12p12.3-13.1 (region of TEL and Kip1 loci) and chromosome 12q23-ter: evidence for two new tumour-suppressor genes. *Br J Cancer* 75: 1256-1262.

Hendricks-Taylor L.R., and Darlington G.J. (1995). Inhibition of cell proliferation by C/EBP alpha occurs in many cell types, does not require the presence of p53 or Rb, and is not affected by large T-antigen. *Nucleic Acids Res* 23: 4726-4733.

Henschel A., Buchholz F., and Habermann B. (2004). DEQOR: a web-based tool for the design and quality control of siRNAs. *Nucleic Acids Res* 32: 113-120.

Hildinger M., Eckert H.G., Schilz A.J., John J., Ostertag W., and Baum C. (1999). FMEV vectors: both retroviral long terminal repeat and leader are important for high expression in transduced hematopoietic cells. *Gene Ther* 5: 1575-1579.

Hock H., Meade E., Medeiros S., Schindler J.W., Valk P.J., Fujiwara Y., and Orkin S.H. (2004). Tel/Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival. *Genes Dev* 18: 2336-2341.

Hohaus S., Petrovick M.S., Voso M.T., Sun Z., Zhang D.E., and Tenen D.G. (1995). PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene. *Mol Cell Biol* 15: 5830-5845.

Hunter T., Hunt T., Jackson R.J., and Robertson H.D. (1975). The characteristics of inhibition of protein synthesis by double-stranded ribonucleic acid in reticulocyte lysates. *J Biol Chem* 250: 409-417.

Ish-Horowicz D., and Burke J.F. (1981). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523.

Iwama A., Zhang P., Darlington G.I., McKercher S.R., Maki R., and Tenen D.G. (1998). Use of RDA analysis of knockout mice to identify myeloid genes regulated in vivo by PU.1 and C/EBPalpha. *Nucleic Acids Res* 26: 3034-3043.

Jackson A.L., Bartz S.R., Schelter J., Kobayashi S.V., Burchard J., Mao M., Li B., Cavet G., and Linsley P.S. (2003). Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 21: 635-637.

Johansen L.M., Iwama A., Lodie T.A., Sasaki K., Felsher D.W., Golub T.R., and Tenen D.G. (2001). c-Myc is a critical target for C/EBPalpha in granulopoiesis. *Mol Cell Biol* 21: 3789-3806.

Jordan C.T., and Guzman M.L. (2004). Mechanisms controlling pathogenesis and survival of leukemic stem cells. *Oncogene* 23: 7178-7187.

Jousset C., Carron C., Boureux A., Quang C.T., Oury C., Dusanter-Fourt I., Charon M., Levin J., Bernard O., and Ghysdael J. (1997). A domain of TEL conserved in a subset of ETS proteins defines a specific oligomerization interface essential to the mitogenic properties of the TEL-PDGFR beta oncoprotein. *EMBO J* 16: 69-82.

Keith W.N., Brown R., and Pragnell I.B. (1990). Retrovirus mediated transfer and expression of GM-CSF in haematopoietic cells. *Br J Cancer* 62: 388-394.

Keller G., and Snodgrass R. (1990). Life span of multipotential hematopoietic stem cells in vivo. *J Exp Med* 171: 1407-1418.

Kiem H.P., Andrews R.G., Morris J., Peterson L., Heyward S., Allen J.M., Rasko J.E., Potter J., and Miller A.D. (1998). Improved gene transfer into baboon marrow repopulating cells using recombinant human fibronectin fragment CH-296 in combination with interleukin-6, stem cell factor, FLT-3 ligand, and megakaryocyte growth and development factor. *Blood* 92: 1878-1886.

Kiyoi H., Naoe T., Nakano Y., Yokota S., Minami S., Miyawaki S., Asou N., Kuriyama K., Jinnai I., Shimazaki C., Akiyama H., Saito K., Oh H., Motoji T., Omoto., Saito H., Ohno R., and Ueda R. (1999). Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 93: 3074-3080.

Kondo M., Wagers A.J., Manz M.G., Prohaska S.S., Scherer D.C., Beilhack G.F., Shizuru J.A., and Weissman I.L. (2003). Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol* 21: 759-806.

Kondo M., Weissman I.L., and Akashi K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91: 661-672.

Krause D.S., Fackler M.J., Civin C.I., and May W.S. (1996). CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 87: 1-13.

Landschulz W.H., Johnson P.F., and McNight S.L. (1988b). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240: 1759-1764.

Landschulz W.H., Johnson P.F., and McKnight S.L. (1989). The DNA binding domain of the rat liver nuclear protein C/EBP is bipartite. *Science* 243: 1681-1688.

Legraverend C., Antonson P., Flodby P., and Xanthopoulos K.G. (1993). High level activity of the mouse CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP alpha) gene promoter involves autoregulation and several ubiquitous transcription factors. *Nucleic Acids Res* 21: 1735-1742.

Levis M., Murphy K.M., Pham R., Kim K.T., Stine A., Li L., McNiece I., Smith B.D., and Small D. (2005). Internal tandem duplications of the FLT3 gene are present in leukemia stem cells. *Blood* 106: 673-680.

Lin F.T., and Lane M.D. (1994). CCAAT/enhancer binding protein alpha is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8757-8761.

- Linnekin D. (1999). Early signaling pathways activated by c-Kit in hematopoietic cells. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 1053-1074.
- Logan A.C., Nightingale S.J., Haas D.L., Cho G.J., Pepper K.A., and Kohn D.B. (2004). Factors influencing the titer and infectivity of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 15: 976-988.
- Loh M.L., Silverman L.B., Young M.L., Neuberg D., Golub T.R., Sallan S.E., and Gilliland D.G. (1998). Incidence of TEL/AML1 fusion in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 92: 4792-4797.
- Lopez R.G., Carron C., Oury C., Gardellin P., Bernard O., and Ghysdael J. (1999). TEL is a sequence-specific transcriptional repressor. *J Biol Chem* 274: 30132-30138.
- Lotem J., and Sachs L. (1999). Cytokines as suppressors of apoptosis. *Apoptosis* 4: 187-196.
- Lowenberg B. (2001). Prognostic factors in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 14: 65-75.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., and Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Lubbert M., Hermann F., and Koeffler H.P. (1991). Expression and regulation of myeloid-specific genes in normal and leukemic myeloid cells. *Blood* 77: 909-924.
- Manz M.G., Miyamoto T., Akashi K., and Weissman I.L. (2002). Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11872-11877.
- McKercher S.R., Torbett B.E., Anderson K.L., Henkel G.W., Vestal D.J., Baribault H., Klemsz M., Feeney A.J., Wu G.E., Paige C.J., and Maki R.A. (1996). Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J* 15: 5647-5658.

McManus M.T., and Sharp P.A. (2002). Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet* 3: 737-747.

Mizuki M., Schwable J., Steur C., Choudhary C., Agrawal S., Sargin B., Steffen B., Matsumara I., Kanakura Y., Bohmer F.D., Müller-Tidow C., Berdel W.E., and Serve H. (2003). Suppression of myeloid transcription factors and induction of STAT response genes by AML-specific Flt3 mutations. *Blood* 10: 3164-3173.

Moreau-Gachelin F. (1994). Spi-1/PU.1: an oncogene of the Ets family. *Biochim Biophys Acta* 1198: 149-163.

Morgan R.A., Couture L., Elroy-Stein O., Ragheb J., Moss B., and Anderson W.F. (1992). Retroviral vectors containing putative internal ribosome entry sites: development of a polycistronic gene transfer system and applications to human gene therapy. *Nucleic Acids Res* 20:1293-1299.

Morita S., Kojima T., and Kitamura T. (2000). Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* 7: 1063-1066.

Morrison S.J., Uchida N., and Weissman I.L. (1995). The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:35-71.

Mullis K.B. (1990). Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris)* 48: 579-582

Nerlov C. (2004). C/EBPalpha mutations in acute myeloid leukaemias. *Nat Rev Cancer* 4: 394-400.

Nichols J., and Nimer S.D. (1992). Transcription factors, translocations, and leukemia. *Blood* 80(12): 2953-2963.

North T., Gu T.L., Stacy T., Wang Q., Howard L., Binder M., Marin-Padilla M., and Speck N.A. (1999). Cbfa2 is required for the formation of intra-aortic hematopoietic clusters. *Development* 126: 2563-2575.

Okuda T., van Deursen J., Hiebert S.W., Grosveld G., and Downing J.R. (1996). AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 84: 321-330.

Orkin S.H. (2000). Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet* 1: 57-64.

Orkin S.H. (1995). Transcription factors and hematopoietic development. *J Biol Chem* 270: 4955-4958.

Otto F., Lubbert M., and Stock M. (2003). Upstream and downstream targets of RUNX proteins. *J Cell Biochem* 89: 9-18.

Pabst T., Mueller B.U., Zhang P., Radomska H.S., Narravula S., Schnittger S., Behre G., Hiddemann W., and Tenen D.G. (2001). Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nat Genet* 27: 263-270.

Pabst T., Mueller B.U., Harakawa N., Schoch C., Haferlach T., Behre G., Hiddemann W., Zhang D.E., and Tenen D.G. (2001b). AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia. *Nat Med* 7: 444-451.

Perrotti D., Cesi V., Trotta R., Guerzoni C., Santilli G., Campbell K., Iervolino A., Condorelli F., Gambacorti-Passerini C., Caligiuri M.A., and Calabretta B. (2001). BCR-ABL suppresses C/EBPalpha expression through inhibitory action of hnRNP E2. *Nat Genet* 30: 48-58.

Porse B.T., Pedersen T.A., Xu X., Lindberg B., Wewer U.M., Friis-Hansen L., and Nerlov C. (2001). E2F repression by C/EBPalpha is required for adipogenesis and granulopoiesis in vivo. *Cell* 107: 247-258.

Porse B.T., Bryder D., Theilgaard-Monch K., Hasemann M.S., Anderson K., Darmgaard I., Jacobsen S.E., and Nerlov C. (2005). Loss of C/EBP alpha cell cycle control increases myeloid progenitor proliferation and transforms the neutrophil granulocyte lineage. *J Exp Med* 202: 85-96.

Preudhomme C., Sagot C., Boissel N., Cayuela J.M., Tigaud I., de Botton S., Thomas X., Raffoux E., Lamandin C., Castaigne S., Fenaux P., and Dombret H. (2002). Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). *Blood* 100: 2717-2723.

Quentmeier H., Osborn M., Reinhardt J., Zaborski M., and Drexler H.G. (2001). Immunocytochemical analysis of cell lines derived from solid tumors, *J Histochem Cytochem* 49: 1369-1378.

Rabbitts T.H. (1994). Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 372: 143-149.

Radomska H.S., Huettner C.S., Zhang P., Cheng T., Scadden D.T., and Tenen D.G. (1998). CCAAT/enhancer binding protein alpha is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors. *Mol Cell Biol* 18: 4301-4314.

Reddy V.A., Iwama A., Iotzowa G., Schulz M., Elsasser A., Vangala R.K., Tenen D.G., Hiddemann W., and Behre G. (2002). Granulocyte inducer C/EBPalpha inactivates the myeloid master regulator PU.1: possible role in lineage commitment decisions. *Blood* 100: 483-490.

Reuter C.W., Morgan M.A., and Bergmann L. (2000). Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies? *Blood* 96: 1655-1669.

Romana S.P., Mauchauffe M., Le Coniat M., Chumakov I., Le Paslier D., Berger R., and Bernard O.A. (1995). The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a tel-AML1 gene fusion. *Blood* 85: 3662-3670.

Rosenbauer F., Wagener K., Kutok J.L., Iwasaki H., Le Beau M.M., Okuno Y., Akashi K., Fiering S., and Tenen D.G. (2004). Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1. *Nat Genet* 36: 624-630.

Rosenbauer F., Koschmieder S., Steidl U., and Tenen D.G. (2005). Effect of transcription-factor concentrations on leukemic stem cells. *Blood* 106: 1519-1524.

Rutella S., Bonanno G., Procoli A., Lucia M.B., Contemi A.M., Cauda R., Fianchi L., Scambia G., Pagano L., and Leone G. (2006). Granulocyte colony-stimulating factor enhances the in vitro cytotoxicity of gemtuzumab ozogamicin against acute myeloid leukemia cell lines and primary blast cells. *Exp Hematol* 34: 54-65.

Saiki R.K., Bugawan T.L., Horn G.T., Mullis K.B., and Ehrlich H.A. (1986). Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324: 163-166.

Sambrook J., Fritsch E.F and Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Sandrin V., Boson B., Salmon P., Gay W., Negre D., Le Grand R., Trono D., and Cosset F.L. (2002). Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates. *Blood* 100: 823-832.

Sanger F., and Coulson A.R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 94: 441-448.

Sato Y., Suto Y., Pietenpol J., Golub T.R., Gilliland D.G., Davis E.M., Le Beau M.M., Roberts J.M., Vogelstein B., and Rowley J.D. (1995). TEL and KIP1 define the smallest region of deletions on 12p13 in hematopoietic malignancies. *Blood* 86: 1525-1533.

Scheinberg D.A., Maslak P., and Weiss M. (2001). *Acute leukemias*. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, (ed) Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.

Scherr M., Battmer K., Ganser A., and Eder M. (2003). Modulation of gene expression by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA. *Cell Cycle* 2: 251-257.

Schwieger M., Lohler J., Friel J., Horak M., and Stocking C. (2002). AML1-ETO inhibits maturation of multiple lymphohematopoietic lineages and induces myeloblast transformation in synergy with ICSPB deficiency. *J Exp Med* 196: 1227-1240.

Schwieger M., Lohler J., Fischer M., Herwig U., Tenen D.G., and Stocking C. (2004). A dominant-negative mutant of C/EBPalpha, associated with acute myeloid leukemias, inhibits differentiation of myeloid and erythroid progenitors of man but not mouse. *Blood* 103: 2744-2752.

Scott E.W., Simon M.C., Anastasi J., and Singh H. (1994). Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* 265(15): 1573-1577.

Sears L.E., Moran L.S., Kissinger C., Creasey T., Perry-O'Keefe H., Roskey M., Sutherland E., and Slatko B.E. (1992). Circumvent thermal cycle sequencing and alternative manual and automated DNA sequencing protocols using the highly thermostable VentR (exo-) DNA polymerase. *Biotechniques* 13: 626-633.

Sell S. (2006). Cancer Stem Cells and Differentiation Therapy. *Tumor Biol* 27: 59-70.
Semizarov D., Frost L., Sarthy A., Kroeger P., Halbert D.N., and Fesik S.W. (2003). Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 6347-6352.

Sharp P.A. (1999). RNAi and double-strand RNA. *Genes Dev* 13:139-41.

Shivdasani R.A., and Orkin S.H. (1996). The transcriptional control of hematopoiesis. *Blood* 87: 4025-4039.

Simon M.C., Olson M., Scott E., Hack A.A., Su G., and Singh H. (1996). Terminal myeloid gene expression and differentiation requires the transcription factor PU.1. *Microbiol Immunol* 211: 113-119.

Sledz C.A., Holko M., de Veer M.J., Silverman R.H. and Williams BR (2003). Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 5: 834-839.

Smith L.T., Hohaus S., Gonzalez D.A., Dziennis S.E., and Tenen D.G. (1996). PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate the granulocyte colony-stimulating factor receptor promoter in myeloid cells. *Blood* 88: 1234-1247.

Soboleski M.R., Oaks J., Halford W.P. (2005). Green fluorescent protein is a quantitative reporter of gene expression in individual eukaryotic cells. *FASEB J* 19: 440-442.

Spirin K.S., Simpson J.F., Takeuchi S., Kawamata N., Miller C.W., and Koeffler H.H. (1996). p27/Kip1 mutation found in breast cancer. *Cancer Res* 56: 2400-2404.

Stanislawska J., and Olszewski W.L. (2005). RNA interference--significance and applications. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 53: 39-46.

Stirewalt D.L., and Radich J.P. (2003). The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer* 3: 650-665.

Suh H.C., Gooya J., Renn K., Friedman A.D., Johnson P.F., and Keller J.R. (2006). C/EBPalpha determines hematopoietic cell fate in multipotential progenitor cells by inhibiting erythroid differentiation and inducing myeloid differentiation. *Blood* 107: 4308-4316.

Sui G., Soohoo C., Affarel B., Gay F., Shi Y., Forrester W.C., and Shi Y. (2002). A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 5515-5520.

Tabara H., Yigit E., Siomi H., and Mello C. (2002). The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DExH-box helicase to direct RNAi in *C. elegans*. *Cell* 109: 861-871.

Tenen D.G., Hromas R., Licht J.D., and Zhang D.E. (1997). Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* 90: 489-519.

Tenen D.G. (2001). Hematopoiesis, Oxford University Press, New York (ed) Zon, L.I.: 417-428.

Tenen D.G. (2003). Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer* 3: 89-101.

Timchenko N.A., Wilde M., Nakanishi M., Smith J.R., and Darlington G.J. (1996). CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBP alpha) inhibits cell proliferation through the p21 (WAF-1/CIP-1/SDI-1) protein. *Genes Dev* 10: 804-815.

Tiscornia G., Singer O., Ikawa M., and Verma I.M. (2003). A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 1844-1848.

Umek R.M., Friedman A.D., and McKnight S.L. (1991). CCAAT-enhancer binding protein: a component of a differentiation switch. *Science* 251: 288-292.

Valk P.J., Bowen D.T., Frew M.E., Goodeve A.C., Lowenberg B., and Reilly J.T. (2004). Second hit mutations in the RTK/RAS signaling pathway in acute myeloid leukemia with inv(16). *Hematologica* 89:106.

van Waalwijk B., van Doorn-Khosrovani S., Spensberger D., de Knecht Y., Tang M., Lowenberg B., and Delwel R. (2005). Somatic heterozygous mutations in ETV6 (TEL) and frequent absence of ETV6 protein in acute myeloid leukemia. *Oncogene* 24: 4129-4137.

Wang H., Iakova P., Wilde M., Welm A., Goode T., Roesler W.J., and Timchenko N.A. (2001). C/EBPalpha arrests cell proliferation through direct inhibition of Cdk2 and Cdk4. *Mol Cell*. 8: 817-828.

Wang L., and Hiebert S.W. (2001). TEL contacts multiple co-repressors and specifically associates with histone deacetylase-3. *Oncogene* 20: 3716-3725.

Wang L.C., Kuo F., Fujiwara Y., Gilliland D.G., Golub T.R., and Orkin S.H. (1997). Yolk sac angiogenic defect and intra-embryonic apoptosis in mice lacking the Ets-related factor TEL. *EMBO J* 16: 4374-4383.

Wang L.C., Swat W., Fujiwara Y., Davidson L., Visvader J., Kuo F., Alt F.W., Gilliland D.G., Golub T.R., and Orkin S.H. (1998). The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes Dev* 12: 2392-2402.

Wang Q., Stacy T., Binder M., Marin-Padilla M., Sharpe A.H., Speck N.A. (1996). Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 3444-3449.

Warner J.K., Wang J.C., Hope KJ., Jin L., and Dick J.E. (2004). Concepts of human leukemic development. *Oncogene* 23: 7164-7177.

Whetton A.D., Heyworth C.M., Nicholls S.E., Evans C.A., Lord J.M., Dexter T.M., and Owen-Lynch PJ (1994). Cytokine-mediated protein kinase C activation is a signal for lineage determination in bipotential granulocyte macrophage colony-forming cells. *J Cell Biol* 125: 651-659.

Wulfhekel U., Düllmann J., und Pabst R. (1994). Das Blut und die Organe der Blutbildung (Sanguis). Drenckhahn und Zenker (ed) Benninghoff Anatomie Band 1, Urban & Schwarzenberg, München.

Yee J.K., Moores J.C., Jolly D.J., Wolff J.A., Respass J.G., and Friedmann T. (1987). Gene expression from transcriptionally disabled retroviral vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 5197-5201.

Zeng Y., and Cullen B.R. RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm. *RNA* 8: 855-860.

Zhang D.E., Zhang P., Wang N.D., Hetherington C.J., Darlington G.J., Link D.C., and Tenen D.G. (1997). Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 569-574.

Zhang P., Iwasaki-Arai J., Iwasaki H., Fenyus M.L., Dayaram T., Owens B.M., Shigematsu H., Levantini E., Huettner C.S., Lekstrom-Himes J.A., Akashi K., and Tenen D.G. (2004). Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and

self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP alpha. *Immunity* 21: 853-863.

Zhang X.Y., La Russa V.F., and Reiser J. (2004). Transduction of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells by using lentivirus vectors pseudotyped with modified RD114 envelope glycoproteins. *J Virol* 78:1219-1229.

Zheng R., Friedman A.D., Levis M., Li L., Weir E.G., and Small D. (2004). Internal tandem duplication mutation of FLT3 blocks myeloid differentiation through suppression of C/EBPalpha expression. *Blood*. 103: 1883-1890.

Zhu J., and Emerson S.G. (2002). Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene* 21: 3295-3331.

6. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AML	Akute myeloische Leukämie
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
<i>CEBPA</i>	Gen: CCAAT/enhancer-binding protein alpha
C/EBP α	Transkriptionsfaktor: CCAAT/enhancer-binding protein alpha
CFU	Kolonien bildende Einheit (colony-forming unit)
CFU-C Assay	Colony Forming Unit- Colony Assay
CFU-E	Erythrozyten-Kolonien bildende Einheit
CFU-GEMM	Granulozyten-Erythrozyten-Monozyten-Makrophagen-Kolonien bildende Einheit
CFU-GM	Granulozyten-Makrophagen-Kolonien bildende Einheit
CLP	Lymphoide Vorläuferzelle(n) (common lymphoid progenitor)
CMP	Myeloide Vorläuferzelle(n) (common myeloid progenitor)
CMV	Cytomegalievirus
CSF	Kolonie-stimulierender Faktor (colony stimualting factor)
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	Grün fluoreszierendes Protein (enahnced green fluorescent protein)
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FLT3	fms-like tyrosine kinase-3
G	Guanin
Gag	kodierende Sequenz für retrovirale Strukturproteine
G-CSF	Granulozyten Kolonie-stimulierender Faktor (granulocyte colony-stimulating factor)
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (granulocyte/macrophage colony-stimulating factor)
GMP	Granulozyten-Makrophagen-Progenitor(en)
h	Stunde(n)

HBSS	Name einer Salzlösung: Hanks Balanced Salt Solution
HEPES	2-(N-Hydroxyethylpiperazin)-2-ethansulfonsäure
hEPO	humanes Erythropoetin
hFlt-3	humane Flt-3 Tyrosinkinase
hIL-3	humanes Interleukin 3
hIL6	humanes Interleukin 6
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HSC	Hämatopoetische Stammzelle(n)
hSCF	humaner Stammzellfaktor (human stem cell factor)
hTPO	humanes Thrombopoetin
IE	Infektiöse Einheit
inv	Inversion
IRES	Interne Ribosomen-Eintrittsstelle einer mRNA (internal ribosomal entry site)
KMT	Knochenmarktransplantation
L	Liter
LB	Bakterienmedium: Luria-Bertani
LSC	Leukämische Stammzelle(n)
LTR	Sequenzwiederholung an den Enden retroviraler DNA, (long terminal repeat)
M	Mol pro Liter
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
M-CSF	Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (macrophage colony-stimulating factor)
MEM	Minimal Essential Medium
MEP	Megakaryozyten-Erythrozyten-Progenitor
Min	Minute(n)
MLV	Maus Leukämievirus
MOI	Multiplizität der Infektion (multiplicity of infection)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger RNA)
MTTC	Molekular gezielte Tumorthherapie (molecular targeted therapy of cancer)
nt	Nukleotid(e)
NOD/scid	Mausstamm mit kombinierter Immundefizienz (Non-obese diabetic severe combined immunodeficiency)
OD	Optische Dichte

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PBSC	Periphere Stammzelltransplantation (peripheral stem cell transplantation)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain-reaction)
PGK	Phosphoglycerat-Kinase-Promotor
pH	pH-Wert (potentia Hydrogenii)
PIK3	Phosphoinositolkinase 3
PNH	Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie
pol	kodierende Sequenz für retrovirale Enzyme (Polymerase, Integrase, RNase)
PRE	Rev-responsibles Element (posttranscriptional regulatory element)
RD114/TR	modifiziertes Hüllprotein des Feline Endogenous Virus (FEV), das den zytoplasmatischen Teil des amphotropen MLV-Hüllproteins enthält
rev	kodierende Sequenz des posttranskriptionellen Transaktivators von HIV1
RFP	Rot fluoreszierendes Protein (red fluorescent protein)
RISC	RNA-induzierter Abbaukomplex (RNA-induced silencing complex)
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Medienname: Roswell Park Memorial Institute
RSG	retroviraler Vektor: RetroSUPER-Green fluorescent protein
RSG-SIN	RetroSUPER-Green-Self Inactivating
RSR	retroviraler Vektor: RetroSUPER-Red fluorescent protein
RSR-SIN	RetroSUPER-Red-Self Inactivating
RSV	Rous Sarcoma Virus
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde(n)
SFEM	Serum-Free Expansions Medium
shRNA	Kleine RNA mit Haarnadelstruktur (small hairpin RNA)
SFEM	Serumfree Expansionsmedium
siRNA	Kleine Interferierende RNA (small interfering RNA)
SC	Stammzelle(n), (stem cell)
SCT	Stammzelltransplantation
SUPER	Plasmid, (Suppression of endogenous RNA)
T	Thymidin
t	Translokation
TAE	Tris-Acetat-EDTA

TEL	Transkriptionsfaktor: Translocation Ets Leukemia
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)
U	Standardisierte Einheit (Unit)
V	Volt
VSV	Vesicular-Stomatits Virus
VSV-G	Hüllprotein des Vesicular-Stomatits Virus
wt	Wildtyp
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung ($1 \times g = 9,81 \text{ m/s}^2$)
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein (yellow fluorescent protein)

7. Abbildungsverzeichnis

Abb.1. Myelo- und Lymphopoese	2
Abb.2. Schematische Darstellung des translatierten Bereichs der CEBPA-cDNA	11
Abb.3. Schematische Darstellung des translatierten Bereichs der TEL-cDNA	13
Abb.4. Mechanismus der RNA-Interferenz	14
Abb.5: Darstellung des translatierten Bereichs der CEBPA-cDNA und der ausgewählten Oligonukleotide für die RNA-Interferenz	41
Abb.6: Darstellung des translatierten Bereichs der TEL-cDNA und der ausgewählten Oligonukleotide für die RNA-Interferenz.....	42
Abb.7: Struktur der proviralen DNA der Plasmide pSF/mutCEBPA-eGFP und pSF/mutTEL-eGFP	43
Abb.8: Durchflusszytometrische Analyse der eGFP-Fluoreszenz nach transienter Koexpression von pSF/mutTEL-eGFP mit verschiedenen TEL-siRNAs	44
Abb.10: Darstellung der retroviralen Vektoren RSR/gfp2 und RSR-SIN/gfp2.....	46
Abb.11: Etablierung der Zelllinien SC1/mutCEBPA-YFP bzw. SC1/mutTEL-eGFP für die siRNA-Testung	47
Abb.12: Darstellung der eGFP-Fluoreszenz nach Infektion von SC1/mutTEL-eGFP mit RSR/gfp2 und RSR-SIN/gfp2.....	48
Abb.13: Vergleich von retroviral-exprimierten siRNAs gegen CEBPA mit Hilfe der FACS-Analyse.....	50
Abb.14: Darstellung der Fluoreszenz nach Infektion von SC1/mutCEBPA-YFP mit retroviralen Vektoren, die verschiedene siRNAs gegen CEBPA exprimieren.....	51
Abb.15: Vergleich von retroviral-exprimierten siRNAs gegen TEL mit Hilfe der FACS- Analyse	52
Abb.16: Darstellung der Fluoreszenz nach Infektion von SC1/mutTEL-eGFP Zellen mit retroviralen Vektoren, die verschiedene siRNAs exprimieren	53
Abb.17: Endogenes C/EBP α in verschiedenen Zelllinien	55
Abb.18: Endogenes C/EBP α in HepG2-Zellen nach Infektion mit retroviralen Vektoren, die siRNAs gegen CEBPA exprimieren.	55
Abb.19. Schematischer Ablauf der Versuche mit CD34 ⁺ -Stammzellen	57
Abb.20. Darstellung der CEBPA-Transkriptionslevel in CD34 ⁺ -Zellen nach Transduktion mit RSG-SIN/ceb3 bzw. RSG-SIN.....	58
Abb.21. Oberflächenmarker von verschiedenen Zelltypen der Hämatopoese.....	59

Abb.22: Reduktion von C/EBP α vermindert die Bindung myeloider Marker an hämatopoetischen Vorläuferzellen und erhöht den Anteil erythroider Progenitoren61

Abb.23: Reduktion der C/EBP α -Expression vermindert die Bindung myeloider Marker an hämatopoetischen Vorläuferzellen am 10. und 19.Tag nach Infektion62

Abb.24: Reduktion der C/EBP α -Expression führt am 10. und 19.Tag nach Infektion zu einem erhöhten Anteil von Zellen, die erythroide Marker auf hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimieren63

Abb.25: Ausschnitte aus Zytospins der Flüssigkultur von hämatopoetischen Vorläuferzellen 29 Tage nach Infektion.....65

Abb.26: Ausschnitte aus Zytospins der CFU-C Assay am 15.Tag nach Infektion69

Abb.27: Auszählung der CFU-C Assay von Zytospins: Relative Anteile von Differenzierungsstufen der hämatopoetischen Vorläuferzellen.....70

Abb.28. Ausschnitte aus Zytospins der CFU-C Assay mit G-CSF am 15.Tag nach Infektion.....72

Abb.29. Rolle von C/EBP α bei der humanen Myelopoese79

8. Tabellenverzeichnis

Tab.1. FAB-Subtypen der AML	6
Tab.2. Auflistung aller Oligonukleotide, ihrer Position und der zugehörigen Nukleotidequenzen	19
Tab.3. Adhärente Zelllinien, zugehörige Kulturmedien und Herkunft.....	20
Tab.4. Suspensions-Zelllinien, zugehörige Kulturmedien und Herkunft	21
Tab.5. Antikörper für die FACS-Analyse	22
Tab.6: Auszählung der CFU-C Assay H4434 am 15.Tag nach Infektion.....	67
Tab.7. Auszählung der CFU-C Assay mit G-CSF bzw. GM-CSF	71

9. Publikationen in Verbindung mit dieser Arbeit

Cammenga J, Niebuhr B, Iwanski G, Täger M, Delwel R, and Stocking C:
Dissecting the Molecular Mechanisms of Mutant C/EBP α in normal and malignant
hematopoiesis.

Manuskript in Vorbereitung

Posterbeitrag

Posterpräsentation American Society of Hematology (ASH) 2005

Dissecting the Molecular Mechanisms of Mutant C/EBP α in normal and malignant
hematopoiesis.

Cammenga J., Niebuhr B., Iwanski G., Bergholz B., Täger M., Ziegler M., Roscher S.
and Stocking C.

Heinrich-Pette-Institut at Hamburg University, Dept. of Molecular Pathology, Germany.

10. Danksagung

An erster Stelle danke ich Frau Dr. Carol Stocking für die Überlassung des für mich sehr interessanten Themas, die gemeinsame Planung meiner Doktorarbeit, die stets vorhandene Aufmerksamkeit sowie für viele lehrreiche Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Klaus Harbers danke ich für die kompetente Betreuung dieser Arbeit, sein großes Interesse am Fortschritt der Untersuchungen, seine Unterstützung bei Problemen und für all die zahlreichen spannenden Diskussionen.

Herrn PD Dr. rer. nat. Boris Fehse und Herrn PD Dr. Martin Horstmann danke ich sehr herzlich für die Erstellung der Gutachten.

Ein herzlicher Dank geht an alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Molekulare Pathologie für das freundliche Arbeitsklima und die entgegengebrachte Hilfsbereitschaft. Frau Marion Ziegler, Frau Susanne Roscher, Frau Ulla Bergholz, Frau Birte Niebuhr und Frau Afra Engelmann danke ich für die Unterstützung im Labor, in der Zellkultur und bei meinen Lieblings-Computerprogrammen. Ich danke Herrn Arne Düsedau für die Durchführung der Zellsortierung. Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Stefan Horn, Frau Dr. Meike Täger und Herrn Dr. Daniel Speidel für ihre professionelle Unterstützung und für die lehrreichen Gespräche.

Ein ganz besonderer Dank geht an Herrn Dr. Jürgen Löhler für die lehrreiche Unterstützung bei der Analyse der Zytospins.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie, die mich immer unterstützt und an mich glaubt. Dabei gilt ein ganz besonderer Dank meiner Mutter, Alicja Iwanski, die mich für die Forschung begeistert hat und mir mit ihrer Erfahrung immer zur Seite steht. Ausserdem danke ich meiner Schwester, Kamila Iwanski, für die Hilfe beim Korrekturlesen und viele Tips.

Aus tiefstem Herzen danke ich Nils Thoennissen für all seine liebevolle Unterstützung und das Korrekturlesen. *Danke für dich, Nils..*

Für die Förderung dieser Arbeit bedanke ich mich bei der Werner Otto Stiftung an der Universität Hamburg.

11. Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name : Gabriela Bernadeta Iwanski
Geburtsdatum : 17.03.1979
Geburtsort : Lublin (Polen)
Staatsangehörigkeit : deutsch
Familienstand : ledig
Konfession : römisch-katholisch

SCHULBILDUNG

08/1986 – 06/1990 Besuch der Katholischen Grundschule Farmsen, Hamburg
08/1990 – 06/1999 Besuch des Katholischen Gymnasiums Sophie-Barat, Hamburg

SCHULABSCHLUSS

06/1999 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

STUDIUM

10/1999-10/2006 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg

Dissertation

05/2003- 12/2006 Experimentelle Doktorarbeit:
„Untersuchungen zur Rolle des Transkriptionsfaktors C/EBP α bei der normalen und aberranten Hämatopoese mit Hilfe der RNA-Interferen Methode“
Fr. Dr. C. Stocking und Hr. Prof. K. Harbers
Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie an der Universität Hamburg

Stipendium

10/2003 – 10/2005 Stipendium der Werner Otto Stiftung für junge Nachwuchswissenschaftler in der Medizin an der Universität Hamburg

FORSCHUNGSPRAKTIKA

08/2003 Praktikum im Labor von Prof. Jentsch, Zentrum für Molekulare Neurobiologie, Hamburg
09/2004 Praktikum im Labor für Hepatitisforschung, Prof. Levrero, Universität La Sapienza, Rom, Italien

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, im Dezember 2006

Gabriela Iwanski