Die Funktion von Kainatrezeptoren normaler und maligner hämatopoetischer Vorläuferzellen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Andreas Langer
aus Hamburg

Hamburg, 2003

Für Konrad und Kathrin

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung 1
2. Einleitung 3
2.1. Hämatopoese 3
2.2. Krebs 5
2.3. Vorarbeiten und experimenteller Ansatz 8
2.4. Ionotrope Glutamatrezeptoren 10
2.4.1. Funktionen ionotroper Glutamatrezeptoren 10
2.4.2. Struktur ionotroper Glutamatrezeptoren 12
2.4.3. Regulation ionotroper Glutamatrezeptoren 13
2.5. Signaltransduktionskaskaden 15
2.5.1. Signaltransduktion durch Wachstumsfaktoren 15
2.5.2. Signaltransduktion durch ionotrope Glutamatrezeptoren 18
3. Fragestellung 20
4. Material und Methoden 21
4.1. Material 21
4.1.1. Enzyme und Chemikalien 21
4.1.2. Puffer und Lösungen 21
4.1.3. Medien und Zusätze 23
4.1.4. Plasmide und Vektoren 24
4.1.5. Bakterienstämme 25
4.1.6. Säugetierzellen 25
4.1.7. Oligonukleotide 25
4.2. Methoden 25
4.2.1. Klonierung von DNA 25
4.2.1.1. Enzymatische Manipulation von DNA 25
4.2.1.2. Transfektion von *Escheria coli* 26
4.2.1.3. Präparation von DNA 27
4.2.1.4. Kanamycin-Resistenzgen-Komplementierungs-Technik 30
4.2.1.5. Analyse einer humanen embryonalen cDNA λ-Bibliothek 31
4.2.1.6. Lagerung von *E.coli* Stämmen und Nukleinsäuren 33
4.2.2. Analyse von DNA 33
4.2.2.1. „Southernblot“-Analyse 33

4.2.2.2. Sequenzierung von DNA-Fragmenten 34
4.2.3. Analyse von RNA 34
4.2.3.1. Präparation von Gesamt-RNA aus Säugetierzellen 35
4.2.3.2. PolyA$^+$-mRNA-Isolierung aus Gesamt-RNA 35
4.2.3.3. RT-PCR-Analyse 35
4.2.3.4. „Northernblot“-Analyse 36
4.2.4. „Westernblot“-Analyse 37
4.2.5. TUNEL-Analyse 39
4.2.6. Immunfluoreszenz 39
4.2.7. Zellkultur 40
4.2.7.1. Kultivierung von Säugetierzellen 40
4.2.7.2. Isolierung primärer Knochenmarkstammzellen 40
4.2.7.3. Einfrieren und Lagerung von Zellinien 41
4.2.7.4. Agarklonierung 41
4.2.7.5. Elektrotransformation von GP-*env*AM12-Zellen 41
4.2.7.6. Infektion von TF1-Zellen 41
4.2.8. Kurzzeit-Proliferationsanalysen 42
5. Ergebnisse 43
5.1. Identifikation und Charakterisierung retroviraler Integrationen 43
5.1.1. Klonierung 3´proviral-flankierender Regionen 43
5.1.1.1. *GRIK1*, Mutante 29A 45
5.1.1.2. *NOS3*, Mutante 39/1 47
5.1.1.3. *CCND2*, Mutante 15/3 47
5.1.1.4. *TBK1*, Mutante 19/1 47
5.1.1.5. *E2F1*, Mutante 44/4 48
5.1.1.6. *VTG*1, Mutante 10/1 48
5.1.1.7. VTG4, Mutante 10/1 48
5.1.1.8. AL135778, Mutante 25 48
5.1.2. Transkriptionsanalysen 49
5.2. Funktion von Kainatrezeptoren normaler und maligner hämatopoetischer Vorläuferzellen 52
5.2.1. Endogene Expression myeloischer Kainatrezeptoren 52
5.2.1.1. Klonierung myeloischer Kainatrezeptoren 52

5.2.1.2. Transkription myeloischer Kainatrezeptoren 54
5.2.2. Kainatrezeptor-abhängige Induktion der Apoptose 56
5.2.2.1. Expression von GluR5 und GluR6 nach Wachstumsfaktorentzug..... 57
5.2.2.2. Proliferation nach Wachstumsfaktorentzug 58
5.2.2.3. Induktion der Apoptose..... 59
5.2.3. Kainatrezeptor-abhängige Proliferation von TF1-Zellen 61
5.2.4. Stroma-abhängige Proliferation von TF1-Zellen..... 62
5.2.5. Nachweis von GluR5- und GluR6-Rezeptorkomplexen..... 64
5.2.6. Nachweis von GluR5- und GluR6-Spleißvarianten..... 65
5.2.7. Abrogation der GluR5-abhängigen Apoptose in Hek 293-Zellen..... 69
5.2.8. ΔG5-Expression und Signaltransduktion des GM-CSF-Rezeptors..... 72
5.2.8.1. Transduktion des ΔG5..... 73
5.2.8.2. Expression von GluR5 und GluR6 in Klonen des Typs A und B..... 75
5.2.8.3. GM-CSF Signaltransduktion nach ΔG5-Expression 77
5.3. *loxP*-Expressionsplasmide 78
5.3.1. Konstruktion von *loxP*-Expressionsplasmiden..... 78
5.3.2. Funktionsanalyse von *loxP*-Expressionsplasmiden..... 81
6. Diskussion 82
6.1. Expression und Funktion von Kainatrezeptoren in normalen Blutzellen..... 82
6.2. Abrogation der GluR5-abhängigen Apoptose..... 85
6.3. Alternatives Spleißen 88
6.4. Tumorprogression 89
6.5. Retrovirale Integrationen und Funktionen der identifizierten Gene 91
7. Zitierte Literatur..... 94
8. Häufig verwendete Abkürzungen und Anglizismen 105
9. Anhang..... 106
10. Danksagungen..... 111
11. Lebenslauf 112

1. Zusammenfassung

Wachstumsfaktor-abhängige, hämatopoetische TF1-Vorläuferzellen waren durch Kokultivierung mit Virus-produzierenden Fibroblasten infiziert und anschließend in Abwesenheit des Wachstumsfaktors selektioniert worden. Die retroviralen Integrationen der Wachstumsfaktor-unabhängigen Mutanten wurden analysiert. Zuvor waren Integrationen in die Genloci *GRIK1* (GluR5), *ITPR*3 (Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor Typ 3) und *CCND2* (Cyclin D2) sowie in einen unbekannten Genlokus („virus tagged gene“ 1, *VTG1*) identifiziert worden. Weitere Integrationen in *NOS3* (epitheliale Stickstoffmonooxid-Synthetase), *TBK1* („TANK-binding kinase“ 1), *E2F1* (E2F1-Transkriptions-faktor) und in einer telomeren Region (VTG4) wurden hier nachgewiesen.

Die Analysen zeigten, dass GluR5, Cyclin D2 und *VTG1* unabhängig von der Integration des retroviralen Vektors in allen untersuchten Mutanten transkribiert wurden. Im Gegensatz dazu konnte in der parentalen Zellinie TF1 keine Expression des GluR5 oder *VTG1* und nur eine geringe Transkription des Cyclin D2 beobachtet werden. In TF1-Zellen, die ohne Wachstumsfaktor kultiviert wurden, war die Transkription des GluR5 induziert und des Cyclin D2 deutlich erhöht. Es wird daher vermutet, dass die identifizierten Gene im Rahmen der Selektion der Mutanten aktiviert wurden, der retrovirale Vektor in diese transkriptionell offenen Regionen integrierte und die Gene markiert hatte.

Aufgrund der Transkriptionsunterschiede des GluR5 in parentalen TF1-Zellen und den Mutanten wurde die Funktion des GluR5 und anderer Kainatrezeptoren in normalen und malignen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen untersucht. Es wurde gefunden, dass in den Zellen bereits charakterisierte Kainatrezeptoren, aber auch Rezeptorvarianten mit bisher unveröffentlichten carboxyterminalen 3´Bereichen exprimiert werden.

In klinisch relevanten CD34-positiven Knochenmarkstammzellen wurde die Expression von KA2-, geringen Mengen GluR5- und GluR6-, aber keiner GluR7-mRNAs nachgewiesen. Die kurzzeitige *ex vivo* Kultivierung der Zellen mit Wachstumsfaktoren führte zu einer deutlich erhöhten Transkription des GluR5 bzw. GluR6 und die Transkription des GluR7 wurde induziert.

In kontinuierlich wachsenden myeloischen, humanen TF1- und murinen FDCP1-Vorläuferzellen wurde die Transkription des KA2 und GluR7 beobachtet. Es konnte

nachgewiesen werden, dass die Funktion der beiden Kainatrezeptoren für das Überleben und die Proliferation der Zellen essentiell ist.

Die Expression des GluR5 und GluR6 in TF1- und des GluR5 in FDCP1-Zellen wurde nach Wachstumsfaktorentzug beobachtet. Es wurde nachgewiesen, dass die Funktion des GluR5 in beiden Zellinien für die Induktion der Apoptose verantwortlich ist. Die apoptotische Funktion des GluR5 konnte durch Expressionsanalysen mit Hek 293-Zellen bestätigt werden.

Transkriptionsanalysen wiesen vollständig transkribierte GluR5- und GluR6-mRNAs und ein alternatives Spleißen Kanal-bildender Exone der Rezeptoren in verschiedenen Wachstumsfaktor-unabhängigen Mutanten und in TF1-Zellen, die mit Stromazellen kultiviert wurden, nach. Auch in primären akut myeloischen Leukämiezellen konnte die Transkription des GluR5 und alternativ gespleißter Varianten beobachtet werden.

Expressionsanalysen mit kotransfizierten Hek 293-Zellen zeigten die Kolokalisation alternativ gespleißter GluR5- und GluR6-Varianten mit GluR5 und die Abrogation der GluR5-abhängigen Apoptose. Die Transduktion einer alternativ gespleißten GluR5-Variante ermöglichte die Selektion Wachstumsfaktor-unabhängiger TF1-Zellmutanten. Höchstwahrscheinlich wurden heterodimere ΔG5/GluR5-Komplexe in den Mutanten gebildet, die eine Ausbildung funktioneller nativer GluR5-Komplexe verhinderten. Hierdurch wurde die GluR5-abhängige Induktion der Apoptose abrogiert und die Wachstumsfaktor-unabhängige Proliferation der Mutanten ermöglicht.

Es wurden Gene identifiziert, die eine Rolle in der Regulation der Proliferation, Differenzierung und Apoptose hämatopoetischer Zellen spielen und deren modifizierte Expression, wie im Falle des GluR5, die Progression leukämischer Erkrankungen begünstigen könnte.

2. Einleitung

2.1. Hämatopoese

Pluripotente hämatopoetische Stammzellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie sich selbst reproduzieren („self renewal“) und dass sich aus ihnen alle Zellen des hämatopoetischen Systems entwickeln können (Morrison et al., 1997; Weissman et al., 2001). Die Fähigkeit der Selbst-Reproduktion nimmt in dem Maße ab, in welchem die Zellen in verschiedene multipotente Vorläuferzellen differenzieren (Abb.1). Sie ist in terminal differenzierten Blutzellen nicht mehr nachzuweisen.

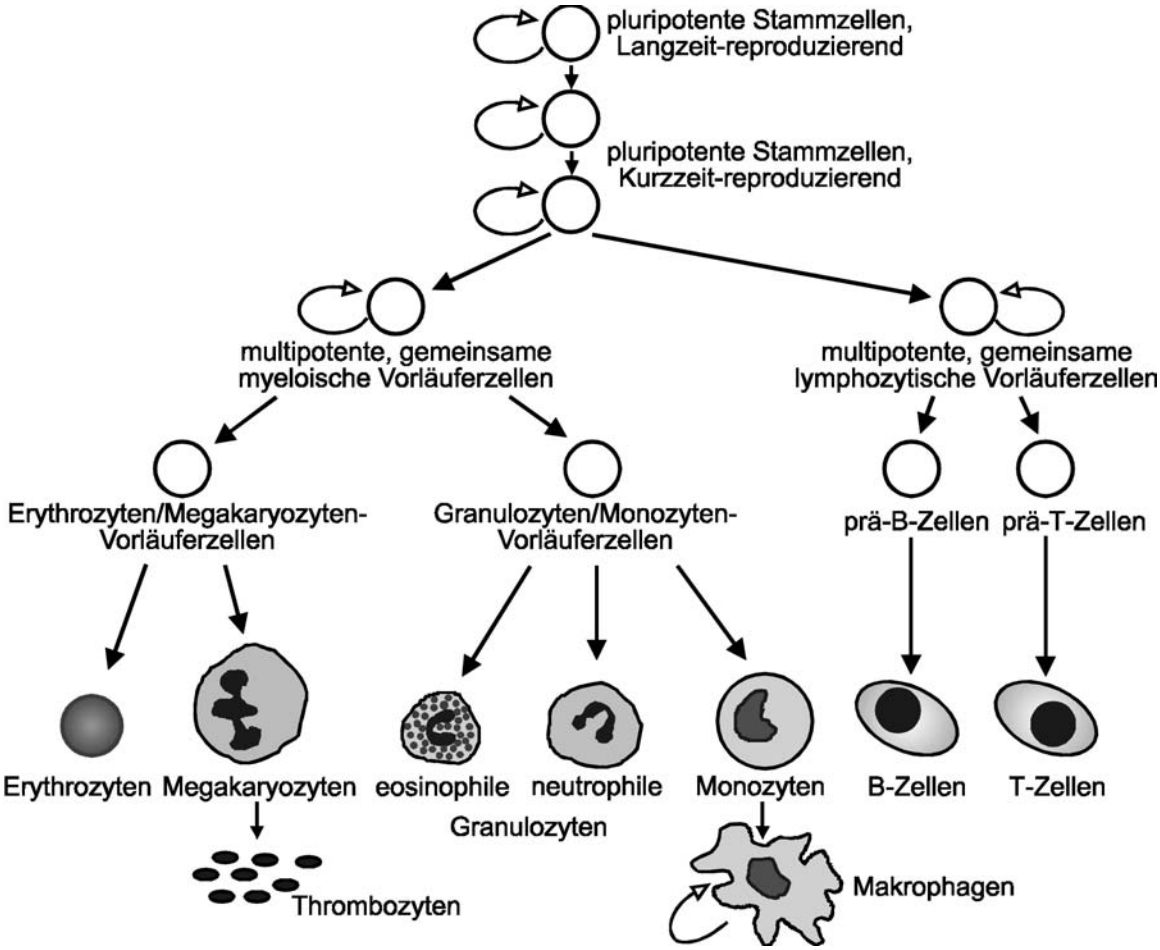


Abbildung 1: Differenzierung hämatopoetischer Zellen
Aus pluripotenten Langzeit-reproduzierenden Stammzellen entstehen im Knochenmark pluripotente Kurzzeit-reproduzierende Stammzellen. Diese Zellen differenzieren in multipotente Vorläuferzellen der myeloischen und lymphozytischen Entwicklungslinie, die z.T. noch Kurzzeit-reproduzierend sind, aber ein eingeschränktes Differenzierungspotential aufweisen. Die myeloischen Vorläuferzellen differenzieren einerseits in Vorläuferzellen der Erythro- und Megakaryozyten/Thrombozyten und andererseits in Vorläuferzellen der Granulozyten und Monozyten/Makrophagen. Aus den lymphozytischen Vorläuferzellen entwickeln sich über prä-B- und prä-T-Zellen teilungsfähige B- und T-Lymphozyten (verändert nach Weissman et al., 2001).

Die Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen wird durch unterschiedliche externe und interne Signale kontrolliert. Abhängig vom Differenzierungsstadium der Zellen erfolgt die Entwicklung in unterschiedlichen Kompartimenten des Knochenmarks. Diese Kompartimente sind durch die Anwesenheit bestimmter Zytokine und Wachstumsfaktoren sowie durch das Stroma des Knochenmarks charakterisiert. Das Stroma ist ein dreidimensionales Netzwerk und besteht aus verschiedenen Zelltypen, der extrazellulären Matrix (ECM) und den Fibroblasten des Stromas (Clark und Keating, 1995). Die Interaktionen der hämatopoetischen Zellen untereinander, wie auch mit den Stromazellen, erfolgen über direkten Zellkontakt durch membrangebundene Moleküle (z.B. Adhesionsmoleküle) sowie durch Zytokine und Wachstumsfaktoren, die von Zellen in die Umgebung abgegeben werden können oder aber selbst membranständig sind. Hierdurch werden membranständige Rezeptoren aktiviert, die unterschiedliche Signaltransduktionskaskaden steuern und die Expression und Aktivität von Transkriptionsfaktoren regulieren. Die basale Aktivität solcher Transkriptionsfaktoren unterliegt wiederum einer strengen zeitlichen und hierarchischen Ordnung.

Aus Knochenmark, Nabelschnurblut und Säugetierembryonen können primäre hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen angereichert werden. Trotz Anwesenheit von Wachstumsfaktoren und/oder Stromazellen können die Zellen *ex vivo* nur kurzfristig kultiviert werden, da ein internes Programm ihre Teilungshäufigkeit limitiert (Morrison et al., 1997). Diese Einschränkung kann durch verschiedene genetische und/oder epigenetische Veränderungen abrogiert werden (Baylin, 1997). Dies ermöglicht die Etablierung von Zellinien. Die Zellen können Differenzierungs-kompetent bleiben und ihre Proliferation kann von Interaktionen mit Stromazellen sowie Zytokinen und Wachstumsfaktoren abhängig sein (Dorshkind, 1990; Cross und Dexter, 1991).

Verschiedene Gene werden spezifisch in hämatopoetischen Stammzellen exprimiert, aber ihre Expression kann auch in neuronalen Stammzellen nachgewiesen werden (Terskikh et al., 2001). Ähnliche genetische Programme sind vermutlich für die Entwicklung des Blutsystems und des Zentralnervensystems (ZNS) verantwortlich. Neuronale Stammzellen differenzieren *in vivo* in unterschiedliche hämatopoetische Zelltypen (Bjornson et al., 1999). Umgekehrt entwickeln sich auch hämatopoetische Stammzellen u.a. in Purkinije-Neurone des Kleinhirns (Priller et al., 2001). Die Untersuchungen zeigen eine Plastizität von Stammzellen unterschiedlicher Gewebe.

2.2. Krebs

Störungen in der Regulation des zellulären Wachstums können zur Entstehung von Krebszellen führen, die ein unbegrenztes Teilungspotential haben (Hanahan und Weinberg, 2000). In normalen Zellen kommt es in Abwesenheit Wachstums-unterstützender Signale zur Induktion der Apoptose. Im Gegensatz dazu sind Krebszellen auch ohne die Stimulierung durch Zytokine, Wachstumsfaktoren und Zell-Zell-Kontakt in der Lage zu proliferieren. Sie sind darüber hinaus unempfindlich gegenüber Signalen, die in normalen Zellen zu einer aktiven Induktion der Apoptose führen (Hanahan und Weinberg, 2000).

Die Aktivierung verschiedener Cystein-Proteasen der CED/ICE-Familie (Caspasen) führt u.a. zur Spaltung von Proteinen der nukleären Lamina sowie des Zytoskeletts und zur Induktion der Apoptose. Die Aktivierung der Caspasen ist u.a. abhängig von einer Translokation des Cytochroms C aus den Mitochondrien in das Zytoplasma. Diese Translokation wiederum wird durch die Aktivität verschiedener Proteine der Bcl-2 Familie reguliert. Homodimere des Apoptose-unterstützenden Bax, die in der Mitochondrienmembran lokalisiert sind, führen zum Einstrom von Ionen in die Mitochondrien und induzieren die Translokation des Cytochrom C. Antiapoptotisch wirkende Proteine, wie Bcl-2 und Bcl-x_L, können mit Bax heterodimerisieren und verhindern dadurch die Translokation. Die Aktivität von Bcl-2 und Bcl-x_L wird in Abwesenheit Wachstums-unterstützender Signale durch Bindung des Apoptose-unterstützenden Bad blockiert. Die Aktivierung von Integrinen durch Zell-Zell-Kontakt oder die Bindung von Zytokinen bzw. Wachstumsfaktoren an ihren jeweiligen Rezeptor führt zur Stimulierung von Phosphatidylinositol 3-OH Kinase (PI3-Kinase), die c-Akt (Proteinkinase B) aktiviert. c-Akt ist in der Lage Bad zu phosphorylieren. Da Bcl-2 und Bcl-x_L von der phosphorylierten Form des Bad nicht gebunden werden, können sie mit Bax heterodimerisieren und dadurch die Translokation der Cytochrom C und die Induktion der Apoptose verhindern.

Die Krebsentstehung stellt einen mehrstufigen Prozess dar, in dem aufeinander folgende Mutationsereignisse eine Abrogation der Apoptose und die Proliferation in Abwesenheit Wachstums-unterstützender Signale ermöglichen (Hunter, 1997; Hanahan und Weinberg, 2000). Mutationen in zellulären Protoonkogene, wie z.B. c-Ras, Raf, c-Src oder PI3-Kinase, können zur konstitutiven Aktivierung Wachstums-unterstützender Signaltransduktionskaskaden führen. Veränderungen in Genen von

Wachstumsfaktor-Rezeptoren können, durch eine konstitutive Aktivierung rezeptorgebundener Protein-Tyrosinkinasen, nachgeschaltete Signaltransduktionskaskaden ebenfalls aktivieren. In beiden Fällen führt dies u.a. zu einer erhöhten Expression zentraler Transkriptionsfaktoren, wie c-Myc, c-Fos und c-Jun, welche die Expression von Genen aktivieren, die in die Regulation des Zellzyklus involviert sind. Trotz Abwesenheit Wachstums-unterstützender Signale ermöglicht die konstitutive Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden die Progression des Zellzyklus.

Mutationen in Bcl-2 und Bax führen direkt zur Blockierung apoptotischer Signalwege. Andere Mutationen können die Aktivität von c-Fos und c-Jun direkt modifizieren und somit zur Tumorentwicklung beitragen. Daneben führen Mutationen in „Tumor-Suppressor"-Genen, die z.B. p53, Rb (Retinoblastoma-Protein) oder den Cyclin-Kinase Inhibitor p16 kodieren, zum Verlust der Funktionen und ermöglichen die unkontrollierte Progression des Zellzyklus. Neben den Mutationen in den oben beschriebenen Genen können auch chromosomale Translokationen zur Tumorentwicklung beitragen. Hierbei werden entweder Fusionsproteine mit veränderter Funktion gebildet oder Gene im falschen Kontext aktiviert, weil sie durch die Translokation in die Nähe eines aktiven Promoters gelangen.

Die gestörte Regulation der Hämatopoese wird als Ursache für die Entwicklung leukämischer Blutzellen angesehen. Die Folge ist ein autonomes Wachstum hämatopoetischer Zellklone (Cross und Dexter, 1991), was einen Selektionsvorteil gegenüber normalen hämatopoetischen Zellen darstellt. Hierdurch wird das normalerweise bestehende Gleichgewicht unterschiedlicher hämatopoetischer Entwicklungslinien gestört. Durch die unkontrollierte Proliferation leukämischer Zellen kommt es einerseits zur Anhäufung Differenzierungs-blockierter Zellen im Knochenmark, während andererseits terminal-differenzierte Zellen der betroffenen Entwicklungslinien fehlen. Je früher diese Störung in der zellulären Hierarchie der Differenzierung auftritt, desto mehr hämatopoetische Zellkompartimente sind betroffen. Entsprechend können unterschiedliche Formen von Leukämien unterschieden werden.

Bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) führt das Wachstum autonomer Zellklone zu einer erhöhten Zahl Differenzierungs-blockierter myeloischer Zellen im Knochenmark (Löwenberg et al., 1993, 1999). An AML erkranken 2-13 von 100000 Erwachsenen in den USA. Eine vorübergehende Erholung (Remission) kann durch eine Chemotherapie erreicht werden, die allerdings oft schwerwiegende Neben-

wirkungen hat. Trotz Therapie werden, mit zunehmenden Alter der Patienten, hohe Rückfallquoten sowie geringe Überlebenschancen beobachtet. Dies erfordert die Identifizierung zusätzlicher diagnostischer Marker und die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze.

In den Zellen von AML-Patienten können verschiedene chromosomale Translokationen nachgewiesen werden, die möglicherweise Ursache für die Erkrankung sind (Look et al., 1997; Löwenberg et al., 1999). Eine der beschriebenen Translokationen (t(8;21)) führt bei 12 % der Patienten zu einer *AML1/ETO*-Fusion (Erickson et al., 1992). *AML1* kodiert die DNA-bindende Domäne des Transkriptionsfaktors AML1-CBFβ. Dieser Faktor reguliert die Expression Hämatopoese-spezifischer Gene und seine Funktion ist für die normale Entwicklung der Blutzellen essentiell. Das kodierte Fusionsprotein ist zwar in der Lage die DNA und den Koaktivator CBFβ zu binden, jedoch unterdrückt die Interaktion des ETO mit einem nukleären Korepressor-Komplex die Transkription einiger Gene in AML-Zellen.

Die CD34-positive myeloische Vorläuferzelllinie TF1 ist eine prototypische AML-Zellinie, die aus einem Patienten mit Erythroleukämie isoliert wurde (Kitamura et al., 1989). Sie ist eine Vorläuferzelle der Erythrozyten, Megakaryozyten sowie Granulozyten/Makrophagen und wächst streng abhängig von Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) oder Interleukin 3 (IL-3). Die Bindung des GM-CSF an seinen Rezeptor ermöglicht das Überleben und die Proliferation der Zellen durch Stimulierung der JAK/STAT- (Janus-Kinasen/„signal transducer and activator of transcription“) und Ras/MAPK- (Ras/„mitogen-activated protein kinases“) Signalkaskaden (Rajotte et al, 1996, Kolonics et al., 2001). Im Gegensatz zu GM-CSF erlaubt die Stimulierung mit Erythropoetin (Epo) nur ein kurzzeitiges Wachstum der Zellen. Allerdings ist Epo in der Lage, die Differenzierung von TF1 in erythroide Vorläuferzellen zu induzieren (Chrétien et al., 1996). Die Induktion der Differenzierung ist dabei unabhängig von der oben beschriebenen Stimulierung der Ras/MAPK-Signalkaskade (Kolonics et al., 2001). In Anwesenheit von GM-CSF entwickeln TF1-Zellen Tumore in Mäusen (Thacker und Hodge, 1994). Eine sehr viel schnellere Tumorentwicklung wurde mit autonom wachsenden Zellklonen beobachtet (Hu et al., 1998).

2.3. Vorarbeiten und experimenteller Ansatz

Die Identifizierung und anschließende Untersuchung fehlerhafter Genfunktionen hat eine zentrale Bedeutung in der Molekularbiologie. Die veränderte Aktivität von Genen kann für die Entwicklung von Krebs verantwortlich sein. Kooperierende Onkogene wurden durch die Komplementation ausgeschalteter Genfunktionen in „knockout"-Mäusen identifiziert (Allen und Berns, 1996). Für bestimmte Fragestellungen ist dieser experimentelle Ansatz jedoch nur bedingt geeignet. 1) Die Ausschaltung zentraler Genfunktionen im gesamten Organismus ist häufig letal. Ihr Effekt kann, wenn überhaupt, nur in embryonalen Entwicklungsstadien oder durch gewebespezifische Manipulation analysiert werden. 2) Die Genregulation im Organismus ist sehr komplex. Eine ausgeschaltete Funktion kann möglicherweise durch andere Gene kompensiert werden. Dies können Gene ähnlicher Funktion, Mitglieder der gleichen Genfamilie oder auch isotypische Genvarianten sein. 3) Die untersuchten genomischen Loci sind oft sehr groß. Daher können meist nur wenige Exone des Gens ausgeschaltet werden. Als Konsequenz kann es zur Expression alternativ gespleißter Genprodukte kommen, dessen potentiell dominant-negativen Mutationseffekte die Analyse des Phänotyps zusätzlich erschweren. 4) Genetische Veränderung in der menschlichen Keimbahn sind aus ethischen Gründen inakzeptabel. Genfunktionen im Menschen werden jedoch in den verwendeten Mausmodellen oft nicht adäquat wiedergespiegelt. 5) Die Etablierung der Mauslinien ist sehr zeit- und materialaufwendig.

Die Zellkultur bietet die Möglichkeit, Genfunktionen in definierten Zellsystemen zu untersuchen. Die Vorteile sind die klonale Homogenität der Zellen und die einfache Manipulation der experimentellen Kulturbedingungen. Etablierte Zellinien wurden in der Vergangenheit verwendet, um die Regulation zellulärer Signaltransduktionskaskaden zu untersuchen. Daneben wurden retrovirale Vektoren in etablierten Zellsystemen eingesetzt, um Gene zu markieren, zu mutieren und ihre Expression zu modifizieren (Friedrich und Soriano, 1993; Jonkers und Berns, 1995). Retrovirale Vektoren integrieren in, für die Integrase zugängliche, transkriptionell offene Regionen des Genoms der Wirtszelle (Whitcomb und Hughes, 1992). Diese Eigenschaft war ausgenutzt worden, um TF1-Zellen durch Kokultivierung mit bestrahlten Virus (M3Pneosup)-produzierenden amphotropen Helferzellen (GAsupFcl3 Fibroblasten) zu infizieren. Infizierte Zellen wurden anschließend in Gegenwart von Geneticin

(G418) aber in Abwesenheit von GM-CSF selektioniert (Stocking et al., 1993). Aus diesen Zellinien waren 3´proviral-flankierende Regionen kloniert und teilweise sequenziert worden (Fehse, 1996; Fehse et al., 1999). Für die Klonierung wurde die Kanamycin-Resistenzgen-Komplementierungs-Technik etabliert und benutzt. Diese Technik erlaubt es, 3´proviral-flankierende Regionen mit hoher Effizienz molekular zu klonieren. Die genomische DNA der Mutanten wird hierzu mit NcoI verdaut und die Fragmente in den entwickelten Plasmidvektor p408 ligiert (Abb. 2).

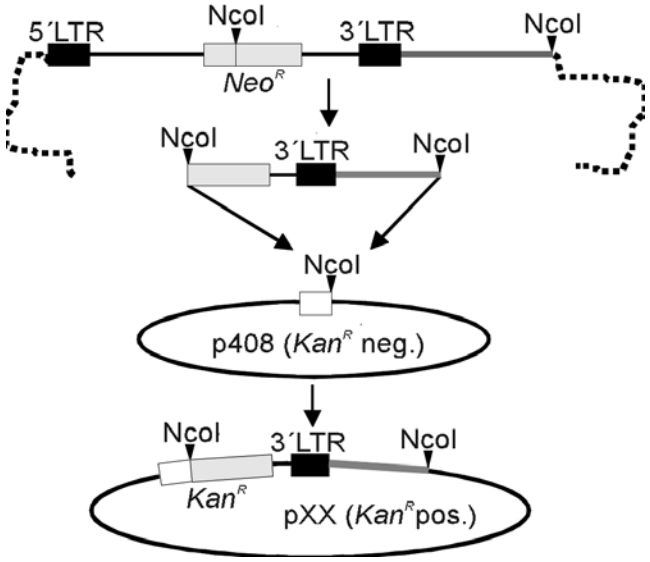


Abbildung 2: Kanamycin-Resistenzgen-Komplementierung
Die Integration des retroviralen Vektors in die genomische DNA und die Klonierung 3´proviral-flankierender Fragmente (grau) ist schematisch dargestellt. Der 5´Bereich des Kanamycinresistenzgens (*Kan*^{R}, weiß), das 3´Ende des Neomycinresistenzgens (*Neo*^{R}, hellgrau) und die LTRs („long terminal repeat“, schwarz) sind gezeigt (aus Fehse et al., 1999).

Hierbei wird der 5´Bereich des Kanamycinresistenzgens (*Kan*^{R}) in p408 durch das 3´Ende des Neomycinresistenzgens (*Neo*^{R}) des proviralen Vektors komplementiert. Bakterien werden mit dem Ligationsansatz transfiziert und können anschließend mit Kanamycin selektioniert werden. Die Plasmid-DNAs verschiedener Klone werden isoliert und die 3´proviral-flankierenden Regionen sequenziert.

Es waren verschiedene retrovirale Integrationen in Wachstumsfaktor-unabhängigen TF1-Mutanten identifiziert worden (Fehse, 1996; Fehse et al., 1999). Die Integrationen erfolgten u.a. in die Genloci *GRIK1* (GluR5), *ITPR*3 (Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor Typ 3) und *CCND2* (Cyclin D2) sowie in einen unbekannten Genlokus („virus tagged gene“ 1, *VTG1*).

2.4. Ionotrope Glutamatrezeptoren

Glutamat ist eine nicht-essentielle Aminosäure und wird als Mediumbestandteil für die Kultivierung hämatopoetischer Zellen eingesetzt. Es ist daneben der natürliche Ligand ionotroper Glutamatrezeptoren, bei denen es sich um Ionenkanäle handelt, die hauptsächlich permeabel für Kalzium- und Natriumionen sind. Die Bindung des Glutamat führt zu einer Änderung der Konformation des Rezeptors und zum Ionentransport. Die Expression verschiedener ionotroper Glutamatrezeptoren wurde in Neuronen und neuronalen Stammzellen (Dingledine et al., 1999), embryonalen Stamm- (Bain et al., 1995) und Carcinomazellen (Turetsky et al., 1993) sowie in Megakaryozyten (Genever et al., 1999) und Lymphozyten (Lombardi et al., 2001) nachgewiesen. Zellen der neuronalen Mikroglia exprimieren ebenfalls ionotrope Glutamatrezeptoren (Noda et al., 2000). Sie haben im Gehirn eine ähnliche immunologische Funktion (Gonzalez-Scarano und Baltuch, 1999) wie die Granulozyten/Makrophagen des hämatopoetischen Systems.

Basierend auf pharmakologischen Untersuchungen mit selektiven Agonisten wird die Rezeptorfamilie in drei verschiedene Klassen unterteilt. Dies sind die N-methyl-D-aspartat (NMDA)-Rezeptoren, die α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isooxazoleproprionat (AMPA)-Rezeptoren und die Kainatrezeptoren. Die Klonierung der Rezeptoren führte zur Identifierung verschiedener Gene und einer Vielzahl alternativ gespleißter und editierter mRNAs. NR1, NR2A-D und NR3A gehören zur Klasse der NMDA-Rezeptoren und GluR1-4 (GluRA-D) zu den AMPA-Rezeptoren. Die Familie der Kainatrezeptoren wird durch die hoch-affinen KA1 und KA2 sowie GluR5, GluR6 und GluR7 gebildet, die eine deutlich geringere Affinität für Kainat aufweisen (Dingledine et al., 1999).

2.4.1. Funktionen ionotroper Glutamatrezeptoren

Im Rahmen der exitatorischen Erregungsfortleitung im ZNS werden präsynaptische Spannungs-abhängige Kalziumkanäle aktiviert. Der Einstrom von Kalziumionen führt zur Freisetzung von Glutamat aus präsynaptischen Vesikeln in den synaptischen Spalt. Glutamat diffundiert zur postsynaptischen Membran und aktiviert dort NMDA- und AMPA-Rezeptoren. Die Aktivität der Rezeptoren führt zur Depolarisation der Membran, der Bildung eines exitatorischen postsynaptischen Potentials (EPSP) und zur Weiterleitung des Nervenimpulses.

Glutamat und andere Agonisten ionotroper Glutamatrezeptoren, wie NMDA und Kainat, können in einigen neuronalen Zellen die Apoptose induzieren (Sastry und Rao, 2000). Die Aktivität der Rezeptoren führt direkt oder indirekt zu einer stark erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentration. Es kommt dadurch zu einer Überladung der Mitochondrien mit Kalzium, was zu massiven Störungen des Energiehaushalts der Zelle und zur Apoptose führen kann (Berridge, 1998). Es werden auch „reactive oxygen species“ (ROS) sowie Stickstoffmonooxidradikale gebildet, die u.a. zu einer Lipidperoxidation führen (Kaul et al. 2001). Darüber hinaus kommt es zur Aktivierung Kalzium-abhängiger Endonukleasen, welche die genomische DNA der Zellen abbauen (Carson und Ribeiro, 1993). In Neuronen des Hippocampus konnte zudem gezeigt werden, dass die Inkubation der Zellen mit Glutamat zu einer Kalzium-abhängigen Aktivierung der Phosphatase Calcineurin führt und die Apoptose induziert wird (Wang et al., 1999). Bad wird von Calcineurin dephosphoryliert, heterodimerisiert mit Bcl-x_L und die Funktion des Bcl-x_L ist blockiert. Es kommt zur Translokation des Cytochrom C und zur Aktivierung von Caspasen.

Die Aktivierung von NMDA- und AMPA-Rezeptoren durch Glutamat ist vermutlich auch an der Entstehung chronischer neurodegenerativer Erkrankungen, wie Chorea Huntington, Parkinson-Syndrom und Alzheimer-Krankheit beteiligt (Meldrum, 2000). Die exzitotoxische Wirkung des Glutamats ist verantwortlich für die Apoptose bestimmter Neuronen des ZNS (Sastry und Rao, 2000). Daneben konnte durch Einsatz selektiver Rezeptorantagonisten demonstriert werden, dass die Aktivität der Rezeptoren eine Rolle im Rahmen der Entstehung zerebraler Ischämie (Schlaganfall), traumatischer Verletzungen des Gehirns und der Epilepsie spielt (Meldrum, 2000). Die Aktivierung von AMPA-Rezeptoren und Kainatrezeptoren durch Glutamat ist auch an der Entstehung der multiplen Sklerose beteiligt (Matute et al., 2001). Bei dieser Erkrankung kommt es aufgrund einer entzündlichen Reaktion zur Degeneration Myelin-produzierender Oligodendrozyten und schließlich der Nervenfasern.

Der moderate Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, hervorgerufen durch die Aktivität ionotroper Glutamatrezeptoren, unterstützt das Überleben kultivierter neuronaler Zellen (Gallo et al., 1987). Daneben spielt Glutamat auch eine wichtige Rolle für die Differenzierung, Migration und das Überleben von Zellen im Rahmen der Entwicklung des ZNS (Meldrum, 2000). So führt die kurzzeitige Blockierung von NMDA-Rezeptoren in späten fötalen oder frühen neonatalen Entwicklungs-

stadien zu einer großflächigen, apoptotischen Neurodegeneration (Ikonomidou et al., 1999). Die Wirkung des Glutamats im Gehirn ist daher vermutlich u.a. abhängig vom untersuchten Zelltypen und synergistischen Effekten durch Wachstumsfaktoren. Während der exzitotoxische Effekt des Glutamats in der sympathisch-neuronalen Zellinie PC12 durch Inkubation mit „nerve growth factor“ (NGF) oder „basic fibroblast growth factor“ (bFGF) deutlich verstärkt wird, blockiert die Kultivierung mit „epidermal growth factor“ (EGF) den Effekt vollständig (Schubert et al., 1992). Die Inkubation mit unterschiedlichen Neurotrophinen reduziert die Kainat-induzierte Exzitotoxizität in Neuronen des Striatum *in vitro* und *in vivo* deutlich (Gratacòs et al., 2001).

2.4.2. Struktur ionotroper Glutamatrezeptoren

Analysen mit verschiedenen heterologen Expressionssystemen zeigen, dass ionotrope Glutamatrezeptoren als oligomere Komplexe wirken. Diese Komplexe bestehen vermutlich aus Tetrameren (Rosenmund et al., 1998; Ayalon und Stern-Bach, 2001). Daneben wird aber auch eine pentamere Struktur der Rezeptorkomplexe diskutiert (Ferrer-Montiel und Montal, 1996). Native Rezeptorkomplexe werden ausschließlich durch Untereinheiten der gleichen Klasse gebildet (Dingledine et al., 1999). Die individuelle Expression des GluR5, GluR6 und GluR7 führt in heterologen Systemen zur Bildung homomerer Rezeptorkomplexe mit Ionenimportfunktionen (Bettler et al., 1990; Egebjerg et al., 1991; Schiffer et al., 1997). Hingegen erlauben KA1- und KA2-Rezeptoren nur in heteromerer Konfiguration mit GluR5, GluR6 oder GluR7 einen Transport von Ionen (Dingledine et al., 1999).

Die Struktur der Untereinheiten verschiedener Rezeptorklassen unterscheidet sich nur unwesentlich. Die Untereinheiten besitzen vier hydrophobe Membrandomänen (M). Während M1, M3 und M4 die Zellmembran vollständig durchziehen, ist die M2 als Schleife an der zytoplasmatischen Seite in die Membran eingelagert (Abb. 3). Die M2-Domänen der oligomerisierten Untereinheiten bilden die Kanalpore nativer Rezeptorkomplexe aus (Sutcliffe et al., 1996). Der N-terminale Bereich der Untereinheiten befindet sich extrazellulär und lässt sich in zwei verschiedene Regionen unterteilen. Die ersten ~400 Aminosäuren werden als extrazelluläre N-terminale Domäne (NTD) bezeichnet. Ein Teil der NTD bildet eine Oligomerisierungsdomäne aus, die für die Ausbildung nativer Rezeptorkomplexe essentiell ist (Kuusinen et al., 1999; Leuschner und Hoch, 1999).

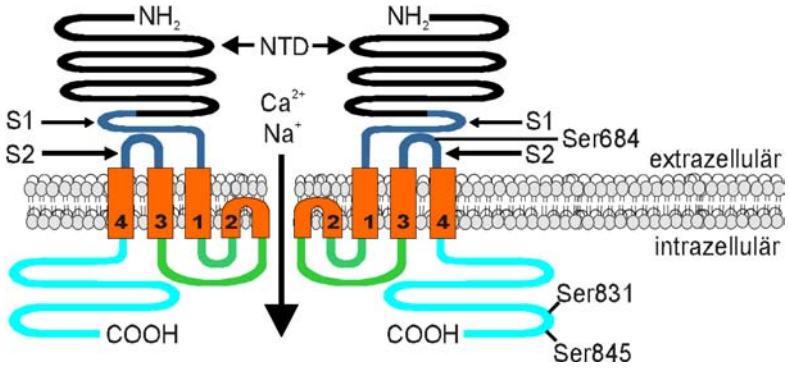


Abbildung 3: Struktur ionotroper Glutamatrezeptor-Untereinheiten
Die Anordnung zweier Untereinheiten in der Zellmembran ist schematisch dargestellt. Die S1- und S2-Domänen, die Membrandomänen 1 bis 4, die extrazelluläre N-terminale Domäne (NTD) sowie der intrazelluläre carboxyterminale Bereich sind nach derzeitiger Modellvorstellung angeordnet (Dingledine et al., 1999). Identifizierte Phosphorylierungsorte des AMPA-Rezeptors GluR1 (Ser831, Ser845) und des Kainatrezeptors GluR6 (Ser684) sind angegeben.

Die folgenden ~150 Aminosäuren der NTD werden als S1-Domäne bezeichnet. Die S1-Domäne bildet zusammen mit dem N-terminalen Bereich der S2-Domäne die Bindungsstelle des Liganden (Stern-Bach at al., 1994; Kuusinen et al., 1995). Die S2-Domäne befindet sich extrazellulär zwischen M3 und M4 und ihr carboxyterminaler Bereich ist ebenfalls an der Oligomerisierung der Untereinheiten beteiligt (Ayalon und Stern-Bach, 2001). Die carboxyterminalen Bereiche der Untereinheiten befinden sich intrazellulär und ermöglicht u.a. die korrekte Anordnung der Untereinheiten in der Zellmembran (Sheng und Pak, 2000).

2.4.3. Regulation ionotroper Glutamatrezeptoren

Die verschiedenen Untereinheiten und die alternativ gespleißten Rezeptorvarianten weisen sehr unterschiedliche pharmakologische und elektrophysiologische Eigenschaften auf (Dingledine et al., 1999). Ihre Kombination bedingt die Aktivität nativer Rezeptorkomplexe. Die Funktion kann durch zusätzliche posttranskriptionelle („RNA-editing“) oder posttranslationale (Phosphorylierung) Modifikationen moduliert werden. Es können also eine Vielzahl nativer Rezeptorkomplexe gebildet werden, die ganz unterschiedliche Ionenimportfunktionen aufweisen. Die Bildung solcher Rezeptorkomplexe ist abhängig von dem Zelltyp, Differenzierungsgrad der Zelle und ontogenetischen Entwicklungsstadium.

Das alternative Spleißen von prä-mRNAs ist ein vielseitiger Mechanismus, der es

ermöglicht unterschiedlich funktionelle Produkte eines Gens zu generieren (Smith und Valcárcel, 2000). Die Synthese eukaryontischer prä-mRNAs erfolgt zumeist durch komplexe Transkriptionseinheiten. In ihnen kann die prä-mRNA an verschiedenen Terminationsorten gespaltet und polyadenyliert werden. Es entstehen mRNAs mit unterschiedlichen 3´Enden. Durch ein alternatives Spleißen interner Exone kann sich die Anzahl möglicher Varianten einer komplexen Transkriptionseinheit weiter erhöhen. Verschiedene Studien lassen vermuten, dass regulatorische Regionen der RNA, gemeinsam mit zellspezifischen Faktoren des Spleißapparats, die Aktivität unterschiedlicher 5´- und 3´-Spleißorte und das alternative Spleißen kontrollieren (Grabowski, 1998; Blencowe, 2000). Sie ermöglichen z.B. die positive Selektion neuronaler und die negative Selektion nicht-neuronaler Exone (Grabowski, 1998). Ein Beispiel für regulatorische Bereiche der RNA sind exonische Spleiß-Verstärker („exonic splicing enhancer“, ESE; Blencowe, 2000). Die DNA-Sequenzen der ESE sind sehr variabel und können von verschiedenen Spleißfaktoren der SR-Proteinfamilie (Serin-, Arginin-reich) gebunden werden. Der zellspezifische Spleißvorgang wird vermutlich durch die Bindung einer Vielzahl unterschiedlicher SR-Proteine an spezifische ESE kontrolliert. Im Falle ionotroper Glutamatrezeptoren führt das alternative Spleißen in erster Linie zu Untereinheiten mit unterschiedlichen carboxyterminalen Bereichen. Aus neuronalen Zellen wurden bisher vier verschiedene GluR5- und jeweils zwei verschiedene GluR6- und GluR7-Isoformen kloniert (Dingledine et al., 1999). Daneben ist für AMPA-Rezeptoren auch ein alternatives Spleißen interner Exone nachgewiesen worden (Sommer et al., 1990). Jede der bekannten Untereinheiten liegt in zwei verschiedenen Isoformen vor (Flip/Flop). Diese unterscheiden sich in ihren Kanaleigenschaften und werden während der Ontogenese zeitlich unterschiedlich exprimiert.

Die posttranskriptionelle Modifikation der mRNA („editing“) wurde bei AMPA-Rezeptoren und Kainatrezeptoren beobachtet (Sommer et al., 1991). Die Aktivität der dsRNA-Adenosin-Desaminase ermöglicht die Desaminierung spezifischer Adenosine zu Inosinen. Dies führt zu veränderten Kodons der mRNAs und zu Aminosäureaustäuschen in den translatierten Proteinen. Da in erster Linie eine Position in der Kanal-bildenden M2-Domäne editiert wird, führt dies zur Modifikation der physikalischen Eigenschaften der Kanalpore (Dingledine et al., 1999). Der Anteil editierter mRNAs ist ebenfalls abhängig vom Zelltyp, Differenzierungsgrad der Zelle und

ontogenetischen Entwicklungsstadium.

Die Funktion ionotroper Glutamatrezeptoren kann durch Phosphorylierungen reguliert werden. Darüber hinaus scheint ein basales Niveau der Phosphorylierung für die Aufrechterhaltung der Rezeptorfunktionen nötig zu sein (Dingledine et al., 1999). Ionotrope Glutamatrezeptoren werden u.a. durch Proteinkinase A und C (PKA, PKC) und Ca^{2+}/Calmodulin-abhängige Kinase 2 (CaMKII) phosphoryliert. Die Phosphorylierung des AMPA-Rezeptoren erfolgt zumeist zwischen M3 und M4 (Yakel et al., 1995). Der Kainatrezeptor GluR6 wird ebenfalls in diesem Bereich (Ser684; Abb. 3) durch PKA phosphoryliert und hat dadurch eine erhöhte Aktivität (Raymond et al., 1993). Daneben konnten Phosphorylierungen im carboxyterminalen Bereich des AMPA-Rezeptors GluR1 nachgewiesen werden (Roche et al., 1996, Barria et al., 1997). Auch hier führt die Phosphorylierung des Serin831 (PKC und/oder CaMKII) und Serin845 (PKA) zu einer erhöhten Aktivität des Rezeptors.

2.5. Signaltransduktionskaskaden

Eine Vielzahl extra- und intrazellulärer Signale reguliert die Proliferation, Differenzierung und Apoptose hämatopoetischer und anderer Zellen. Diese werden durch die Aktivierung unterschiedlicher intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden vermittelt.

2.5.1. Signaltransduktion durch Wachstumsfaktoren

Die Bindung von Wachstumsfaktoren an membranständige Rezeptoren ist der erste Schritt in der Transduktion Wachstums-unterstützender Signale in die Zelle. Sie führt zur Dimerisierung der Rezeptor-Untereinheiten und zur Aktivierung verschiedener Proteinkinasen (Abb. 4). Protein-Tyrosinkinasen (PTK), die an Rezeptoren gebunden sind, aktivieren Adaptormoleküle (u.a. Grb2, SOS), was zur Stimulierung von Ras/Raf und zur Phosphorylierung von MEK (MAPK/ERK Kinasen) sowie MAPK führt. Die phosphorylierte Form der MAPK kann in den Zellkern translozieren, dort Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und damit die Expression unterschiedlicher Gene aktivieren. Im Gegensatz dazu führt die Aktivierung zytoplasmatischer Serin/Threonin-Kinasen, den Janus-Kinasen (JAK), direkt zur Phosphorylierung spezifischer Transkriptionsfaktoren im Zytoplasma (STATs), die daraufhin in den Zellkern translozieren und dort die Genexpression aktivieren (Ihle und Kerr, 1995).

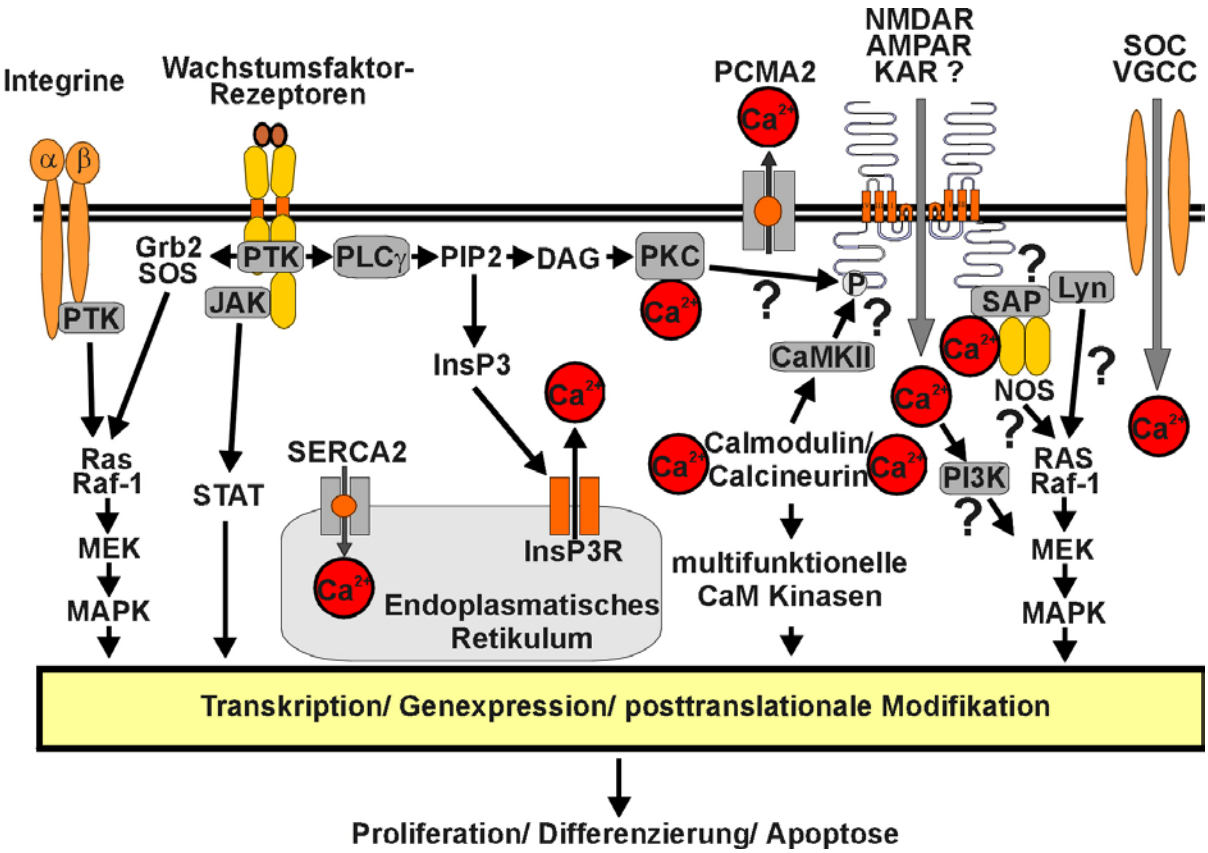


Abbildung 4: Signaltransduktion durch Wachstumsfaktoren und ionotrope Glutamatrezeptoren
Erläuterung im Text. Bisher nicht in hämatopoetischen, aber in verschiedenen neuronalen Zellen nachgewiesen und daher durch ein Fragezeichen gekennzeichnet, sind: die Expression von Kainatrezeptoren (KAR); die Interaktion ionotroper Glutamatrezeptoren mit SAP; die Kalzium-abhängige bzw. -unabhängige Aktivierung von Ras durch NOS bzw. Lyn; die Kalzium-abhängige Aktivierung von MEK durch PI3K sowie die Phosphorylierung ionotroper Glutamatrezeptoren durch PKC und CaMKII. Abkürzungen siehe Text und: NMDAR/AMPAR- NMDA- bzw. AMPA-Rezeptoren, PTK- Protein-Tyrosinkinasen, PLCγ- Phopholipase Cγ, InsP3- Inositol-1,4,5-Trisphosphat, PCMA2- Plasmamembran Ca^{2+}-ATPase (Typ 2), SERCA2- Sarkoplasmatisches Retikulum Ca^{2+}-ATPase (Typ 2), PIP2- Phosphatidyl-inositol-diphosphat, VGCC- „voltage-gated calcium channels“, SOC- „store-operated channels“, SAP- Synapsen-assoziierte Proteine (verändert nach Clapham, 1995; Hanahan und Weinberg, 2000).

Daneben können durch die Expression unterschiedlicher Integrine an der Zelloberfläche, Proteine der ECM oder Integrine anderer Zellen (Zell-Zell-Kontakt) gebunden werden. Dadurch kommt es zur Aktivierung zytoplasmatischer PTK (Shc, Fyn), die ebenfalls in der Lage sind die Ras/MAPK-Signalkaskade zu aktivieren.

Neben der Aktivität der oben beschriebenen Signaltransduktionskaskaden ist die Regulation der Konzentration des intrazellulären Botenstoffs Kalzium von zentraler Bedeutung. Der Kalziumeinstrom in das Zytoplasma wird sehr streng kontrolliert und

erfolgt über Kanäle aus zwei Hauptreservoirs, dem extrazellulären Raum und dem endoplasmatischem Retikulum (ER). Gegenwärtige Modelle gehen davon aus, dass die Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptoren (InsP3Rs) für die initiale Erhöhung der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration verantwortlich sind (Clapham, 1995). Die Bindung der Wachstumsfaktoren an ihren Rezeptor und die anschließende Aktivierung rezeptorgebundener PTK führt hierbei zur Stimulierung der Phospholipase Cγ und zur Spaltung von membrangebundenem Phosphatidylinositol-diphosphat in Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Trisphosphat (InsP3). InsP3 diffundiert zum ER, bindet an die InsP3Rs und öffnet die Kanäle. Die Erhöhung der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration ist nur kurzzeitig, da das Kalzium durch Ca^{2+}-ATPasen (u.a. PCMA2, SERCA2) in den extrazellulären Raum oder zurück in das ER transportiert wird. Eine länger andauernde bzw. zusätzliche Erhöhung der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration kann durch die Aktivierung der „store-operated channels“ (SOC; Jaconi et al., 1997) erreicht werden, die zu einem Einstrom extrazellulären Kalziums führt. Daneben kann die zytoplasmatische Kalziumkonzentration auch durch die Aktivierung Spannungs-abhängiger Kalziumkanäle („voltage-gated calcium channels“, VGCC; Lewis und Cahalan, 1995), von NMDA-Rezeptoren (Genever et al., 1999) und möglicherweise auch von AMPA-Rezeptoren sowie Kainatrezeptoren erhöht werden.

Die zytoplasmatische Kalziumkonzentration beeinflusst die Aktivität regulatorischer Schlüsselenzyme, wie u.a. PKC, Ca^{2+}/CaM-abhängiger Proteinkinasen (CaMK) und der Ca^{2+}/CaM-abhängigen Adenylatzyklase, die wiederum in der Lage ist, PKA zu aktivieren. Alle diese Proteinkinasen können CREB („cAMP response element-binding“-Protein) phosphorylieren. Phosphoryliertes CREB bindet an das Kalzium/cAMP-responsive Element in den Promotoren verschiedener Gene. Durch die anschließende Interaktion des gebundenen CREB mit seinem Koaktivator CBP (CREB-bindendes Protein) wird u.a. die Expression des Transkriptionsfaktors c-Fos aktiviert. c-Fos bildet zusammen mit dem Transkriptionsfaktor c-Jun Heterodimere, die Bestandteil des AP-1 Transkriptionskomplexes sind. Daneben ermöglicht die Stimulierung Kalzium-abhängiger Phosphatasen (Calcineurine) u.a. die Translokation des dephosphorylierten Transkriptionsfaktors NF-AT („nuclear factor of activated T cells“) in den Nukleus (Crabtree, 1999). In neuronalen Zellen wird die Ras/MAPK-Signalkaskade durch eine erhöhte Kalziumkonzentration, aufgrund der Aktivität von

VGCC, stimuliert (Rosen und Greenberg, 1996).

2.5.2. Signaltransduktion durch ionotrope Glutamatrezeptoren

Neuronale Glutamatrezeptoren sind in postsynaptischen Regionen konzentriert („postsynaptic densities“, PSD). In den PSD können auch verschiedene Signalmoleküle, Komponenten des Zytoskeletts und Mitglieder der SAP90-Familie (Synapsen-assoziierte Proteine, SAP) nachgewiesen werden. SAP binden an die carboxyterminalen Bereiche ionotroper Glutamatrezeptoren und diese Interaktion ist für ihre korrekte Anordnung der Rezeptoren in der Membran essentiell (Sheng und Pak, 2000). Daneben sind SAP durch ihre unterschiedlichen Domänen in der Lage eine Vielzahl weiterer Proteine zu binden. Als zentrales Adapter-Protein bilden sie ein Netzwerk in den PSD aus, in dem Glutamatrezeptoren untereinander („clustering“) und mit Elementen des Zytoskeletts verbunden sind.

Vermutlich ermöglicht die Assoziation der Glutamatrezeptoren mit verschiedenen SAP die Interaktion der Rezeptoren mit nicht-rezeptorgebundenen PTK der Src-Familie (Lyn, Fyn) und anderen Ras-Effektoren, die auch durch SAP gebunden werden können (Sheng und Pak, 2000; Abb. 4). Lyn ist in primären Nervenzellen physikalisch mit AMPA-Rezeptoren assoziiert und sie kann durch Inkubation mit dem Rezeptoragonisten AMPA aktiviert werden (Hayashi et al., 1999). Die Aktivierung ist unabhängig von der Ausbildung funktioneller Ionenkanäle oder einer erhöhten zytoplasmatischen Kalzium- bzw. Natriumkonzentration. Sie führt zu Stimulierung der Ras/MAPK-Signalkaskade und zur Expression des BNDF-Gens („brain-derived neurotropic factor“).

In Neuronen führt die Ionenimportfunktion der Glutamatrezeptoren zur Aktivierung Kalzium-abhängiger Signaltransduktionskaskaden. Die Stimulierung von NMDA-Rezeptoren aktiviert Kalzium-abhängig die neuronale Stickstoffmonooxid-Synthetase (nNOS) in primären Neuronen (Yun et al., 1998). Vermutlich ist nNOS ebenfalls durch SAP mit dem Rezeptor assoziiert, so dass eine hohe lokale Kalziumkonzentration die Synthese des NO ermöglicht und schließlich zur Stimulierung der Ras/MAPK-Signalkaskade durch NO führt.

Die Kultivierung primärer Vorläuferzellen der neuronalen Mikroglia (Oligodendrozyten) mit Kainat führt zur Aktivierung der PKC und zur Kalzium-abhängigen Phosphorylierung von MAPK (Pende et al., 1997). Die Autoren nehmen an, dass die

Aktivität der PKC Signaltransduktionskaskaden induziert, die zur Stimulierung der MAPK und zur Phosphorylierung von CREB führen. Die Stimulierung der MAPK ist in diesem Falle nämlich unabhängig von der Aktivität des Ras. Eine Phosphorylierung des CREB und die induzierte Expression von c-Fos kann in primären neuronalen Zellen durch Antagonisten spezifisch für NMDA-Rezeptoren oder spezifisch für AMPA-Rezeptoren und Kainatrezeptoren blockiert werden (Schurov et al., 1999).

Perkinton et al. (1999, 2002) konnten zeigen, dass die Stimulierung der MAPK-Signalkaskade durch NMDA- und AMPA-Rezeptoren abhängig von der Aktivierung der PI3-Kinase durch Kalzium ist. Für die Stimulierung der Kaskade in primären Neuronen des Striatum wird zusätzlich die Aktivität eines bisher unbekannten heterotrimeren G-Proteins benötigt. Daneben wird die Aktivierung der Kaskade durch CaMKII und einer nicht-rezeptorgebundenen Src-Kinase moduliert.

Verschiedene Untersuchungen zeigen also, dass die Signaltransduktion durch ionotrope Glutamatrezeptoren in Neuronen sehr komplex ist. Neben der Kalzium-abhängigen Aktivierung von nNOS, PKC und PI3-Kinase konnte auch eine Kalzium-unabhängige Aktivierung der Src-Kinase Lyn durch ionotrope Glutamatrezeptoren nachgewiesen werden. Die MAPK wird durch die Aktivität dieser Enzyme stimuliert. Sie ist somit, neben dem sekundären Botenstoff Kalzium, ein zentraler Bestandteil der Signaltransduktion durch Wachstums-unterstützende Signale und ionotrope Glutamatrezeptoren. Daneben sind Kalzium-abhängige Proteinkinasen, wie PKC und CaMKII, nicht nur in die Signaltransduktion neuronaler Glutamatrezeptoren involviert, sondern auch in der Lage die Aktivität der Rezeptoren durch Phosphorylierungen zu regulieren. Die Aktivierung der PKC ist abhängig von DAG (Abb.4) und wird somit indirekt auch von der Stimulierung der Zellen durch Wachstumsfaktoren beeinflusst.

3. Fragestellung

Die Wachstumsfaktor-unabhängige Proliferation hämatopoetischer Zellen ist ein wichtiges Charakteristikum der akuten myeloischen Leukämie. In der vorliegenden Arbeit soll zunächst die Frage beantwortet werden, ob die mutagene Eigenschaft der retroviralen Integration die Ursache für die Abrogation der Wachstumsfaktor-Abhängigkeit in den Mutanten ist und ob solche mutierten Gene die Progression akuter myeloischer Leukämien fördern. Die zuvor identifizierten retroviralen Integrationen wurden deshalb mit Hilfe neu veröffentlichter DNA Sequenzen näher charakterisiert.

Daneben lies die retrovirale Integration im Gen des GluR5 vermuten, dass die Regulation dieser Genfunktion eine Rolle in der Abrogation der Wachstumsfaktor-Abhängigkeit spielt. Daher wird die Expression und Funktion des GluR5 und anderer Kainatrezeptoren in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen sowie Wachstumsfaktor-unabhängigen Mutanten beschrieben. Es sollte darüber hinaus geklärt werden, ob diese Rezeptoren eine Funktion für die Regulation der Proliferation, Differenzierung und Apoptose hämatopoetischer Vorläuferzellen haben. Schließlich soll beantwortet werden, ob der skizzierte experimentelle Ansatz es grundsätzlich ermöglicht Gene zu identifizieren, die für die Tumorentwicklung relevant sind.

4. Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1. Enzyme und Chemikalien

Die verwendeten Enzyme und einige Reaktionspuffer wurden bezogen von Amersham Pharmacia Biotech Europe (Freiburg), ICN Biomedicals (Eschwege), Life Technologies (Karlsruhe), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Frankfurt), Perkin Elmer Applied Biosystems (PE, Weiterstadt), Promega Deutschland (Mannheim), Qiagen (Hilden), Roche Diagnostics (Mannheim) und Stratagene Europe (Amsterdam, Niederlande).

Die Kulturmedien für Bakterien und Säugetierzellen wurden bezogen von Difco Laboratories (Detroit, USA), ICN Biomedicals, Life Technologies und Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen). Alle weiteren Chemikalien lieferten die Firmen Merck (Darmstadt), SERVA Electrophoresis (Heidelberg), Sigma-Aldrich und WAK-Chemie Medical (Bad Soden).

4.1.2. Puffer und Lösungen

Alle Puffer, Lösungen und Medien wurden mit zweifach destilliertem Wasser hergestellt und soweit nicht anders angegeben bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

1 M Tris-HCl:	121 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan wurde in 800 ml gelöst, der gewünschte pH Wert mit konzentrierter HCl eingestellt, die Lösung bis 1 l aufgefüllt und autoklaviert.
6x BPB-Puffer:	60 % Glycerol, 60 mM Na_2EDTA, 0,2 % Bromphenolblau (BPB); Lagerung bei 4°C
TAE-Puffer:	40 mM Tris-Acetat, 2 mM Na_2EDTA
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM Na_2EDTA; autoklaviert
10x PBS:	1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 43 mM Na_2HPO_4, 14 mM KH_2PO_4
10x MOPS:	400 mM 3-Morpholinopropansulfonsäure, 100 mM Natriumacetat (pH 7), 10 mM Na_2EDTA; Lagerung (lichtgeschützt) bei 4°C
20x SSC:	3 M NaCl, 0,3 M tri-Natriumcitrat (pH 7); autoklaviert
DNA-Lysispuffer:	10 mM Tris-HCl (pH 8,2), 400 mM NaCl, 2 mM Na_2EDTA, 0,5 % SDS, 100 µg/ml Proteinase K (Roche)
„Northern“-Puffer:	1x MOPS, 250 mM Formaldehyd

5x RNA-Puffer: 5x MOPS, 0,1 % BPB, 4 mM Na_2EDTA, 16 mM Formaldehyd, 20 % Glycerol, 13,9 mM Formamid (deionisiert); Lagerung bei 4°C

Puffer A: 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM Na_2EDTA, 1 mM Pefabloc (Roche), 1 mM PMSF (Merk), 200 U/ml Aprotinin (ICN)

Puffer B: 1x PBS, 0,05 % Tween 20, 10 % Milchpulver

5x SDS-Puffer: 250 mM Tris-HCl (pH 6,8), 5 % SDS, 10 % Glycerin, 0,1 % BPB; Lagerung bei 4°C

10 % SDS: 50 g SDS wurde gelöst (68°C), die Lösung bis 500 ml aufgefüllt.

Transferpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,2 % SDS, 20 % Methanol

SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS

BrdUTP: 2 mM BrdUTP (Sigma-Aldrich) in 50 mM Tris-HCl (pH 7,5); Lagerung bei -20°C

Lösung 1: 50 mM Glukose, 10 mM Na_2EDTA, 25 mM Tris-HCl (pH 8), 4 mg/ml Lysozym; Lagerung bei 4°C

Lösung 2: 0,2 N NaOH, 1 % SDS; frisch angesetzt

Lösung 3: 3 M Natriumacetat (pH 4,8)

RNAse A: Ribonuklease A aus Rinderpankreas (Roche) wurde gelöst (1 mg/ml), 2 min aufgekocht und portioniert; Lagerung bei -20°C

DNQX: DNQX (100 mM) wurde in DMSO gelöst, Lagerung -20°C

DEPC-Wasser: Wasser wurde mit Diethylpyrocarbonat versetzt (0,1 %), über Nacht bei 37°C inkubiert und autoklaviert.

50x Denhardt: 1 % (w/v) Ficoll 400, 1 % (w/v) Polyvinylpolypyrrolidon, 10 mg/ml BSA Fraktion V; Lagerung bei -20°C

4x Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,4 % SDS; Lagerung bei 4°C

4x Trenngelpuffer: 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,4 % SDS; Lagerung bei 4°C

Hybridisierungslösungen:

„Southernblot“: Wasser (22 ml), 20x SSC (15 ml), 10 % SDS (2,5 ml), 50x Denhardt (2,5 ml), 50 % Dextransulfat (8 ml); Lagerung bei -20°C

„Northernblot”: Wasser (11 ml), 20x SSC (25 ml), 10 % SDS (10 ml), 50x Denhardt (10 ml), deionisiertes Formamid (44 ml); Lagerung bei -20°C

Lambda: Wasser (27,5 ml), 20x SSC (15 ml), 10 % SDS (2,5 ml), 50x Denhardt (5 ml); Lagerung bei -20°C

Herstellung von Heringssperma-DNA

Heringssperma-DNA (HS, 600 mg) wurde in 20 ml Wasser (100°C) gelöst, mit einer Kanüle durch mehrmaliges Pipettieren geschert und nach Zugabe von 100 µl Proteinase K (10 mg/ml) 30 min bei 37°C inkubiert. Sie wurde phenolisiert, gefällt und in 5 ml Wasser gelöst. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bestimmt. Sie wurde auf 10 mg/ml eingestellt, die DNA portioniert und bei -20°C gelagert.

Äquilibrierung von Phenol

Frisch destilliertes, kristallines Phenol (Merck) wurde mit 0,1 % 8-Hydrochinolin geschmolzen (68°C). Durch Rühren wurde es mit 1 Volumen 1 M Tris-HCl (pH 8) über Nacht (ü.N.) äquilibriert. Die Äquilibrierung wurde mit 1 Volumen 0,1 M Tris-HCl (pH 8) so lange wiederholt, bis der pH Wert des Phenols 7,6 betrug. Das Phenol wurde bis zu einem Monat bei 4°C unter TE-Puffer gelagert.

Herstellung von deionisiertem Formamid

Formamid (250 ml, Merck) wurde 2-3 h durch Rühren mit 10-15 g Typ AG 501-X8(D) Mixed Bed Resin (20-50 mesh, Bio-Rad Laboratories, München) deionisiert. Es wurde mit 3 MM Whatman Papier filtriert, portioniert und bei -20°C gelagert.

Herstellung von Acrylamidlösung

30 g Acrylamid (Merck) und 0,8 g Bisacylamid (SERVA) wurden in 100 ml Wasser gelöst und 1-2 h entgast. Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt bei 4°C.

4.1.3. Medien und Zusätze

a) Medien für Bakterien:

LB: 50 g Bacto-Trypton, 25 g Hefe-Extrakt und 50 g NaCl wurden in 5 l gelöst, der pH Wert mit 5 N NaOH auf 7,2 eingestellt und autoklaviert.

SOB: 10 g Bacto-Trypton, 2,5 g Hefe-Extrakt und 0,25 g NaCl wurden in 500 ml gelöst, der pH Wert mit 5 N NaOH auf 7,2 eingestellt und autoklaviert.

SOC: 98 ml SOB-Medium wurde mit 1 ml 1 M $MgCl_2$/0,5 M $MgSO_4$-Lösung und 1 ml steril filtrierter (0,22 µM Millex-GS Filter, Millipore, Eschborn) 2 M Glukoselösung versetzt und anschließend erneut steril filtriert.

SM 2,9 g NaCl und 1 g $MgSO_4$ wurden mit 25 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,5), 2,5 ml 2 %-iger Gelatine und 472,5 ml Wasser gelöst.

Ampicillin: Ampicillin (50 mg/ml) wurde unter Zusatz geringer Menge NaOH gelöst, portioniert und bei -20°C gelagert.

Kanamycin: Kanamycin (50 mg/ml) wurde gelöst, portioniert und bei -20°C gelagert.

Agarplatten: 7,5 g Bacto-Agar (Difco) wurde in 500 ml LB-Medium autoklaviert. Nach Abkühlen auf 60°C wurde Ampicillin (50 µg/ml) und/oder Kanamycin (100 µg/ml) dazugegeben und die Platten gegossen.

Top-Agar: 3,5 g Bacto-Agar (Difco) wurde in 500 ml LB-Medium autoklaviert.

b) Medien für Säugetierzellen:

DMEM: Dulbecco´s modifiziertes „Eagle"-Medium (ICN), 10 % FKS (Life Tech.), 45 mM Natriumhydrogencarbonat, 2 mM Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, Penicillin (50 U/ml) und Streptomycin (50 µg/ml; beide Life Tech.).

MEM: Minimal essentielles „Eagle"-Medium (Sigma-Aldrich), 10 % FKS, 9 mM Natriumhydrogencarbonat, 2 mM Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, Penicillin und Streptomycin (Konzentrationen wie oben).

αMEM: αMEM (Life Tech.), 15 % Pferdeserum (PAN Systems, Aidenbach), 2 mM Glutamin, Penicillin und Streptomycin (Konzentrationen wie oben).

RPMI: RPMI 1640 (Life Tech.), 10 % FKS, 2 mM Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, Penicillin und Streptomycin (Konzentrationen wie oben).

Geneticin: Geneticin (40 mg/ml; Life Tech.) wurde in Wasser gelöst und steril filtriert

Trypsin/EDTA: 10x Trypsin/EDTA Lösung (Life Tech.) wurde 1/10 in PBS verdünnt

Zellkulturagar: Zellkulturagar (SERVA) wurde gelöst (3,6 %) und autoklaviert

Tryphanblau: Tryphanblau in PBS gelöst (1 %).

4.1.4. Plasmide und Vektoren

Die Klonierung der DNA-Fragmente wurde mit pBluescript II KS+ (Stratagene), pUC19 (Life Tech), pRC1 (C. Baum) und der 3´proviral-flankierenden Regionen mit p408 durchgeführt (Fehse, 1996). Der retrovirale Vektor pM5neo (Bergemann et al., 1995) wurde für die Transduktion des ΔG5 verwendet. Für die Konstruktion der *loxP*-Expressionsplasmide wurden pcDNA3.1.Zeo (Invitrogen), pRC1, pSBC, pMO1n, pSFβCAT, pSFβ1Neo und pSFβ1ΔCLNGFR (alle C. Baum) eingesetzt.

4.1.5. Bakterienstämme

Es wurden die *Escheria coli*-Stämme DH10B (Life Tech), C600*hfl* (Promega) und Epicurian-*Coli* (Stratagene) verwendet. Die Epicurian-*Coli* wurden bei 28°C, alle anderen Bakterien bei 37°C im Brutschrank oder Inkubationsschüttler (200-250 Umdrehungen pro Minute, Upm) kultiviert.

4.1.6. Säugetierzellen

Es wurden folgende Zellinien verwendet: TF1 (Kitamura et al., 1989), TF1-Zellmutanten (Stocking et al., 1993; Fehse et al., 1996, 1999), FDCP1 (DSMZ ACC 368), GP-*env*Am12 (GA, Markowitz et al., 1988), MS-5 (Itoh et al., 1989) sowie Hek 293 (DSMZACC 305), HL60 (ECACC 9807016) und K562 (ECACC 98121407). Primäre Knochenmarkstammzellen sowie periphere Blutzellen wurden von A.R. Zander, leukämische AML-Zellen von D.K. Hossfeld (beide Hamburg) zur Verfügung gestellt.

4.1.7. Oligonukleotide

Die HPLC gereinigten Oligonukleotide wurden von den Firmen Eurogentec (Seraing, Belgien) und Life Technologies geliefert. Die DNA-Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang angegeben.

4.2. Methoden

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Zentrifugationen bei Raumtemperatur (RT) und 13000 Upm in einer Pico-Tischzentrifuge (Heraeus, Hamburg) durchgeführt.

4.2.1. Klonierung von DNA

4.2.1.1. Enzymatische Manipulation von DNA

Restriktion von DNA

Doppelsträngige DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen geschnitten.

Phosphorylierung von 5´OH-Gruppen

Die Klonierung der DNA-Fragmente, die mit *Pfu* DNA-Polymerase amplifiziert wurden, erforderte die Phosphorylierung von 5´OH-Gruppen. Die Reaktion wurde nach

Fällung bzw. Gelelution der Fragmente mit T4 Polynukleotidkinase (MBI) durchgeführt. In einem 20 µl Ansatz wurden 20 pmol 5´DNA-Enden mit 10 U Enzym und 20 mM dATP phosphoryliert. Der Ansatz wurde 45 min bei 37°C in Reaktionspuffer (MBI) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl 0,5 M Na_2EDTA beendet und die Fragmente für die Klonierung eingesetzt.

Dephosphorylierung von 5´OH-Gruppen

Die Klonierung der DNA-Fragmente erforderte die Dephosphorylierung der 5´OH-Gruppen linearisierter Plasmidvektoren vor der Ligation. Hierzu wurden 1 pmol 5´-terminalphosphorylierter Plasmid-DNA und 1 U alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (Roche) eingesetzt. Der Ansatz wurde 15 min bei 37°C und anschließend 45 min bei 50°C in Reaktionspuffer (Roche) inkubiert. Die Phosphatase wurde durch Inkubation für 20 min bei 85°C inaktiviert und die Fragmente für die Ligation eingesetzt.

Auffüllreaktion 5´- und 3´-überhängender DNA-Enden

Der Verdau mit Restriktionsendonukleasen führte teilweise zu überhängenden DNA-Enden. Für die Klonierung der Fragmente in EcoRV-geschnittene Plasmidvektoren mit glatten Enden mussten die DNA-Enden mit Nukleotiden aufgefüllt werden. Hierzu wurden die DNA-Fragmente (0,8 pmol) mit 2 U Klenow-Fragment (Roche) und 2´-Desoxynukleotid-5´-Triphosphaten (dNTP, 50 µM) für 15 min bei RT in Reaktionspuffer (Roche) inkubiert.

Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation wurde mit T4-Ligase (Life Tech.) ü.N. bei 14°C durchgeführt. Im Falle überhängender 5´- oder 3´DNA-Enden wurde ein zweifacher, im Falle von glatten Enden ein zehnfacher Überschuss des zu klonierenden Fragments eingesetzt. Es wurden 50-100 ng linearisierter und dephosphorylierter Plasmidvektor mit der entsprechenden Menge Fragment und 1 U Ligase in Reaktionspuffer ligiert.

4.2.1.2. Transfektion von *Escheria coli*

Präparation elektrokompetenter *Escheria coli*

Alle Zentrifugationen wurden mit einer Centrikon H-401 (Kontron) bei 4°C durchgeführt. *Escheria coli* (*E. coli*) des gewünschten Stammes wurden auf Agarplatten ohne

Antibiotika ausgestrichen und ü.N. inkubiert. Es wurden Klone gepickt und in 5 ml LB-Medium ohne Antibiotika ü.N. kultiviert. Für die Präparation wurde 1 l LB-Medium mit der ü.N. gewachsenen Kultur (Übernachtkultur) angeimpft. Die Bakterien wurden im Inkubationsschüttler bis zu einer OD_{600} von 0,5-0,7 kultiviert und anschließend bei 4000x g für 10 min zentrifugiert. Der Niederschlag wurde im Kühlraum auf Eis in 1 l 10 %-igem Glycerin (4°C) resuspendiert. Die Bakterien wurden erneut zentrifugiert und in 500 ml 10 %-iges Glycerin aufgenommen (siehe oben). In zwei weiteren Waschschritten wurde das Volumen zuerst auf 20 ml und schließlich auf 2 ml 10 %-iges Glycerin eingeengt. Die Bakterien wurden portioniert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

Für jede Präparation wurde die Transfektionseffizienz von 20 pg pUC19 bestimmt. Die Effizienz sollte mindestens 5x 10^7 transfizierter Klone pro µg pUC19-DNA betragen.

Elektrotransformation

Ligationsansätze wurden vor Durchführung der Elektroporation 1 h gegen 10 %-iges Glycerin auf VS-Filtern (Porengröße 25 nm; Millipore) dialysiert. Dies diente der Verringerung der Leitfähigkeit des Ansatzes. Phenolisierte Plasmid-DNA konnte direkt für die Elektroporation eingesetzt werden. Eine 50 µl Portion elektrokompetenter Bakterien wurde auf Eis aufgetaut. Die Bakterien wurden auf Eis mit 10 µl Ligationsansatz oder 1 µl Plasmid-DNA gemischt. Der Ansatz wurde in eine gekühlte Elektroporationsküvette (2 mm, Eurogentec) überführt. Die Elektroporation wurde in einem EasyjecT Basic Elektroporator (Equibio S.A.) mit 12,5 kV/cm und einer Impulsdauer von 5 ms durchgeführt. Die elektroporierten Bakterien wurden anschließend in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und 1 h im Inkubationsschüttler kultiviert. Portionen der Bakterien wurden auf LB-Agarplatten mit Ampicillin und/oder Kanamycin ausgestrichen und ü.N. im Brutschrank kultiviert.

4.2.1.3. Präparation von DNA

Agarosegel-Elektrophorese

Es wurden Agarosegele (0,7-2 %, 1,5 µg/ml Ethidiumbromid) zur analytischen und präparativen Auftrennung von DNA verwendet. Die DNA wurde nach Zugabe von 6x BPB-Puffer in die Probentaschen eingefüllt und bei 5-10 V/cm in TAE-Puffer aufge-

trennt. Sie wurde durch Transillumination des Agarosegels mit UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht.

DNA-Fragmentelution

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit dem QIAquik Gel-Extraction-Kit (Qiagen) durchgeführt. Die zu isolierenden Fragmente wurden möglichst eng aus dem Gel ausgeschnitten. Pro 100 mg Gel wurden 300 µl QX1-Puffer dazugegeben und die Agarose 10 min bei 50°C geschmolzen. Der Ansatz wurde pro 100 mg Gel mit 100 µl Isopropanol versetzt und auf eine Silikatgelmembran-Säule geladen. Die Säule wurde 2 min zentrifugiert und die gebundene DNA zweimal mit 750 µl PE-Puffer gewaschen. Die DNA wurde 5 min mit 20-100 µl TE-Puffer inkubiert und durch Zentrifugation aus der Säule eluiert. Die Mengenabschätzung der eluierten Fragmente wurde im Agarosegel vorgenommen.

Phenolextraktion und Fällung von DNA

Plasmid- und genomische DNAs wurde nach Isolierung mit äquilibriertem Phenol (4.2.1.) extrahiert, um störende Proteine und RNA zu entfernen. Die DNAs wurden dazu dreimal mit Phenol, einmal mit Phenol/Chloroform (1/1) und einmal mit Chloroform extrahiert.

Die Fällung von Plasmid-DNA aus wässrigen Lösungen wurde durch Präzipitation mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,5) und 2,5 Volumen absolutem Ethanol erreicht. Die gefällte DNA wurde durch Zentrifugation 30 min gesammelt, einmal mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, durch Vakuum getrocknet und in TE-Puffer ü.N. gelöst.

Konzentrationsabschätzung von Nukleinsäuren

Die Quantität und Qualität isolierter DNAs wurde grundsätzlich im Agarosegel überprüft. Daneben wurden photometrische Konzentrationabschätzungen der DNAs und RNAs durchgeführt. Hierzu wurde die Absorption der Nukleinsäuren (1/100 und 1/400 verdünnt) in einer Quarzküvette mit UV-Licht (260 und 280 nm) gemessen. Eine OD_{260} von 1 entspricht hierbei 50 µg DNA oder 40 µg RNA pro ml. Nukleinsäuren mit einem Quotienten ($OD_{260/280}$) von 1,8-2,0 wurden als ausreichend rein angesehen.

Analytische Plasmid-DNA-Isolierung aus Bakterien

Resistente Bakterienklone wurden von Agarplatten gepickt und in 3 ml LB-Medium (50 µg/ml Ampicillin und/oder 100 µg/ml Kanamycin) ü. N. kultiviert. Es wurden 1,5 ml der Kultur für 1 min zentrifugiert. Der Bakterien-Niederschlag wurde in 100 µl Lösung 1 (4°C) resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Lösung 2 dazugegeben, vorsichtig gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 150 µl Lösung 3 und die Inkubation auf Eis für 15 min. Der Ansatz wurde 15 min zentrifugiert, der Überstand mit 1 ml absolutem Ethanol (4°C) versetzt und die DNA 5 min bei -20°C gefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugation (10 min) gesammelt, in 250 µl 0,3 M Natriumacetat (pH 5,5) resuspendiert, mit 700 µl absolutem Ethanol gemischt und wie oben gefällt. Der DNA-Niederschlag wurde durch Vakuum getrocknet und in 60 µl TE (mit 10 µg/ml RNAse A) aufgenommen.

Präparative Plasmid-DNA-Isolierung aus Bakterien

Die präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurden mit dem Plasmid-Maxi-Kit (Qiagen) durchgeführt. Alle Zentrifugationen wurden mit einer Centrikon H-401 (Kontron) bei 4°C durchgeführt. 250 ml LB-Medium (50 µg/ml Ampicillin und/oder 100 µg/ml Kanamycin) wurden mit 100 µl einer klonalen Übernachtkultur geimpft und ü.N. kultiviert. Die Bakterien wurden für 10 min bei 7000x g gesammelt, in 10 ml P1-Puffer auf Eis resuspendiert und die Lösung nach 5 min vorsichtig mit 10 ml P2-Puffer gemischt. Der Ansatz wurde 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 10 ml P3-Puffer (4°C) dazugegeben und die Lösung sofort vorsichtig gemischt. Sie wurde 20 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 20000x g zentrifugiert. Nach 30 min wurde der Überstand abgenommen, noch einmal zentrifugiert (20000x g, 30 min) und auf eine äquilibrierte Anionenaustausch-Säule (tip500) gegeben. Die gebundene DNA wurde zweimal mit 30 ml QC-Puffer gewaschen und anschließend mit 15 ml QF-Puffer eluiert. Es wurde 10,5 ml Isopropanol dazugegeben und die Lösung bei 10000x g zentrifugiert (30 min). Der DNA-Niederschlag wurde mit 5 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen und der Ansatz 10 min zentrifugiert (10000x g). Die DNA wurde durch Vakuum getrocknet, in 100-400 µl TE-Puffer aufgenommen und 15 min bei RT gelöst. Nach Mengenabschätzung im Agarosegel wurde die DNA mit Phenol extrahiert.

Präparation genomischer DNA aus Säugetierzellen

Säugetierzellen (5x 10^5- 1x 10^8) wurden einmal mit PBS (4°C) gewaschen, zentrifugiert und die genomische DNA aus ihnen isoliert. Hierzu wurden die Zellen in 300 µl (bei Zellzahlen < 3x 10^7) oder 1 ml DNA-Lysispuffer pro 10^8 Zellen (bei Zellzahlen > 3x 10^7) resuspendiert. Sie wurden 12-18 h bei 37°C lysiert. Die freigesetzte DNA wurde phenolisiert und der Ansatz mit dem doppelten Volumen Ethanol (96 %) versetzt, bei -20°C gefällt (30 min) und für 10 min zentrifugiert. Der DNA-Niederschlag wurde mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer (10 µg/ml RNAse A) resuspendiert. Die DNA wurde anschließend 1 h bei 50°C gelöst.

***Pfu* Polymerase-Ketten-Reaktion**

Die *Pfu* DNA-Polymerase synthetisiert die DNA mit einer sechsmal geringeren Fehlerrate als die *Taq* DNA-Polymerase. Daher wurde die Amplifikation zu klonierender DNA-Fragmente mit *Pfu* DNA-Polymerase (Stratagene) und spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt. Die Reaktionen wurden auf Eis in einer Sterilwerkbank pipettiert. Es wurde 100 ng Plasmid-DNA oder 2 µl cDNA (komplementärer DNA, siehe unten) mit 2 µl 5 mM dNTP und je 30 pmol Oligonukleotid gemischt. Die Polymerase-Ketten-Reaktion („polymerase-chain-reaction“, PCR) wurde nach Zugabe von 2,5 U Polymerase in einem „thermo-cycler“ (Biometra) mit folgendem Programm durchgeführt: Einmalige Denaturierung zu Beginn der Reaktion bei 94°C (3 min); anschließend jeweils 25-35 Zyklen Denaturierung bei 94°C (45 s); Anlagerung der Oligonukleotide bei 50-65°C (45 s); Synthese bei 72°C (2 min pro 1 kb zu amplifizierender DNA). Am Ende wurde die Reaktion bei 72°C für 10 min inkubiert. Eine Portion der Reaktion wurde elektrophoretisch aufgetrennt. Die Größe der amplifizierten Fragmente wurde überprüft und die Fragmente gegebenenfalls isoliert.

4.2.1.4. Kanamycin-Resistenzgen-Komplementierungs-Technik

Genomische DNA (10 µg) wurde in einem 100 µl Ansatz ü.N. mit 30 U NcoI verdaut. Eine Portion des Verdaus wurde im Agarosegel auf vollständige Restriktion überprüft. In zehn parallelen Ansätzen wurde jeweils 10 µl des Verdaus mit je 1 µg dephosphoryliertem p408 (Fehse, 1996) ligiert. Die Ansätze wurden vereinigt, phenolisiert, gefällt und in 20 µl TE-Puffer aufgenommen. Der Gesamt-Ansatz wurde dialysiert und in elektrokompetente DH10B (Life Tech.) elektroporiert. Die Bakterien

wurden anschließend 1 h in SOC-Medium und eine weitere Stunde in SOC-Medium mit Ampicillin (50 µg/ml) und Kanamycin (100 µg/ml) inkubiert. Die Bakterien wurden ausgestrichen (Antibiotika wie oben) und ü.N. im Brutschrank inkubiert. Es wurden verschiedene Klone gepickt und in Anwesenheit der Antibiotika kultiviert. Die Plasmid-DNA wurde isoliert und durch Restriktionsverdau sowie DNA-Sequenzierung analysiert.

4.2.1.5. Analyse einer humanen embryonalen cDNA λ-Bibliothek

Es wurde eine humane embryonale cDNA λ-Bibliothek (5´Stretch Plus; Clontech, Palo Alto, USA) eingesetzt, um *VTG1*-spezifische cDNA-Sequenzen zu identifizieren. Die Bibliothek war durch reverse Transkription embryonaler RNA und Klonierung der cDNA-Fragmente in den Vektor λgt10 hergestellt worden.

Herstellung λ Bakteriophagen-kompetenter Bakterien

Für die Herstellung λ Bakteriophagen-kompetenter (λ-kompetenter) Bakterien wurde eine Einzelkolonie des λ-sensitiven *E. coli*-Stamms C600*hfl* in 50 ml LB-Medium mit 0,2 % Maltose inokuliert und ü.N. kultiviert. Die Bakterien wurden mit 4000x g zentrifugiert und der Niederschlag in 20 ml $MgSO_4$ (10mM, 4°C) resuspendiert. Die λ-kompetenten Bakterien wurden für maximal drei Wochen bei 4°C gelagert.

Infektion der Bakterien

Die λ-Bakteriophagen der cDNA-Bibliothek wurden zur Analyse auf fünf große LB-Agarplatten (Durchmesser ca. 20 cm) verteilt. Hierzu wurden je Platte 10^5 pfu („plaque forming units“) mit 2 ml λ-kompetenter Bakterien und 25 ml Top-Agar (47°C) gemischt. Die Agarplatten wurden überschichtet und die Bakterien ü.N. bei 37°C lysiert. Die Phagen-DNA wurde anschließend auf einen Nitrozellulosefilter übertragen. Hierzu wurde der Filter (BA-S85; Schleicher und Schüll, Dassel) auf die lysierten Bakterien gelegt und asymetrisch markiert. Er wurde nach einer Minute vorsichtig abgezogen und die transferierte Phagen-DNA für jeweils 2 min denaturiert (0,5 M NaOH; 1,25 M NaCl), neutralisiert (1 M Tris-HCl, pH 7,5) und gewaschen (2x SSC). Der Filter wurde 2 h bei 80°C getrocknet. Von jeder Platte wurde ein zweiter Filter hergestellt, um falsch-positive Plaques zu erkennen. Der zweite Filter wurde 2 min auf den lysierten Bakterien belassen.

Detektion positiver λ-Bakteriophagenklone

Die Phagen-DNA wurde mit einer VTG*1*-spezifischen und radioaktiv markierten Probe (siehe unten) hybridisiert. Hierzu wurde die Membran mit Heringssperma-DNA (100 µg/ml) in λ-Hybridisierungslösung prähybridisiert. Die eingesetzte Probe wurde nach 1h bei 100°C denaturiert (5 min) und in die Hybridisierungslösung gegeben. Die Membran wurde bei 65°C ü.N. in einem Roller-Ofen inkubiert und am nächsten Tag wie folgt bei 65°C gewaschen: Jeweils 15 min mit 2x SSC; 2x SSC (0,1 % SDS); 1x SSC (0,1 % SDS); 0,1x SSC (0,1 % SDS). Sie wurde anschließend 5 min bei RT getrocknet und mit einem „imaging-plate" (Fuji) und Röntgenfilm ausgewertet.

Die identifizierten positiven Plaques (10^6-10^8 pfu) wurden aus den großen Agarplatten herausgeschnitten. Es wurden nur Plaques berücksichtigt, die auf beiden Membranen übereinstimmend identifiziert werden konnten. Der Top-Agar wurde in 1 ml SM-Medium (mit einem Tropfen Chloroform) überführt und für 30 min bei RT inkubiert. Für jeden positiven Plaque wurden Verdünnungen mit 10^1-10^4 pfu pro 100 µl SM-Medium angesetzt, mit je 100 µl λ-kompetenten Bakterien gemischt und 20 min bei 37°C inkubiert. Zu jeder Verdünnung wurde 3 ml Top-Agar (47°C) zugegeben und hiermit Agarplatten (Durchmesser 9 cm) überschichtet. Die Bakterien wurden ü.N. bei 37°C lysiert. Die Phagen-DNA wurde anschließend, wie oben beschrieben, auf einen Nitrozellulosefilter übertragen mit einer *VTG1*-spezifischen und radioaktiv markierten Probe hybridisiert. Hierzu wurden nur Agarplatten verwendet, auf denen abgegrenzte Einzelplaques zu erkennen waren.

Präparative DNA-Isolierung aus λ-Bakteriophagen

Für die Isolierung der Phagen-DNA wurde ein identifizierter positiver Plaque ausgeschnitten, in 1 ml SM-Medium (mit einem Tropfen Chloroform) überführt und für 30 min bei RT inkubiert. Die Phagensuspension (10 µl bzw. 100 µl) wurde mit jeweils 1 ml λ-kompetenten Bakterien gemischt und bei 37°C inkubiert. Nach 20 min wurde 50 ml LB-Medium (5 mM $CaCl_2$) dazugegeben und der Ansatz für weitere 2 h inkubiert. Es wurden nochmals 100 ml LB-Medium (5 mM $CaCl_2$) dazugegeben und die Bakterien weiter kultiviert. Nach 3-5 h kam es zur Lyse der Bakterien. Daraufhin wurde 100 µl Chloroform zugesetzt und der Ansatz für weitere 10 min inkubiert. Schließlich wurden 50 ml der Kultur für der Isolierung der λ-DNA mit Hilfe des λ-Midi-Kit (Qiagen) eingesetzt. Die Präparation erfolgte laut Angaben des Herstellers.

4.2.1.6. Lagerung von *E.coli* Stämmen und Nukleinsäuren

Übernachtkulturen (1,6 ml) verschiedener Bakterien wurden mit 400 µl 87 %-igem Glycerin gemischt, portioniert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C. Genomische und Plasmid-DNAs sowie isolierte DNA-Fragmente wurden bei 4°C aufbewahrt. Synthetisierte cDNAs und isolierte RNAs wurden portioniert und bei -20°C und -70°C gelagert.

4.2.2. Analyse von DNA

4.2.2.1. „Southernblot"-Analyse

Genomischer „Southernblot"

Genomische DNAs (10 µg) wurden in einem 100 µl Ansatz ü.N. mit 20-40 U Restriktionsendonuklease verdaut. Portionen der Verdaue wurden im Agarosegel auf die Vollständigkeit der Restriktion überprüft. Die Ansätze wurden gefällt und in 30 µl TE-Puffer aufgenommen. Die DNAs wurden in einem 0,7 %-igen Agarosegel ü.N. aufgetrennt. Das Gel wurde dokumentiert und jeweils 30 min denaturiert (0,5 M NaOH; 1 M NaCl) und neutralisiert (0,5 M Tris-HCl, pH 7,2; 1 M NaCl). Die DNA wurde ü.N. mit 10x SSC auf eine Nylonmembran (Biodyne B; Pall, Dreieich) übertragen. Die Membran wurde mit 2x SSC gespült, 2 h bei 80°C getrocknet und mit klonierten und ^{32}Pi markierten DNA-Fragmenten (siehe unten) hybridisiert.

Herstellung radioaktiv markierter DNA-Proben

Für die „Southernblot" und „Northernblot"-Analysen sowie die λ-Hybridisierung wurden klonierte DNA-Fragmente mit ^{32}Pi radioaktiv markiert. Die Markierungsreaktion wurde mit dem Prime-It II Random-Primer-Labeling-Kit (Stratagene) durchgeführt. Die Fragmente (25 ng, 500-1500 bp) wurden in 25 µl Wasser aufgenommen und nach Zugabe von 10 µl Oligonukleotidmischung bei 100°C denaturiert. Der Ansatz wurde auf Eis mit 10 µl 5x dCTP-Puffer, 5 µl radioaktiv markiertem [α-^{32}P] dCTP (10 µCi/µl, Amersham Pharmacia) und 5 U Polymerase gemischt. Die Markierung wurde je nach Länge des Fragments für 2-10 min bei 37°C durchgeführt. Die Reaktion wurde mit 2 µl 0,5 mM Na_2EDTA (pH 8) beendet. Nach Zugabe von 48 µl Wasser wurde der Ansatz auf eine Sephacryl-Säule (MoBiSpin S-300; MoBiTec, Göttingen) geladen und die Markierungsreaktion von nicht eingebauter Radioaktivität befreit. Die Radioaktivität einer Portion (1/100 Volumen) wurde mit einem „ß-counter"

(LS1701, Beckmann-Coulter) bestimmt und die spezifische Aktivität der Gesamtprobe kalkuliert. Eine Gesamtaktivität von 5x 10^6 cpm (RT-PCR, siehe unten) bzw. 10^7-3x 10^7 cpm („Southernblot“, „Northernblot“) wurde als ausreichend hoch angesehen.

Hybridisierung

Für die Analyse der DNAs wurde die Membran mit Heringssperma-DNA (100 µg/ml) in DNA-Hybridisierungslösung prähybridisiert. Die radioaktiv markierte Probe wurde nach 1 h bei 100°C denaturiert (5 min) und in die Hybridisierungslösung gegeben. Die Membran wurde bei 65°C ü.N. in einem Roller-Ofen inkubiert und am nächsten Tag wie folgt bei 65°C gewaschen: Jeweils 15 min mit 2x SSC; 2x SSC (0,1 % SDS); 1x SSC (0,1 % SDS); 0,1x SSC (0,1 % SDS). Sie wurde anschließend 5 min bei RT getrocknet und mit einem „imaging-plate“ (Fuji) und Röntgenfilm ausgewertet.

4.2.2.2. Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA und amplifizierten DNA-Fragmenten wurde mit dem ABI Prism BigDye-RR-Terminator-Kit (PE) durchgeführt. Hierzu wurden 100 ng Plasmid-DNA oder 200 ng PCR-Fragment, 8 µl Reaktionmix und 8 pmol Oligonukleotid gemischt und der Ansatz mit Wasser bis 20 µl aufgefüllt. Die Sequenzreaktion wurde in einem „thermo-cycler“ (Biometra) mit folgendem Programm durchgeführt: Einmalige Denaturierung zu Beginn bei 96°C (3 min), je 25 Zyklen Denaturierung bei 96°C (30 s), Anlagerung des Oligonukleotides bei 50°C (15 s) und Synthese bei 60°C (4 min). Die Reaktionen wurden 30 min auf Eis gefällt, mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und durch Vakuum getrocknet. Der DNA-Niederschlag wurde außer Haus in Formamid/EDTA-Puffer (PE) aufgenommen und in einem 4,25 %-igen Acrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die automatische Sequenzierung wurde mit dem ABI Prism 377 DNA-Sequenzierer (PE) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Gerätesoftware (Version 3.4). Die Analyse der DNA-Sequenzen wurde mit dem DNAsis Computerprogramm (Hitachi) durchgeführt.

4.2.3. Analyse von RNA

Alle zur Isolierung und Analyse von RNA eingesetzten Lösungen wurden mit Diethylpyrocarbonat behandeltem Wasser (DEPC-Wasser) angesetzt. Soweit nicht anders beschrieben, wurde die RNA jederzeit auf Eis aufbewahrt.

4.2.3.1. Präparation von Gesamt-RNA aus Säugetierzellen

Suspensionszellen (5-10x 10^6) wurden zentrifugiert, in 250 µl PBS resuspendiert und mit 750 µl TriReagent LS (Molecular Research Center, Cincinnati, USA) gemischt. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Pipettieren lysiert und der Ansatz 5 min bei RT inkubiert. Er wurde mit 200 µl Chloroform gemischt, weitere 15 min bei RT inkubiert und im Kühlraum 25 min mit 12000x g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, vorsichtig mit dem gleichen Volumen Isopropanol gemischt und die RNA für 10 min bei RT gefällt. Sie wurde im Kühlraum 10 min gesammelt (siehe oben) und mit 75 %-igem Ethanol gewaschen. Die RNA wurde getrocknet, in 50-200 µl Wasser resuspendiert, 15 min bei 60°C gelöst und portioniert.

4.2.3.2. PolyA$^+$-mRNA-Isolierung aus Gesamt-RNA

Die Isolierung von polyA$^+$-mRNA wurde mit dem Oligotex mRNA-Midi-Kit (Qiagen) durchgeführt. Gesamt-RNA (100 µg) wurde in 250 µl Wasser aufgenommen. Nach Zugabe von 250 µl 2x OBB-Puffer und 15 µl Oligotex-Suspension (37°C) wurde der Ansatz 3 min bei 65°C und 10 min bei RT inkubiert. Er wurde 2 min zentrifugiert und die gebundene RNA zweimal mit jeweils 1 ml OW2-Puffer gewaschen. Die RNA wurde zweimal mit jeweils 20 µl OEB-Puffer (70°C) eluiert, beide Eluate wurden vereinigt und die RNA portioniert.

4.2.3.3. RT-PCR-Analysen

Reverse Transkription

Für die Analyse der Genexpression durch RT-PCR wurden cDNAs synthetisiert. Die Reaktionsansätze wurden auf Eis in einer Sterilwerkbank pipettiert. Jeweils 1-2 µg der RNAs wurden mit 2 µg pd$(T)_{12\text{-}18}$-Nukleotid (Amersham Pharmacia) in 14,5 µl Wasser gemischt. Die RNAs wurden 15 min bei 65°C denaturiert. Die Ansätze wurden anschließend mit 2,5 µl dNTP (10mM), 40 U RNAsin (Ribonuklease-Inhibitor, Promega) und 20 U reverser Transkriptase des „Avian Myeloblastosis Virus“ (Promega) in Reaktionspuffer gemischt. Für die Reaktion wurden die Ansätze 10 min bei 30°C, 80 min bei 42°C und 10 min bei 72°C inkubiert. Die cDNAs wurden mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und portioniert.

***Taq* Polymerase-Ketten-Reaktion**

Die synthetisierten cDNAs wurden mit *Taq* DNA-Polymerase (Taq-PCR-Core-Kit,

Qiagen) amplifiziert. Die PCR-Ansätze wurden zur Vermeidung von DNA-Kontaminationen in einer Sterilwerkbank auf Eis pipettiert. Es wurden 2 µl cDNAs mit je 30 pmol Oligonukleotid und 1 µl dNTP Mix (je Desoxynukleotid 10 mM) in Reaktionspuffer gemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 U Polymerase gestartet. Die Amplifikation wurde in einem „thermo-cycler“ (Biometra) mit folgendem Programm durchgeführt: Einmalige Denaturierung zu Beginn bei 94°C (3 min); anschließend jeweils 25-35 Zyklen Denaturierung bei 94°C (30 s); Anlagerung der Oligonukleotide bei 55-68°C (30 s); Synthese bei 72°C (1 min pro 1 kb zu amplifizierender cDNA). Der Ansatz wurde schließlich für 10 min bei 72°C inkubiert.

PCR- „Southernblot“

Für die RT-PCR-Analysen wurden generell die gesamten PCR-Reaktionen elektrophoretisch aufgetrennt. Die cDNA-Fragmente wurden, wie für den genomischen „Southernblot“ beschrieben, auf eine Nylonmembran übertragen. Alternativ wurden die Fragmente durch Vakuum-Transfer (Vakuumblotter, Model 785, Bio Rad Laboratories) übertragen. Hierzu wurde das Agarosegel 15 min depuriniert (0,25 N HCl), zweimal mit Wasser gespült und 30 min denaturiert (0,5 N NaOH). Der Transfer wurde in 10x SSC für 90 min mit Vakuum (130 mm Quecksilbersäule) durchgeführt. Die Membran wurde anschließend 5 min mit 2x SSC gespült, 30 min bei 80°C getrocknet und anschließend hybridisiert (4.2.2.1).

4.2.3.4. „Northernblot“-Analyse

Die verwendeten Gelkammern, Hybridisierungsröhrchen und Inkubationsschalen wurden jeweils 30 min mit 0,5 % SDS; 0,1 N HCl; 0,1 N NaOH und Wasser gespült. Die elektrophoretische Auftrennung der RNAs wurde in einem 1 %-igen Gel durchgeführt. Hierzu wurde 1 g Agarose mit 10 ml 10x MOPS und 88 ml Wasser in einer Mikrowelle gelöst. Nach Zugabe von 2 ml 37 %-igem Formaldehyd wurde das Gel gegossen. Die RNAs wurden 15 min bei 65°C in RNA-Puffer denaturiert und auf das äquilibrierte Agarosegel (30 min in „Northern“-Puffer) geladen. Die Proben wurden 3-4h bei 5 V/cm in „Northern“-Puffer aufgetrennt und der Puffer alle 30 min umgewälzt. Das Gel wurde anschließend dreimal 20 min mit Wasser gespült, zweimal 15 min denaturiert (0,05 M NaOH; 1,5 M NaCl), zweimal 10 min neutralisiert (1,5 M Tris-HCl, pH 7,4; 1,5 M NaCl) und schließlich 40 min in 10x SSC inkubiert. Die RNAs

wurden ü.N. mit 10x SSC auf eine Nylonmembran (Biodyne B, Pall) übertragen und anschließend für 2 h bei 80°C getrocknet. Die Membran wurde mit Methylenblau (0,03 % Methylenblau in 0,3 M Natriumacetat, pH 5,2) und das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt. Hierdurch konnte die Effizienz des Transfers abgeschätzt werden.

Die transferierten RNAs wurden mit klonierten und ^{32}Pi markierten Probe detektiert. Die Hybridisierung wurde bei 42-55°C ü.N. in einem Roller-Ofen durchgeführt. Sie wurde, wie beschrieben (4.2.2.1.), allerdings mit RNA-Hybridisierungslösung durchgeführt. Die Membran wurde anschließend bei RT mit 2x SSC gespült und je zweimal 5 min mit 2x SSC (0,1 % SDS) und 0,2x SSC (0,1 % SDS) gewaschen. Die Auswertung erfolgte mit einem „imaging-plate“ (Fuji) und Röntgenfilm. Die Membran wurde anschließend mit einer Aktin-spezifischen und radioaktiv markierten Probe hybridisiert, um die Menge aufgetrennter RNA abzuschätzen.

4.2.4. „Westernblot“-Analyse

Herstellung von Zellmembranextrakten

Vor der Isolierung der Proteine wurden die Zellen dreimal mit PBS (4°C) gewaschen. Sie wurden in 5 ml Puffer A aufgenommen, mit Ultraschall behandelt und 1 h zentrifugiert (100000x g, 4°C). Der Niederschlag wurde in 300 µl 5 M Harnstoff aufgenommen und 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 1,2 ml Wasser wurden die Proteine 5 min bei RT gesammelt und in 100-200 µl Puffer A aufgenommen. Nach Zugabe von 20-40 µl 5x SDS-Puffer und 1/10 Volumen Mercaptoethanol wurde der Ansatz gemischt und 60 min bei RT inkubiert. Die Zellmembranextrakte wurden portioniert und bei -20°C gelagert.

Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die in den Zellmembranextrakten enthaltenen Proteine wurden in einem 7,5 %-igen Polyacrylamidgel mit 6 M Harnstoff elektroporetisch aufgetrennt. Hierzu wurde für das Trenngel 6 g Harnstoff in 8 ml Wasser gelöst, mit jeweils 5 ml Acrylamidlösung und 4x Trenngelpuffer gemischt und die Lösung bis 20 ml mit Wasser aufgefüllt. Nach Zugabe von 130 µl 10 %-igem Ammoniumpersulfat (APS) und 10 µl N,N,N´, N´-Tetramethylethylendiamin (TEMED) wurde das Gel blasenfrei gegossen. Das Trenngel wurde mit Wasser überschichtet und polymerisierte innerhalb von ~30 min. Für das Sammelgel wurde 3 g Harnstoff in 4 ml Wasser gelöst, mit 1 ml Acrylamidlö-

sung und 2 ml 4x Sammelgelpuffer gemischt und die Lösung bis 8 ml mit Wasser aufgefüllt. Das Sammelgel wurde nach Zugabe von 80 µl 10 %-igem APS und 8 µl TEMED vorsichtig über das Trenngel geschichtet. Die Probentaschen wurden gründlich von Acrylamidresten befreit. Die Proteine (2-3 µg pro Probentasche) wurden bei 50 mA 1-2 h in SDS-Laufpuffer aufgetrennt.

Transfer

Die aufgetrennten Proteine wurden auf PVDF-Membran (Immobilon P, Millipore) übertragen. Hierzu wurde die Membran 5 min in Methanol aktiviert. Die Membran, das Gel und vier 3MM Whatmanpapiere wurden 5-10 min in Transferpuffer ohne SDS äquilibriert. Die Komponenten wurden blasenfrei zusammengebaut und die Proteine in einer Transfer-Kammer (Mini-Transblot-Transfer-Cell, Biorad, München) übertragen. Der Transfer wurde für 30 min bei 4°C und 380 mA durchgeführt.

Nachweis der Proteine

Die Membran wurde nach Beendigung des Transfers gespült (PBS; 0,5 % Tween 20) und 1 h bei RT mit Puffer B blockiert. Sie wurde anschließend für 1 h mit primärem Antikörper, gelöst in Puffer B, inkubiert. Folgende Antikörper wurden für die Analysen verwendet: aminoterminal-spezifischer αGluR5/6/7, monoklonal, Maus-IgM (1/500 Verdünnung; Chemicon, Hofheim); carboxyterminal-spezifischer αGluR5 oder αGluR6, beide polyklonal, Schaf-Ig (1/250 Verdünnung; Biotrend, Köln); carboxyterminal-spezifischer αGluR6/7, polyklonal, Kaninchen-IgG (1/500 Verdünnung; Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA). Die Membran wurde anschließend dreimal mit Puffer B (ohne Milchpulver) gewaschen. Es folgte die Detektion mit sekundärem, Meerrettichperoxidase-gekoppeltem Antikörper für 30 min bei RT (1/2000-1/4000 Verdünnung in Puffer B). Als sekundäre Antikörper wurden αMaus-IgM (Ziege), αSchaf-IgG (Kaninchen) und αKaninchen-IgG (Ziege) der Firma SouthernBiotech (Birmingham, USA) eingesetzt. Die Membran wurde mit PBS gewaschen, für 2-5 min mit ECLPlus (Western Detection Reagenz, Amersham Pharmacia) inkubiert und die Proteine mit Röntgenfilm detektiert. Die Antikörper wurden durch Inkubation der Membran ü.N. mit 0,2 M Glycin (pH 2,5) entfernt.

4.2.5. TUNEL-Analyse

Für die Durchführung der TUNEL-Analyse („terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling“; Li und Darzynkiewicz, 1995) wurden alle Zentrifugationen mit 300x g im Ausschwingrotor durchgeführt. 5x 10^5 Zellen wurden mit 5 ml PBS (0,5 % BSA) gewaschen und in 120 µl PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 1,2 ml PBS (1 % Formaldehyd, 4°C) wurden die Zellen 15 min auf Eis inkubiert. Sie wurden mit 1 ml PBS (0,5 % BSA) gewaschen und in 100 µl PBS aufgenommen. Nach Zugabe von 1 ml Ethanol (70 %, 4°C) wurden die Zellen für mindestens 4 h bei -20°C fixiert.

Die Markierung freier DNA-Enden in den Zellen wurde mit der Terminalen-Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT; MBI) durchgeführt. Die fixierten Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in 50 µl TdT-Reaktionsmix (100 µM BrdUTP, 25 U TdT in Reaktionspuffer) resuspendiert. Die Markierung wurde lichtgeschützt für 40 min bei 37°C durchgeführt. Der Ansatz wurde anschließend durch Zugabe von 1 ml PBS (0,5 % BSA; 0,1 % Triton X-100) gewaschen und die Zellen in 50 µl PBS (0,5 % BSA; 0,3 % Triton X-100) aufgenommen. Der Ansatz wurde nach Zugabe von αBromodesoxyuridin] FITC-gekoppeltem Antikörper (1,5 µg, Roche) für 1 h lichtgeschützt bei RT inkubiert. Die Zellen wurden in 500 µl PBS resuspendiert und die Fluoreszenz durchflusszytometrisch durch Anregung mit einem Argonlaser (488 nm) in einem Coulter Epics XL-MCL FACS-Gerät analysiert.

4.2.6. Immunfluoreszenz

HEK 293-Zellen wurden auf Glasplättchen bis zu einer Konfluenz von 70-80 % kultiviert. Sie wurden laut Angaben des Herstellers mit 1 µg Plasmid-DNA und SuperFect Transfektions-Reagenz (Qiagen) transfiziert. Die Zellen wurden nach 24 h zweimal für 5 min bei RT gewaschen (100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,9 % NaCl; 1 mM $CaCl_2$; 0,5 mM $MgCl_2$) und 1 min bei RT mit Methanol/Aceton (1/1) fixiert. Anschließend wurden sie dreimal gewaschen (siehe oben) und für 15 min bei RT in Waschpuffer mit 0,5 % BSA inkubiert. Es folgte die lichtgeschützte Färbung der Zellen mit αHA1 Rhodamin-, αHA1 FITC- (beide 1/40 Verdünnung; Roche), αc-Myc Cy3- (1/100 Verdünnung; Sigma-Aldrich) oder αFLAG FITC- (1/50 Verdünnung; Sigma-Aldrich) gekoppelten Antikörpern für 1 h bei RT. Die Zellen wurden dreimal gewaschen (siehe oben) und für 5 min mit DAPI (1µg/ml in Waschpuffer; Roche) inkubiert. Schließlich

wurden die Glasplättchen auf Objektträgern fixiert und die Immunfluoreszenz der Zellen mit einem inversen Mikroskop der Firma Zeiss (Axiovert 200) ausgewertet.

4.2.7. Zellkultur

4.2.7.1. Kultivierung von Säugetierzellen

TF1-Zellmutanten sowie TF1-, K562- und HL60-Zellen wurden in RPMI, Hek 293, GP-*env*AM12 (GA) und GA-Klone in DMEM, FDCP1-Zellen in MEM und MS-5-Stromazellen in αMEM kultiviert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und 5 % Kohlendioxid. Für die Herstellung des RPMI-Mediums ohne Glutamat wurde der Amin-Selector-Kit (Life Tech.) verwendet.

Die Suspensionszellen wurden in einer Zelldichte von 2-10x 10^5 Zellen/ml mit 10 U/ml rekombinantem, humanen GM-CSF (TF1) oder murinen IL3 (FDCP1) kultiviert. TF1-Zellmutanten, K562- und HL-60 Zellen wurden ohne Wachstumsfaktor kultiviert. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt.

Adherente Hek 293- und GA-Zellen sowie MS-5-Stromazellen wurden alle 2-3 Tage geteilt. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und durch Trypsin/EDTA-Inkubation abgelöst. Sie wurden je nach Konfluenz der Zellen 1/5 bis 1/10 geteilt und in frischem Medium aufgenommen.

Für die Klonierung MS-5-kokultivierter TF1-Zellen wurden die Stromazellen bis zu einer Konfluenz von 50-70 % im T75-Kulturflaschen kultiviert und mit 15 Gy bestrahlt. Die TF1-Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und 3x 10^6 Zellen wurden anschließend pro MS-5-Kulturflasche in RPMI-Medium ohne GM-CSF kultiviert. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt.

4.2.7.2. Isolierung primärer Knochenmarkstammzellen

Die zur Verfügung gestellten Knochenmark- und AML-Zellen wurden mit Zustimmung der Probanten entnommen. Die leukämischen Blasten der Patienten wurden im Rahmen der Behandlung morphologisch, histochemisch und durchflusszytometrisch untersucht. Die mononukleären Zellen wurden mit einem Ficoll-Hypaque-Gradienten (Amersham Pharmacia) durch Zentrifugation abgetrennt. CD34-positive Zellen wurden durch MACS Technologie (Miltenyi Biotec) angereichert.

4.2.7.3. Einfrieren und Lagerung von Zellinien

Es wurden ausschließlich Zellen eingefroren, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden. Die Zellen wurden hierzu in Einfriermedium (90 % FKS, 10 % DMSO; 4°C) aufgenommen und zu je 10^6 Zellen pro Ampulle portioniert. Sie wurden in einem Einfrierkasten mit Isopropanol ü.N. bei -70°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Einige Tage später wurde eine Portion der eingefrorenen Zellen aufgetaut und die Zellen auf Vitalität und Kontamination überprüft.

4.2.7.4. Agarklonierung

Die Klonierung von TF1-Zellen wurde in 6-Loch Kulturplatten als Doppelansatz durchgeführt. Dazu wurde 3,6 %-iger Zellkulturagar autoklaviert und bei 68°C im Wasserbad aufbewahrt. Die Zellen wurden seriell mit Medium verdünnt. Anschließend wurden 600 µl der verschiedenen Verdünnungen mit je 5,4 ml Mediumagar (RPMI, 15 % FKS, 0,36 % Zellkulturagar, +/- 400µg/ml G418, +/- GM-CSF) vermischt. Es wurden je 3 ml pro Loch pipettiert. Nach 10-15 min im Kühlschrank war der Mediumagar geliert und die Platten wurden 2-3 Wochen kultiviert.

4.2.7.5. Elektrotransformation von GP-*env*AM12-Zellen

Die Elektroporation von GP-*env*AM12-Zellen (GA-Zellen) wurde mit dem Easyject plus Elektroporator (Eurogentec) durchgeführt. Hierzu wurden 2x 10^6 Zellen in 400 µl FKS aufgenommen, mit 10 µg linearisierter Plasmid-DNA gemischt und in eine 4 mm Elektroporationsküvette (Eurogentec) überführt. Sie wurden mit 250 V, 1050 µF und unendlichem Innenwiderstand elektroporiert. Die Zellen wurden anschließend sofort in 10 ml Medium aufgenommen und das Medium nach 4 h gewechselt. Die Selektion der GA-Zellen mit G418 (400µg/ml) wurde 24 h nach Elektroporation begonnen und die Zellen wurden weiter mit G418 kultiviert. Resistente Klone konnten nach 2-3 Wochen mit Hilfe von Klonierungszylindern trypsinisiert und in 24-Loch Kulturplatten überführt werden. Nachdem die Zellen zu 90 % konfluent waren, wurden sie in Kulturflaschen in Anwesenheit von G418 expandiert.

4.2.7.6. Infektion von TF1-Zellen

Die Infektion von TF1-Zellen wurde mit Virusüberständen durchgeführt. Die verwendeten GA-Klone wurden hierzu in einer T25-Kulturflasche bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. Es wurden 3 ml DMEM-Medium auf die Zellen gegeben und nach

16 h wieder abgenommen. 1,5 ml des steril filtrierten Virusüberstands wurden mit 1,5 ml RPMI-Medium gemischt. TF1-Zellen (3x 10^6) wurden in dem verdünnten Überstand aufgenommen und in einer 60 mm Kulturschale mit GM-CSF ü.N. inkubiert. Die Infektion wurde nach 24 h mit einem zweiten, frisch präpariertem Überstand wiederholt. Die Zellen wurden anschließend in Zellkulturagar selektioniert (4.2.7.4.).

4.2.8. Kurzzeit-Proliferationsanalysen

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und, wie angegeben, kultiviert. Nach Ablauf der Inkubation wurden 10^4 Zellen in 100 µl Medium aufgenommen und in eine 96-Loch Kulturplatte überführt (mindestens 3 parallele Ansätze). Die Zellen wurden mit 50 µl Medium (+/- 10 U/ml Wachstumsfaktor) für 8-12 h inkubiert. Für die [^{3}H]Thymidininkorporation wurden die Zellen nach Zugabe von 50 µl Medium (mit 0,5 µCi Methyl-[^{3}H]Thymidin, ICN) für 10-16 h kultiviert und bei -20°C eingefroren. Die Zellen wurden aufgetaut, geerntet und auf einen Szintillationsfilter (Beckmann) aufgebracht. Der Filter wurde 2 h bei 80°C getrocknet und die eingebaute Radioaktivität mit einem „ß-counter“ (LS1701, Beckmann-Coulter) gemessen.

Für Proliferationsanalysen kokultivierter TF1-Zellen wurden die MS-5-Stromazellen in 96-Loch Kulturplatten ausgesät. Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 50-70 % kultiviert und mit 15 Gy bestrahlt. Verschiedene TF1-Zellzahlen wurden in 150 µl RPMI-Medium ohne GM-CSF kultiviert. Die [^{3}H]Thymidininkorporation wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

5. Ergebnisse

5.1. Identifikation und Charakterisierung retroviraler Integrationen

Retroviren integrieren in, für die Integrase zugängliche, transkriptionell offene Regionen des Genoms (Whitcomb und Hughes, 1992). Diese Eigenschaft war ausgenutzt worden, um humane, CD34-positive, myeloische TF1-Vorläuferzellen (Kitamura et al., 1989) durch Kultivierung mit bestrahlten Virus (M3Pneosup)-produzierenden amphotropen Helferzellen (GAsupFcl3-Fibroblasten) zu infizieren. Die infizierten Zellen wurden anschließend in Gegenwart von Geneticin (G418), aber in Abwesenheit des Wachstumsfaktors GM-CSF selektioniert (Stocking et al., 1993). Aus diesen Zellinien waren 3´proviral-flankierende Regionen kloniert und teilweise sequenziert worden (Fehse, 1996; Fehse et al., 1999). Für die Klonierung war die Kanamycin-Resistenzgen-Komplementierungs-Technik etabliert und benutzt worden. Diese Technik erlaubt es, 3´proviral-flankierende Regionen mit hoher Effizienz molekular zu klonieren. Ziel dieser Untersuchung war es, die Frage zu beantworten, ob die mutagene Eigenschaft der retroviralen Integration zur Abrogation der Wachstumsfaktor-Abhängigkeit führt und ob solche mutierten Gene die Progression akuter myeloischer Leukämien (AML) fördern. Die zuvor klonierten retroviralen Integrationen sollten mit Hilfe neu veröffentlichter DNA-Sequenzen näher charakterisiert werden.

5.1.1. Klonierung 3´proviral-flankierender Regionen

Es wurde zuerst überprüft, ob klonale Zellen generiert worden waren und die Zelllinien ohne Verlust der retroviralen Integrationen kultiviert werden konnten. Hierfür wurden genomische DNAs der Mutanten isoliert und mit der Restriktionsendonuklease NcoI verdaut. Sie wurden anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nylonmembran transferiert. Die genomischen DNA-Fragmente wurden mit einer ^{32}Pi markierten DNA detektiert, die mit dem Neomycinresistenzgen (*Neo*^{R}) des proviralen Vektors hybridisierte. Durch diese „Southernblot“-Analyse konnten Neomycin-spezifische DNA-Fragmente (Neomycinfragmente) nachgewiesen werden (Abb. 5). Die Anzahl und Größe der Fragmente unterschied sich in den einzelnen Mutanten und die Analyse bestätigte die zuvor gemachten Beobachtungen (Fehse, 1996). Die Zellen wiesen eine geringe Zahl retroviraler Integrationen auf. Darüber hinaus waren die etablierten Zellinien klonal und die retroviralen Integrationen über einen langen Zeitraum stabil erhalten.

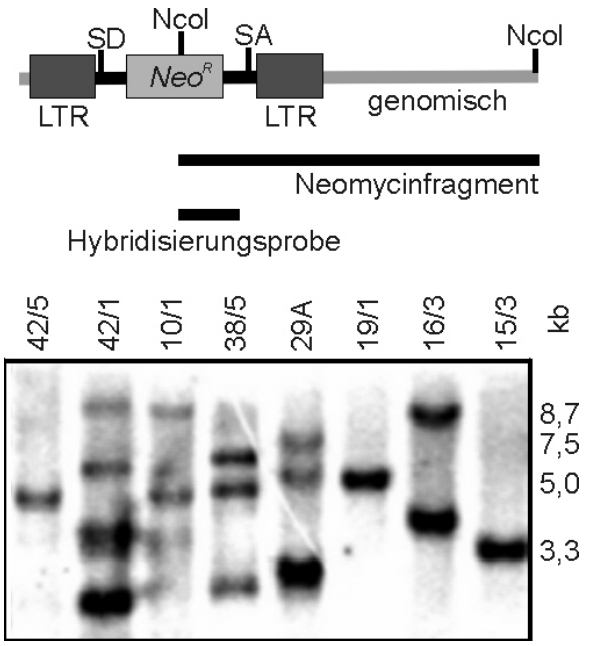


Abbildung 5: „Southernblot"-Analyse Wachstumsfaktor-unabhängiger TF1-Mutanten
Der provirale Vektor mit „long terminal repeats" (LTRs), Neomycinresistenzgen (*Neo*^{R}), Spleißdonor (SD) und Spleißakzeptor (SA) sowie eine 3´proviral-flankierende genomische Region (grau) sind schematisch dargestellt (oben). Die genomischen DNAs der Mutanten (10 µg) wurde mit NcoI verdaut, elektrophoretisch aufgetrennt und mit einer Neomycin-spezifischen und ^{32}Pi markierten DNA detektiert (unten). Die Größe der Fragmente ist abhängig von der Position der NcoI-Schnittstelle in der 3´proviral-flankierenden genomischen DNA (Lother unveröffentlicht).

Die Kanamycin-Resistenzgen-Komplementierungs-Technik (4.2.1.4.) war eingesetzt worden, um Neomycinfragmente aus den Mutanten zu klonieren. Die genomischen DNA-Sequenzen der 3´proviral-flankierenden Regionen wurden anschließend durch BLAST („Basic Local Alignment Search Tool", Altschul et al., 1990) mit der EMBL „Nucleotide Sequence Database" verglichen. Es wurden retrovirale Integrationen in den Genen *GRIK1* (GluR5), *ITPR*3 (Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor Typ 3, InsP3R3) und *CCND2* (Cyclin D2), in einem unbekannten Genlokus („virus tagged gene" 1, *VTG1*) sowie in verschiedenen anderen chromosomalen Loci identifiziert (Fehse, 1996; Fehse et al., 1999).

Um weitere Integrationen zu charakterisieren, wurden einige Neomycinfragmente erneut kloniert und unter optimierten Bedingungen sequenziert. Die erhaltenen DNA-Sequenzen wurden mit neu veröffentlichten DNA-Sequenzen näher charakterisiert. Die Reklonierung einiger Neomycinfragmente bestätigte die zuvor identifizierten retroviralen Integrationen. Es konnten weitere Integrationen in den Genloci *NOS3* (endotheliale Stickstoffmonooxid-Synthetase), *TBK1* („TANK-binding kinase" 1), *E2F1* (E2F1-Transkriptionsfaktor) und in einer telomeren Region (VTG4) nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurden Integrationen in Genloci ohne bislang bekannte Genfunktionen gefunden (Tabelle 1).

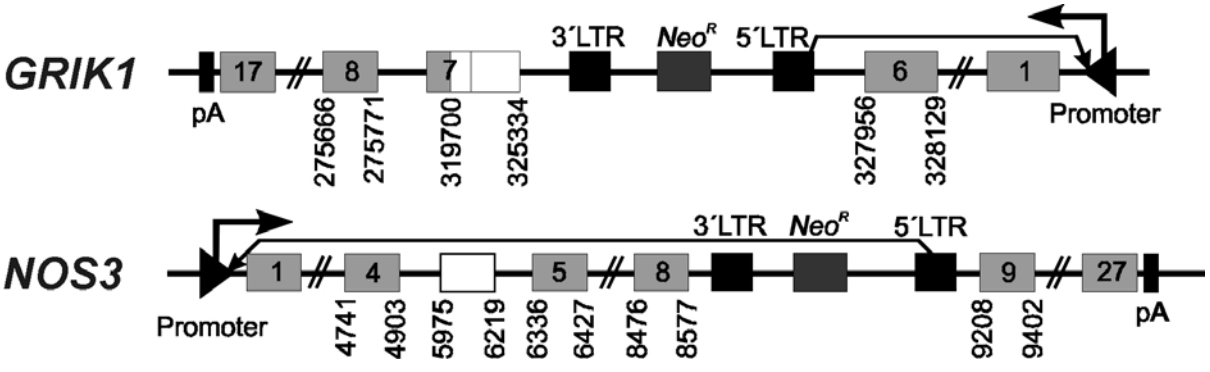
Mutante	Int./Zelle	Lokus	Position	Funktionen
10/1	2	*VTG1*[1]	Promoter?	unbekannt
10/1	2	VTG4	Telomer	Stabilität, Replikation
15/3	1	*CCND2*[2] (Cyclin D2)	Promoter	Zellzyklus-Regulation
19/1	1	*TBK1*	Promoter?	NFκB-Aktivierung
25	1	AL135778, Chrom. 6	CpG Wiederh.	unbekannt
29A	4	*GRIK1*[1] (GluR5)	intronisch	extrazell. Ionenimport
38/5	3	AC010418, Chrom. 5	Gen?	unbekannt
38/5	3	AL359513, Chrom. 13	Gen?	unbekannt
39/1	2	*NOS3* (eNOS)	intronisch	NO-Synthese
42/5	1	*ITPR3*[1] (InsP3R3)	intronisch	Ca^{2+}-Mobilisierung
44/4	3	*E2F1*	5´ Bereich	Transkription, Zelltod

Tabelle 1: Identifizierte retrovirale Integrationen in TF1-Mutanten
Die chromosomalen Loci, die Zahl der Integrationen pro Zelle (Int./Zelle) und die Position des proviralen Vektors im Gen sowie einige bekannte Genfunktionen sind zusammengestellt. Die vermutete retrovirale Integration in den Promoterbereich des *VTG1* und *TBK1* kann aufgrund mangelnder Sequenzinformationen nicht endgültig bewiesen werden (siehe unten). 1- Fehse (1996), 2- Fehse et al. (1999).

Im Anschluss an die durchgeführten Sequenzanalysen wurde untersucht, wo in den entsprechenden Genen die retroviralen Integrationen erfolgt waren und ob Integrationen zu Trunkierungen der Gene geführt hatten.

5.1.1.1. *GRIK1*, Mutante 29A

Ein 7,5 kb großes Neomycinfragment wurde aus der Mutante 29A kloniert. Die DNA-Sequenz der 3´proviral-flankierenden Region wies eine vollständige Homologie zur genomischen DNA-Sequenz des *GRIK1* (AP001705) auf. Ein 108 bp großer Bereich war vollständig homolog zu einer veröffentlichten cDNA-Sequenz des GluR5 (U16125). Er konnte als Teil des Exons 7 identifiziert werden. Die Integration des retroviralen Vektors erfolgte intronisch zwischen den Exonen 6 und 7, in 5´→ 3´ Orientierung (Abb. 6).



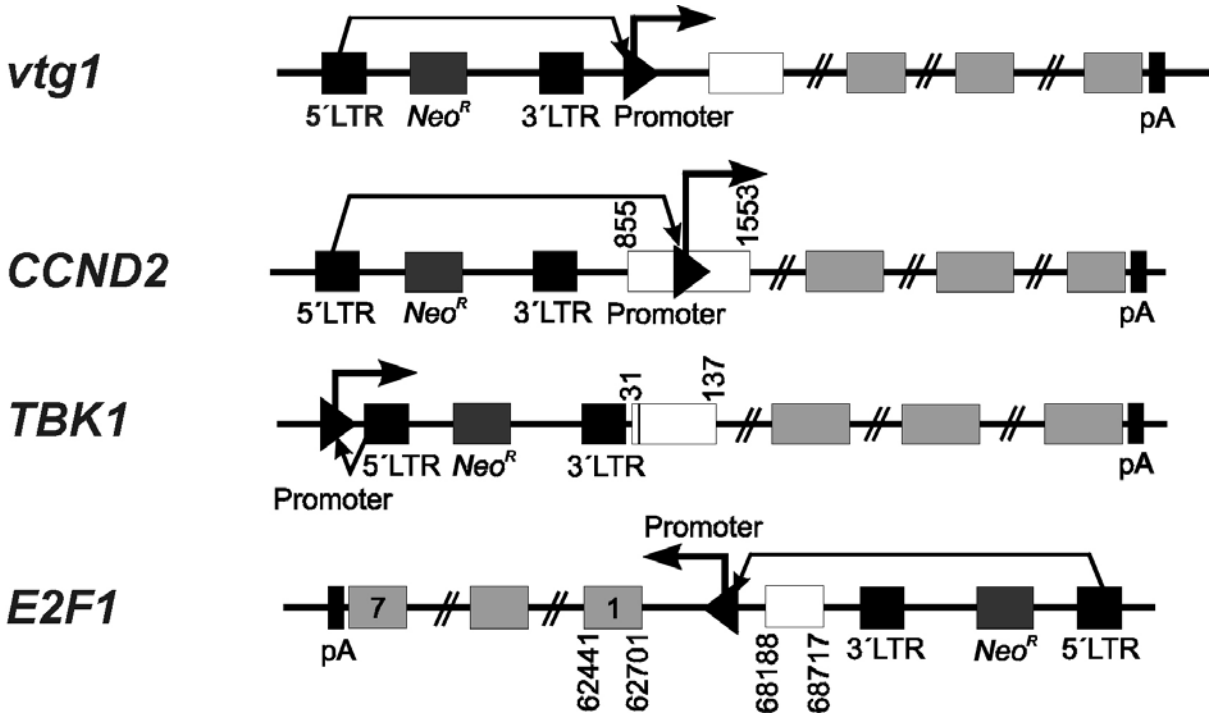


Abbildung 6: Genomische Struktur retroviraler Integrationsorte
Die identifizierten Genloci sind schematisch dargestellt. Die Position des proviralen Vektors, die gefundene Sequenzhomologie (weiß), bekannte Exone (grau), der endogene Promoter und das Polyadenylierungsignals (pA) sind gezeigt. Die Nummerierung entspricht den veröffentlichten Sequenzen der genomischen DNAs bzw. mRNA (*TBK1*). Der Transkriptionsstart sowie mögliche Effekte der proviralen LTRs auf den endogenen Promoter sind mit Pfeilen dargestellt.

Die Struktur der kodierenden Exone wurde durch die Integration nicht verändert. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Integration die Expression des Gens modifiziert haben könnte, da retrovirale LTRs ungeachtet der Entfernung endogene Promotoren beeinflussen können. So ist beispielsweise für den *EVI-1* Lokus gezeigt, dass der provirale Enhancer über eine Entfernung von 90 kb den endogenen Promoter beeinflusst und die Transkription aktiviert (Bartholomew und Ihle, 1991).

Der Kainatrezeptor GluR5 ist ein ionotroper Glutamatrezeptoren. Dies sind Liganden-aktivierte Ionenkanäle, die selektiv für Kalzium und Natrium sind. Die Rezeptoren sind an der exitatorischen Signaltransduktion im Gehirn beteiligt. Daneben spielen sie eine Rolle in der Ausbildung synaptischer Plastizität, der Entwicklung des Zentralnervensystems und der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen (Dingledine et al., 1999; Meldrum, 2000).

5.1.1.2. *NOS3*, Mutante 39/1

Die Sequenzanalyse des 5 kb großen Neomycinfragments aus der Mutante 39/1 zeigte eine Homologie des 3´proviral-flankierenden Bereichs zu *NOS3* (D26607). Dieser Genlokus kodiert die endotheliale Stickstoffmonooxid-Synthetase (eNOS), die den sekundären Botenstoff Stickstoffmonooxid (NO) synthetisiert. Die Integration des retroviralen Vektors erfolgte intronisch zwischen den Exonen 8 und 9, in 3´→ 5´ Orientierung (Abb. 6). Sie könnte ähnliche Effekte haben, wie sie zuvor für *GRIK1* angenommen wurden.

5.1.1.3. *CCND2*, Mutante 15/3

Die DNA-Sequenz der 3´proviral-flankierende Region des 3,3 kb großen Neomycinfragments wies eine vollständige Homologie zur genomischen DNA-Sequenz des *CCND2* auf (U47284). Dieser Genlokus kodiert Cyclin D2, welches eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellzyklus spielt. Im Gegensatz zu *GRIK1*, *eNOS* und *ITPR3* war der retrovirale Vektor hier in den bekannten Promoterbereich des Gens und in 5´→ 3´Orientierung integriert (Abb. 6). Dieser Integrationstyp könnte einen großen Einfluss auf die Transkription des Gens haben. Aufgrund der Nähe zum Transkriptionsstart kann die provirale LTR einerseits als Promoter wirken und die Expression retroviraler Fusionstranskripte initiieren oder wirkt andererseits als Enhancer und verstärkt eine mögliche Transkription vom endogenen Promoter aus. Daneben könnte durch die Insertion der proviralen DNA die Aktivität regulatorischer Bereiche des endogenen Promoters beeinflusst werden.

5.1.1.4. *TBK1*, Mutante 19/1

Ein 5 kb großes Neomycinfragment wurde aus der Mutante kloniert. Die DNA-Sequenz der 3´proviral-flankierenden Region war teilweise homolog zur mRNA der „TANK-binding kinase“ 1 (TBK1, NM013254). TBK1 spielt eine wichtige Rolle in der Aktivierung des zentralen Transkriptionsfaktors NF-κB (Pomerantz und Baltimore, 1999). Die genomische Struktur des Lokus ist unbekannt. Es wird angenommen, dass es sich bei dem homologen Sequenzbereich (118 bp) um ein Exon des Gens handelt. Die Integration erfolgte 31 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts in 5´→ 3´Orientierung und somit vermutlich in den Promoterbereich des Gens (Abb. 6). Sie hat vermutlich ähnliche Effekte, wie sie zuvor für *CCND2* beschrieben wurden.

5.1.1.5. *E2F1*, Mutante 44/4

Die Sequenzanalyse der 3´proviral-flankierenden Region des 5,5 kb großen Neomycinfragments zeigte eine Homologie zu einer Region, die sich 4 kb stromaufwärts des Transkriptionsstarts des *E2F1* befindet (AL121906). Die Integration erfolgte in 5´→ 3´ Orientierung (Abb. 6). Die retrovirale LTR könnte auch in diesem Fall die Transkription des Gens beeinflussen.

5.1.1.6. *VTG*1, Mutante 10/1

Die Sequenzanalyse der 3´proviral-flankierenden Region des 3,8 kb großen Neomycinfragments wies zunächst keinerlei Homologie zu bekannten Genloci nach. Es waren aber DNA-Sequenzmotive identifiziert worden, die möglicherweise Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren darstellen (Fehse, 1996). Es wurde daher vermutet, dass der retrovirale Vektor in den Promoterbereich des Gens integriert war (Abb. 6). Eine humane embryonale cDNA λ-Bibliothek wurde analysiert, um zusätzliche Sequenzinformationen zu erhalten (4.2.1.5). Hierzu wurde die cDNA mit dem genomischen Anteil des klonierten Neomycinfragments hybridisiert. Die Sequenz eines isolierten cDNA-Fragments (1 kb) war teilweise homolog zu einer mRNA (AF151042), die in humanen CD34-positiven Knochenmarkstammzellen exprimiert wird. Die vermutete Integration des retroviralen Vektors in den Promoterbereich des Gens könnte ähnliche Konsequenzen haben, wie im Falle des *CCND2*.

5.1.1.7. VTG4, Mutante 10/1

Die Sequenzanalyse eines weiteren Neomycinfragments (8,7 kb) der Mutante zeigte Homologien zu verschiedenen telomeren Regionen (u.a. Z96465). Telomere spielen eine wichtige Rolle für die Stabilität der Chromosomenenden und in der DNA-Replikation.

5.1.1.8. AL135778, Mutante 25

Ein 10 kb großes Neomycinfragment wurde aus der Mutante kloniert. Die DNA-Sequenz der 3´proviral-flankierenden Region wies eine vollständige Homologie zur genomischen DNA-Sequenz des Chromosoms 6 auf (AL135778). Diesem Bereich wird bisher keine Genfunktion zugeordnet. Die Integration des retroviralen Vektors erfolgte aber in unmittelbarer Nachbarschaft einer ~1 kb langen CpG-Dinukleotid-

Sequenz (CpG-Insel). CpG-Inseln sind gewöhnlich im 5´Bereich von Genen lokalisiert. Die postreplikative Methylierung des Cytosins spielt eine wichtige Rolle für die Regulation der Genaktivität in Säugetieren (Laird und Jaenisch, 1996).

5.1.2. Transkriptionsanalysen

Die oben gezeigten Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen. Es wurden Zellmutanten untersucht, die nach retroviraler Infektion und Selektion in Gegenwart von G418 aber in Abwesenheit von GM-CSF etabliert worden waren. Die klonalen Zellinien enthielten wenige, jedoch stabile retrovirale Integrationen in, zum Teil, bekannten Genen. Die Funktion der identifizierten Gene lässt vermuten, dass sie an der Regulation der Proliferation, der Differenzierung und der Apoptose hämatopoetischer Vorläuferzellen beteiligt sein können. Darüber hinaus kann eine Veränderung der Expression die Tumorprogression begünstigen. Es wurden keine Gentrunkierungen gefunden.

In der Mutante 15/3 war die retrovirale Integration in den Promoterbereich des *CCDN2* erfolgt. Untersucht werden sollte, ob die Transkription des Cyclin D2-Gens durch Effekte der proviralen LTRs beeinflusst wird. Für Kontrollversuche wurden, neben 15/3, weitere Mutanten und parentale TF1-Zellen untersucht, die 24 h mit und ohne GM-CSF kultiviert wurden. Die polyA$^+$-mRNA der Zellen wurde isoliert (4.2.3.2.), in einem 1 %-igen Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt, auf Nylonmembran transferiert und mit einem klonierten, Cyclin D2-spezifischen und ^{32}Pi markierten cDNA-Fragment hybridisiert („Northernblot"-Analyse, 4.2.3.4.). In allen Proben wurde eine ~6 kb große Cyclin D2-spezifische mRNA beobachtet (Abb. 7), die auch in murinen, leukämischen T-Zellen nachgewiesen worden war (Hanna et al., 1993).

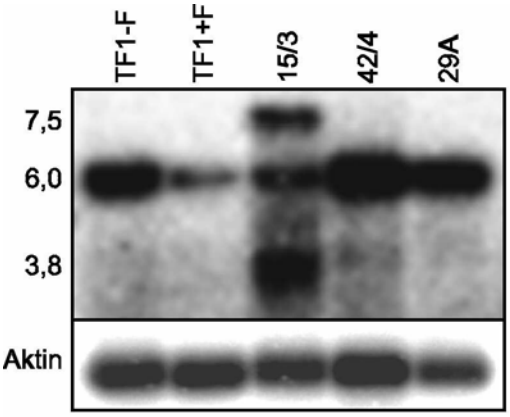


Abbildung 7: Transkription des Cyclin D2 „Northernblot"-Analyse mit je 1 µg polyA$^+$-mRNAs aus den Mutanten 15/3, 29A, 42/4 und TF1-Zellen, die 24 h mit (TF1+F) und ohne GM-CSF (TF1-F) kultiviert wurden. Die transferierten RNAs wurden zunächst mit einem Cyclin D2-spezifischen und ^{32}Pi markierten DNA-Fragment und anschließend mit einer Aktin-spezifischen Probe hybridisiert.

Die Menge dieser mRNA war in kontinuierlich wachsenden, d.h. mit GM-CSF kultivierten, TF1-Zellen am niedrigsten und in der Mutante 15/3 erhöht. Eine sehr hohe Transkription wurde in TF1-Zellen nach Wachstumsfaktorentzug und in den Mutanten 29A und 42/4 beobachtet.

Darüber hinaus wurde eine weitere mRNA (7,5 kb) in der Mutante 15/3 nachgewiesen. Sie könnte ein retrovirales Fusionstranskript darstellen. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde die RNA isoliert, revers transkribiert und die cDNA mit LTR- und Cyclin D2-spezifischen Oligonukleotiden (bp9/dp96) amplifiziert (RT-PCR-Analyse, 4.2.3.3.).Die anschließende Sequenzierung des isolierten Fragments zeigte, dass sowohl retrovirale (5´Bereich) als auch Cyclin D2-spezifische (3´Bereich) DNA-Sequenzen vorhanden waren. Die Transkription des Cyclin D2 wird in der Mutante 15/3 also nicht nur durch den endogenen Promoter, sondern auch durch die retrovirale LTR initiiert. Addiert man die Mengen der verschiedenen mRNAs, so wird deutlich, dass Cyclin D2 in der Mutante 15/3 am höchsten transkribiert ist.

In der Mutante 10/1 war der retrovirale Vektor vermutlich auch in den Promoter bereich des Gens integriert. Ein Effekt der retroviralen Integration auf die Transkription des *VTG1* wurde durch RT-PCR-Analysen (4.2.3.3.) untersucht. Die Sequenzinformation des zuvor isolierten cDNA-Fragments ermöglichte die Synthese *VTG1*-spezifischer Oligonukleotide (bp27/28) für die Amplifikation verschiedener cDNAs. Die elektrophoretisch aufgetrennten und auf Nylonmembran transferierten Amplifikate wurden mit einem *VTG1*-spezifischen und ^{32}Pi markierten cDNA-Fragment detektiert. Die Transkription des *VTG1* konnte in verschiedenen Mutanten und in CD34-positiven Zellen des Nabelschnurbluts nachgewiesen werden (Abb. 8). Kontinuierlich wachsende TF1-Zellen exprimierten keine *VTG1*-spezifische mRNA.

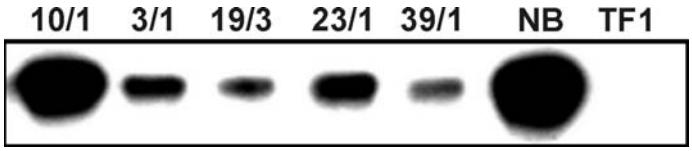


Abbildung 8: Transkription des *VTG1*
RT-PCR-Analyse mit RNAs aus TF1-Zellen, CD34-positiven Nabelschnurblutzellen (NB) und verschiedenen Mutanten. Die cDNAs wurden mit *VTG1*-spezifischen Oligonukleotiden (bp27/28) und 30 Zyklen amplifiziert. Die transferierten Fragmente wurden mit einer *VTG1*-spezifischen und ^{32}Pi markierten Probe hybridisiert. Eine parallel durchgeführte Analyse mit Aktin-spezifischen Oligonukleotiden (cs21/37) bestätigte, dass gleiche cDNA-Mengen amplifiziert wurden (Daten nicht gezeigt).

Die Transkription des *VTG1* war in der Mutante 10/1 deutlich höher als in den anderen Mutanten. Durch RT-PCR-Analysen mit LTR- und *VTG1*-spezifischen Oligonukleotiden (bp9/51) konnten auch hier retrovirale Fusionstranskripte nachgewiesen werden (vgl. Cyclin D2). Es ist daher anzunehmen, dass die erhöhte Transkription auf ihre zusätzliche Initiation durch den proviralen Promoter zurückzuführen ist. Die Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass die retrovirale Integration in den Promoterbereich des *VTG1* erfolgt war.

Die Analysen zeigen, dass in parentalen TF1-Zellen kein *VTG1* oder GluR5 (vgl. Abb. 10, 11) und nur geringe Mengen Cyclin D2 mRNA exprimiert wurden. Im Gegensatz hierzu konnte in allen untersuchten Mutanten eine hohe Transkription des *VTG1*, des Cyclin D2 und des GluR5 (vgl. Abb. 19) beobachtet werden, obwohl retrovirale Integrationen in diesen Genen nur in den Mutanten 10/1, 15/3 und 29A nachgewiesen wurden. Es muss daher angenommen werden, dass die modifizierte Transkription in allen Mutanten nur zum Teil auf eine retrovirale Integration in den entsprechenden Genloci zurückzuführen ist. Die retroviralen Integrationen stehen also vermutlich nicht in einem direkten kausalen Zusammenhang mit der Abrogation der Wachstumsfaktor-Abhängigkeit. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass die Etablierung der Mutanten durch Wachstumsfaktorentzug zur Induktion der Expression von Genen führte. Vermutet werden kann weiterhin, dass die provirale Integration präferentiell in diese neu entstandenen transkriptionell offenen Regionen erfolgte und diese markiert wurden.

5.2. Funktion von Kainatrezeptoren normaler und maligner hämatopoetischer Vorläuferzellen

5.2.1. Endogene Expression myeloischer Kainatrezeptoren

5.2.1.1. Klonierung myeloischer Kainatrezeptoren

Eine induzierte Expression und die anschließende Liganden-abhängige Aktivierung des GluR5 könnte zum Einstrom von Kalzium in die Zelle führen (Dingledine et al., 1999). Dies könnte insbesondere direkt oder indirekt zur Aktivierung der zuvor identifizierten Gene führen. Es wurde daher untersucht, ob eine veränderte GluR5-Expression an der Abrogation der Wachstumsfaktor-Abhängigkeit hämatopoetischer Vorläuferzellen beteiligt ist.

Es wurde zunächst geprüft, ob vollständig transkribierte mRNAs des GluR5 und anderer Kainatrezeptoren in hämatopoetischen Vorläuferzellen gebildet werden. Hierzu wurden RNAs aus humanen, primären und CD34-positiven Knochenmarkstammzellen und myeloischen TF1-Vorläuferzellen sowie der Mutante 29A isoliert und revers transkribiert. Die cDNAs wurden mit GluR-spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert (4.2.3.3), die anhand veröffentlichter cDNA-Sequenzen der Rezeptoren synthetisiert werden konnten. Sie wurden mit Oligonukleotiden amplifiziert, die sich stromaufwärts des Transkriptionsstarts und stromabwärts des Stopkodons anlagerten (Abb. 9, 1.PCR).

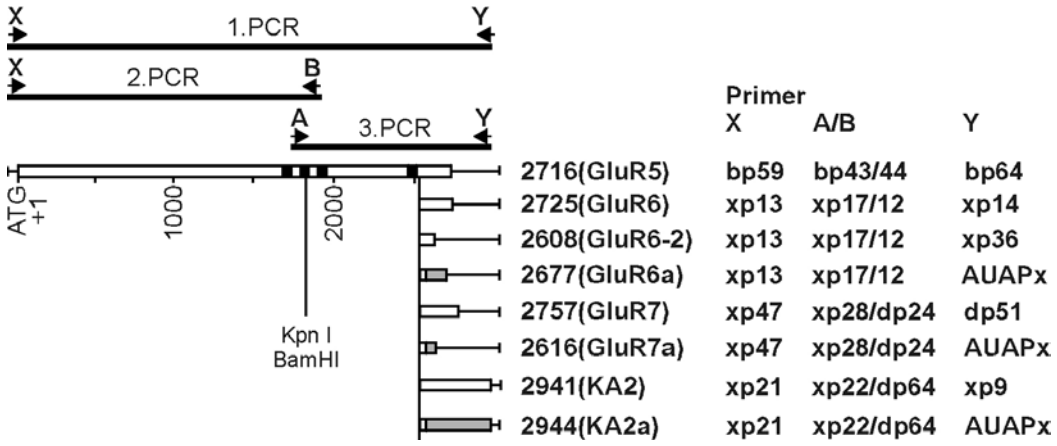


Abbildung 9: Amplifikation vollständiger Kainatrezeptor-cDNAs
Der offene Leserahmen eines Kainatrezeptors mit Transkriptionsstart und Membrandomänen (schwarz) sowie die durchgeführten PCRs sind schematisch dargestellt. Die verwendeten Oligonukleotide sind den klonierten Rezeptorvarianten zugeordnet. Die Positionen der Stopkodons und der Restriktionsschnittstellen KpnI (GluR5) und BamHI (GluR6) sind angegeben. Die Sequenzunterschiede zu veröffentlichten cDNAs sind grau hinterlegt.

Da die Quantität der synthetisierten cDNA-Fragmente für eine Isolierung nicht ausreichte, wurden Portionen der PCR-Reaktionen als Matrizen verwendet, um die 5´- (2.PCR) und 3´-Enden (3.PCR) der Rezeptor-cDNAs zu amplifizieren. Die elektrophoretisch aufgetrennten cDNA-Fragmente wurden isoliert, subkloniert und sequenziert.

Für die Klonierung des GluR5 wurden die cDNAs mit den Oligonukleotiden bp59/64 (1.PCR), bp59/44 (2.PCR) und bp43/64 (3.PCR) amplifiziert. Die überlappenden Fragmente der 2. und 3. PCR wurden mit Hilfe der KpnI-Schnittstelle in GluR5 ligiert. Die Rezeptor-cDNA wurde für spätere Expressionsstudien in pM5neo (Bergemann et al., 1995) oder pcDNA3.1. (Invitrogen) kloniert. Die Sequenz der klonierten Rezeptor-cDNA wies eine vollständige Homologie zu einer humanen GluR5-cDNA auf, die aus fötalem Gehirn isoliert worden war (EAA3, Korczak et al., 1995).

Die Amplifikation mit den Oligonukleotiden xp13/xp14 (1.PCR), xp13/xp12 (2.PCR) und xp17/xp14 (3.PCR) ermöglichte die Isolierung GluR6-spezifischer cDNA-Fragmente. Die vollständige Rezeptor-cDNA konnte aufgrund der BamHI-Schnittstelle des GluR6 in pcDNA3.1. kloniert werden. Ihre Sequenz war identisch mit einer humanen Rezeptor-cDNA aus fötalem Gehirn (EAA4, Hoo et al., 1994). Durch die Amplifikation mit dem Oligonukleotid xp36 konnte eine Variante des GluR6 kloniert werden, die einen alternativen carboxyterminalen Bereich aufwies. Die Sequenz dieser Variante entsprach im wesentlichen der Rezeptor-cDNA des murinen, im Gehirn exprimierten, GluR6-2 (Gregor et al., 1993).

Für die Klonierung des GluR7 wurde die Amplifikation der cDNAs mit den Oligonukleotiden xp47/dp51 (1.PCR), xp47/dp24 (2.PCR) und xp28/dp51 (3.PCR) durchgeführt. Die Sequenz der klonierten Rezeptor-cDNA und einer GluR7-cDNA aus dem menschlichen Gehirn (EAA5, Nutt et al., 1994) waren vollständig homolog.

Schließlich wurden die cDNAs mit den Oligonukleotiden xp21/xp9 (1.PCR), xp21/dp64 (2.PCR) und xp22/xp9 (3.PCR) amplifiziert, um KA2 zu klonieren. Die Sequenz der klonierten Rezeptor-cDNA entsprach der Sequenz des humanen KA2, der im Gehirn exprimiert wird (EAA2, Kamboj et al., 1992).

Durch „RACE-PCR“ sollte überprüft werden, ob hämatopoetische Zellen weitere Rezeptorvarianten mit alternativen 3´Enden exprimieren. Die RNAs wurden mit dem Oligonukleotid APx revers transkribiert und die Rezeptor-cDNAs mit den Oligonukleotiden xp13/AUAPx (GluR6), xp47/AUAPx (GluR7) und xp21/AUAPx (KA2) amplifi-

ziert. Anschließend wurden die 3´Enden der Rezeptor-cDNAs mit den Oligonukleotiden xp17/AUAPx (GluR6), xp28/AUAPx (GluR7) und xp22/AUAPx (KA2) synthetisiert. Die Sequenzanalyse der klonierten Rezeptor-cDNAs ergab, dass Varianten mit bisher unveröffentlichten carboxyterminalen Bereichen exprimiert wurden (Abb. 9). Ihre offenen Leserahmen weisen ein Stopkodon, ein Terminationssignal und ein PolyA-Ende auf. Die Sequenzen der Rezeptorvarianten wurden in der EMBL „Nucleotide Sequence Database“ unter folgenden Akzessionsnummern veröffentlicht: GluR6a (AJ252246), GluR7a (AJ249210) und KA2a (AJ249209).

5.2.1.2. Transkription myeloischer Kainatrezeptoren

Die Ergebnisse der Klonierungen sollten durch Transkriptionsanalysen bestätigt werden. Hierzu wurden die RNAs aus humanen, primären, CD34-positiven Knochenmarkstammzellen sowie kontinuierlich wachsenden TF1- und murinen, myeloischen FDCP1-Vorläuferzellen isoliert (4.2.3.1.). Sie wurden revers transkribiert und die cDNAs mit GluR-spezifischen Oligonukleotiden (Abb. 10A) und ansteigenden Zyklenzahlen amplifiziert (semiquantitative RT-PCR-Analyse, 4.2.3.3.). Die cDNAs wurden parallel mit Aktin-spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert, um zu gewährleisten, dass gleiche cDNA-Mengen für die Analyse eingesetzt wurden (Daten nicht gezeigt). Die Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und mit klonierten, GluR-spezifischen und ^{32}Pi markierten cDNA-Fragmenten detektiert.

Knochenmarkstammzellen, deren RNA direkt isoliert und für die Analyse eingesetzt wurde, wiesen eine hohe KA2-Transkription auf. Es wurde allerdings nur eine sehr geringe Expression von GluR5- und GluR6-mRNAs und keine Expression des GluR7 beobachtet (Abb. 10B). Außerdem waren Knochenmarkstammzellen *ex vivo* für drei Tage mit Zytokinen (10 ng/ml „stem cell factor“, 3 ng/ml IL 1b, 20 ng/ml IL 3) kultiviert worden. Diese Zellen wurden von Herrn Dr. B. Fehse zur Verfügung gestellt. In diesen Zellen war die Transkription des GluR5 und GluR6 deutlich erhöht und die GluR7-Transkription induziert. KA2 war in diesen aktivierten (proliferierenden) Zellen unverändert hoch transkribiert. In kontinuierlich wachsenden TF1- und FDCP1-Zellen wurden nur KA2- und GluR7-mRNAs nachgewiesen. Eine Transkription des GluR5 und GluR6 konnte nicht beobachtet werden

.

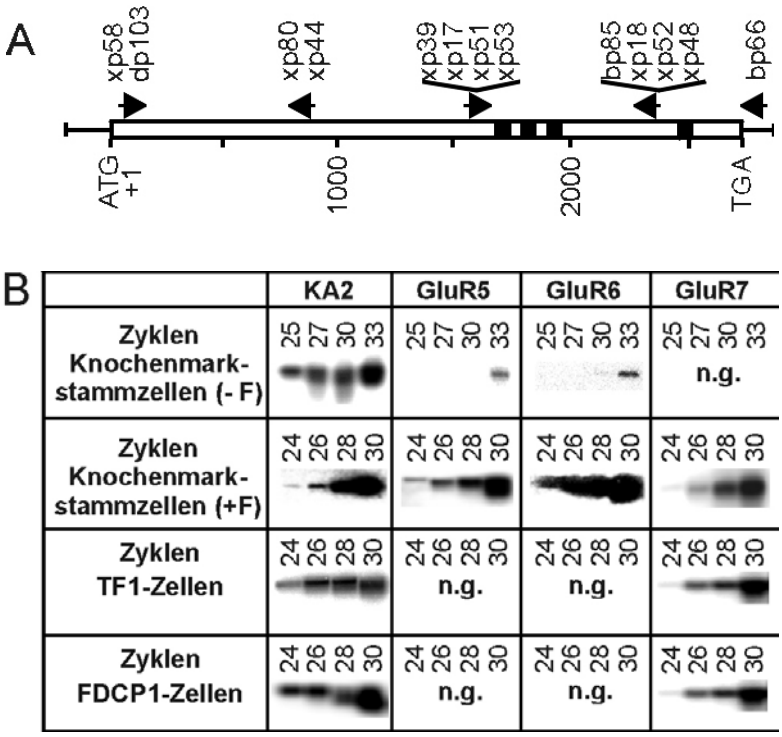


Abbildung 10: Kainatrezeptor-Transkription hämatopoetischer Vorläuferzellen
A: Schematisch dargestellt ist die vereinfachte Struktur eines Kainatrezeptors mit dem offenen Leserahmen, dem Transkriptionsstart, den Membrandomänen 1-4 (schwarz) und dem Stopkodon. Die Position der für die Amplifikation der cDNA-Fragmente verwendeten Oligonukleotide ist angegeben.
B: Semiquantitative RT-PCR-Analysen mit RNAs, die aus Knochenmarkstammzellen, TF1- und FDCP1-Zellen isoliert wurden. Die Knochenmarkstammzellen wurden entweder direkt analysiert (-F) oder drei Tage lang *ex vivo* mit Zytokinen kultiviert (+F). Die cDNA-Fragmente wurden mit den Oligonukleotiden xp39/bp85 (GluR5), xp17/xp18 (GluR6), xp51/xp52 (GluR7) und xp53/xp48 (KA2) und ansteigenden Zyklenzahlen amplifiziert und mit GluR-spezifischen und ^{32}Pi markierten Fragmenten detektiert; n.g.- nicht gefunden.

Die Transkription vollständiger Rezeptor-mRNAs sollte durch „Northernblot"-Analysen (4.2.3.4) nachgewiesen werden. Es wurden polyA$^+$-mRNAs aus TF1-Zellen, die 24 h mit und ohne GM-CSF kultiviert wurden, und der Wachstumsfaktor-unabhängigen Mutante 29A isoliert (4.2.3.2) und in 1 %-igen Formaldehyd-Agarosegelen aufgetrennt. Die mRNAs wurden auf Nylonmembranen transferiert und mit klonierten, GluR-spezifischen und ^{32}Pi markierten cDNA-Fragmenten detektiert. In TF1- und 29A-Zellen wurden eine KA2- (~3,6 kb) und eine GluR7-spezifische mRNA (~5 kb) nachgewiesen (Abb. 11). In der Mutante trat eine zusätzliche GluR7-spezifische mRNA (~3,2 kb) auf, die in TF1-Zellen nicht beobachtet wurde.

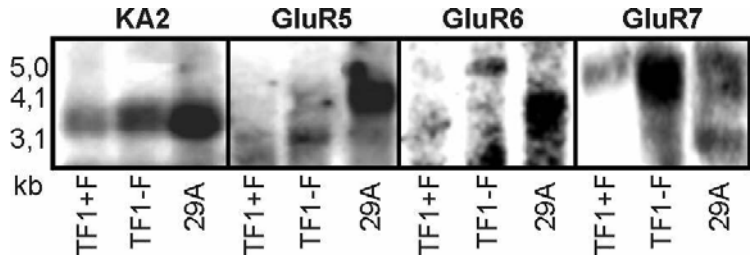


Abbildung 11: Transkription von Kainatrezeptoren in TF1- und 29A-Zellen
„Northernblot"-Analyse mit je 1 µg polyA$^+$-mRNAs aus TF1- und 29A-Zellen. TF1-Zellen wurden mit (TF1+F) oder für 24 h ohne GM-CSF (TF1-F) kultiviert. Die RNAs wurden mit GluR-spezifischen und ^{32}Pi markierten DNA-Fragmenten hybridisiert.

In kontinuierlich wachsenden TF1-Zellen konnten weder GluR5- noch GluR6-mRNAs nachgewiesen werden. Die Transkription beider Rezeptoren war aber nach Wachstumsfaktorentzug induziert worden. Die Größen der mRNAs betrugen ~3,1 kb (GluR5) und ~5 kb (GluR6). In der Mutante 29A wurde, neben dem 3,1 kb großen Transkript, eine weitere GluR5-spezifische mRNA (~4,1 kb) beobachtet, die sehr hoch transkribiert war. In der Mutante konnten daneben GluR6-mRNAs detektiert werden, die Größen zwischen 3,5 und 4 kb aufwiesen.

Es wurden verschiedene Kainatrezeptor-cDNAs aus hämatopoetischen Vorläuferzellen und der Mutante 29A kloniert. Daneben konnte eine unterschiedliche Transkription der Rezeptoren in den Zellen nachgewiesen werden. Einige der nachgewiesenen Rezeptorvarianten werden auch im Gehirn exprimiert und sind pharmakologisch und elektrophysiologisch charakterisiert worden (Dingledine et al., 1999). Daher wird angenommen, dass die Kainatrezeptoren, die in myeloischen Zellen gefundenen wurden, extrazellulären Ionenimport erlauben. Daneben wurden auch Rezeptorvarianten kloniert, die bisher unbekannte carboxyterminale Bereiche aufweisen. Die alternative posttranslationale Modifikation der 3´Enden dieser Rezeptorvarianten erlaubt möglicherweise eine spezifische Signaltransduktion in hämatopoetischen Vorläuferzellen.

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Funktion myeloischer Kainatrezeptoren in die Regulation der Proliferation, der Differenzierung und der Apoptose hämatopoetischer Vorläuferzellen involviert ist.

5.2.2. Kainatrezeptor-abhängige Induktion der Apoptose

Ruhende Knochenmarkstammzellen und kontinuierlich wachsende TF1-Zellen exprimierten weder GluR5 noch GluR6. Die Transkription beider Rezeptoren wurde

in aktivierten (proliferierenden) Knochenmarkstammzellen und in TF1-Zellen nach Wachstumsfaktorentzug beobachtet. *Ex vivo* kultivierte Knochenmarkstammzellen stellen ihr Wachstum schon nach wenigen Zellteilungen ein (Morrison et al., 1997). Im Gegensatz dazu können etablierte TF1- und FDCP1-Zellinien unbegrenzt proliferieren, solange optimale Kulturbedingungen vorliegen. Diese Expressions- und Wachstumsunterschiede deuten auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der Expression des GluR5 bzw. GluR6 und der Induktion der Apoptose hin.

5.2.2.1. Expression von GluR5 und GluR6 nach Wachstumsfaktorentzug

Es wurde zunächst untersucht, ob die durch „Northernblot"-Analysen nachgewiesenen GluR5- und GluR6-mRNAs translatiert werden. TF1- und FDCP1-Zellen wurden hierzu für 30 h (TF1) oder 20 h (FDCP1) mit und ohne Wachstumsfaktor kultiviert und es wurden Zellmembranextrakte hergestellt (4.2.4). Die in diesen Extrakten enthaltenen Proteine wurden in 7,5 %-igen Polyacrylamidgelen (6 M Harnstoff) elektrophoretisch aufgetrennt, auf PVDF-Membranen übertragen und mit Antikörpern spezifisch für den carboxyterminalen Bereich des GluR5 oder GluR6 detektiert. In TF1- und FDCP1-Zellen wurde nach Wachstumsfaktorentzug ein 120-130 kDa großes GluR5-spezifisches Protein beobachtet. Kontinuierlich wachsende Zellen exprimierten kein solches Protein (Abb. 12).

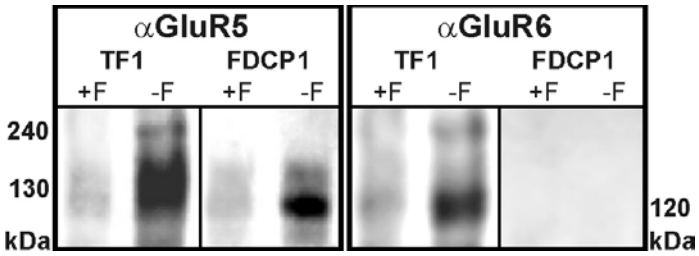


Abbildung 12: GluR5- und GluR6-Expression in myeloischen Vorläuferzellen

„Westernblot"-Analyse mit je 2-3 µg TF1- und FDCP1-Proteinextrakt. Die Zellen wurden mit (+F) und ohne (-F) Wachstumsfaktor kultiviert. Die isolierten Proteine wurden mit GluR5- (αGluR5) oder GluR6- (αGluR6) spezifischen Antikörpern detektiert.

Die induzierte Expression eines ~120 kDa großen GluR6-spezifischen Protein wurde nach Wachstumsfaktorentzug in TF1-, nicht aber in FDCP1-Zellen beobachtet. Neben monomerem GluR5 und GluR6 konnten mit beiden Antikörpern hochmolekulare Proteinkomplexe (~240 kDa) in TF1-Zellen nachgewiesen werden, bei denen es sich vermutlich um homo- oder heterodimere Rezeptorkomplexe handelt.

5.2.2.2. Proliferation nach Wachstumsfaktorentzug

Die Proliferation von TF1-Zellen ist abhängig von GM-CSF. Radioaktiv markiertes [^{3}H]Thymidin wird in neusynthetisierte genomische DNA eingebaut. Die Menge des inkorporierten [^{3}H]Thymidin ist abhängig von der Proliferation der Zellen. Die Wachstumsfaktor-Abhängigkeit der im Labor kultivierten TF1-Zellen wurde durch Analyse der [^{3}H]Thymidininkorporation überprüft (4.2.8.). Die Zellen wurden in Abwesenheit von GM-CSF kultiviert, zu verschiedenen Zeiten durch Zugabe von GM-CSF restimuliert und mit [^{3}H]Thymidin inkubiert. Die [^{3}H]Thymidininkorporation der restimulierten TF1-Zellen nahm mit der Dauer des Versuchs ab (Abb. 13A). Nach 30-35 h wurde eine 50 %-ige Reduktion der Zellteilung beobachtet. Der Einbau des [^{3}H]Thymidins war nach 60 h auf 5-10 % des Ausgangswerts zurückgegangen.

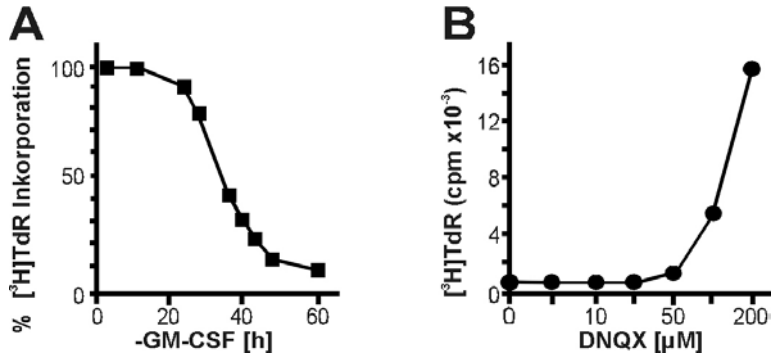


Abbildung 13: Proliferation von TF1 Zellen in Abwesenheit von GM-CSF
A: TF1-Zellen wurden ohne GM-CSF kultiviert und die Proliferation der Zellen nach Restimulierung durch [^{3}H]Thymidininkorporation untersucht. Die Werte sind in Prozent der maximalen Inkorporation angegeben.
B: Kultivierung von TF1-Zellen in Abwesenheit von GM-CSF für 30 h mit unterschiedlichen DNQX-Konzentrationen. Durchführung wie in A.

Das Wachstum der TF1-Zellen war abhängig von der Stimulierung durch GM-CSF. Die Untersuchung der Proliferation von FDCP1-Zellen zeigte, dass Wachstumsfaktorentzug bereits nach 12 h (24 h) zu einer Reduktion der [^{3}H]Thymidininkorporation auf 50 % (10 %) des Ausgangswerts führte (Daten nicht gezeigt).

Nach Wachstumsfaktorentzug für 30 h exprimierten TF1-Zellen GluR5 und GluR6 (Abb. 12) und die Proliferation der Zellen nahm um ~50 % ab. Es wurde untersucht, ob die Abnahme der Proliferation auf die induzierte Expression der beiden Kainatrezeptoren zurückzuführen war. Die Zellen wurden deshalb für 30 h ohne GM-CSF, aber mit unterschiedlichen Konzentrationen des nicht kompetitiven Kainatrezeptor-spezifischen Antagonisten 6,7-Dinitroquinoxalin-2,3-dion (DNQX, Honore´ et al.,

1988) kultiviert. Die Zellen wurden restimuliert und mit [^{3}H]Thymidin inkubiert. Die [^{3}H]Thymidininkorporation war durch DNQX konzentrationsabhängig erhöht (Abb. 13B). Im Vergleich zur Kontrolle führte die Inkubation mit 200 µM DNQX zu einem 50-fachen Anstieg der Proliferation.

5.2.2.3. Induktion der Apoptose

Die reduzierte Proliferation nach Wachstumsfaktorentzug könnte zwei Ursachen haben. Die Zellen gehen in ein Ruhestadium über oder sie sterben. Die Morphologie der untersuchten Zellen und durchgeführte Tryphanblaufärbungen zeigten allerdings, dass die Apoptose in den Zellen induziert wurde.

Kalzium- und Magnesium-abhängige DNAsen bauen im Verlauf der Apoptose die genomische DNA ab. Ihre Aktivität führt zu einer internukleosomalen Fragmentierung der DNA. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA zeigt ein charakteristisches Bandenmuster (apoptotische Leiter). Für den Nachweis apoptotischer Leitern wurden TF1-Zellen in Abwesenheit von GM-CSF mit und ohne DNQX kultiviert. Die genomischen DNAs wurden isoliert (4.2.1.3.) und gleiche Mengen der DNAs in einem 2 %-igen Agarosegel aufgetrennt. Apoptotische Leitern konnten in Zellen beobachtet werden, die 48 h bzw. 72 h ohne GM-CSF kultiviert wurden (Abb.14).

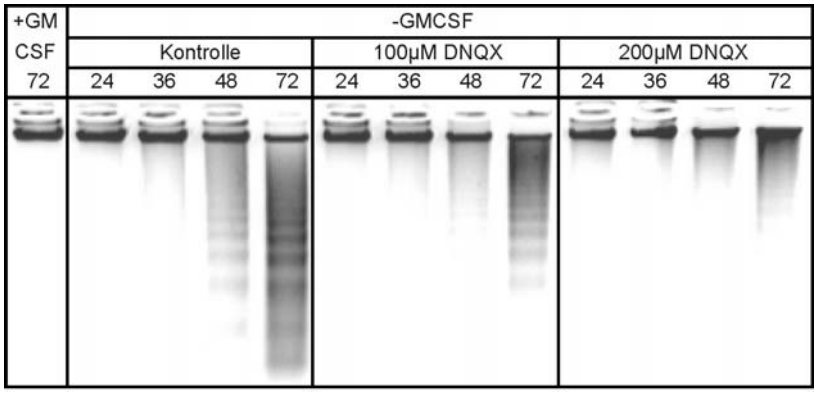


Abbildung 14: Reduzierte internukleosomale Fragmentierung durch DNQX
TF1-Zellen wurden unterschiedlich lang ohne GM-CSF mit 100 µM bzw. 200 µM DNQX und ohne DNQX (Kontrolle) sowie mit GM-CSF für 72h kultiviert. Die genomischen DNAs (5 µg) wurden in einem 2 %-igen Agarosegel aufgetrennt.

Die genomische DNA war noch intakt, wenn die Zellen für 72 h mit GM-CSF kultiviert wurden. Die Inkubation der Zellen mit 200 µM DNQX reduzierte die Menge der internukleosomal fragmentierten DNA nach 48h und 72h signifikant. Die Kultivierung der Zellen in Anwesenheit von 100 µM DNQX hatte einen intermediären Effekt.

Die Ergebnisse sollten mit parallel durchgeführten TUNEL-Analysen bestätigt werden. Diese Analysen sind als „terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling“ von Li und Darzynkiewicz (1995) beschrieben worden. Die TF1-Zellen wurden hierzu in Abwesenheit von GM-CSF ohne DNQX oder mit 200 µM DNQX kultiviert. Sie wurden anschließend fixiert und die internukleosomal fragmentierte DNA durch Terminale-Desoxyribosyl-Transferase mit 5-Bromo-2´-Deoxyuridin-5´-triphosphat (BrdUTP) markiert (4.2.5.). Die Zellen wurden anschließend mit einem BrdUTP-spezifischen und FITC-gekoppelten Antikörper inkubiert und die Zahl BrdUTP-positiver Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. TF1-Zellen, die 48h ohne GM-CSF inkubiert wurden (Kontrolle), zeigten einen Anteil BrdUTP-positiver, d.h. apoptotischer Zellen von 47 % (Abb. 15).

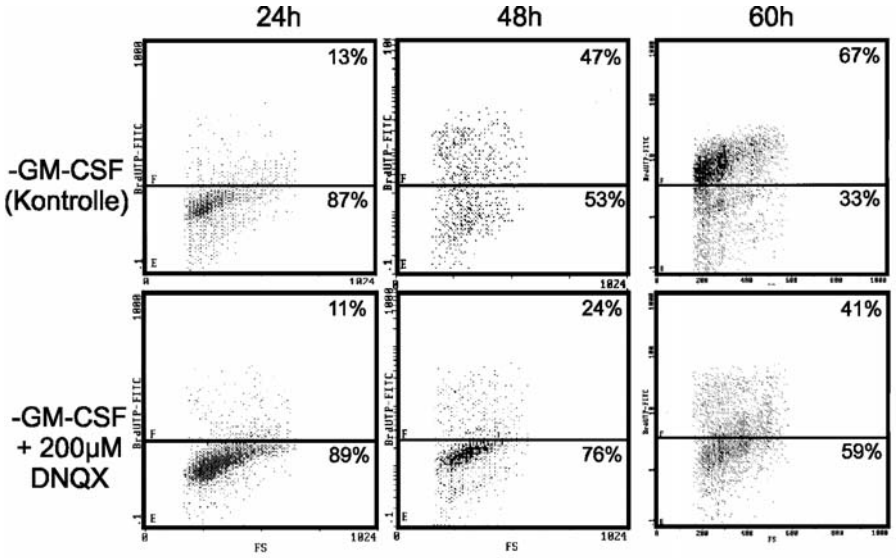


Abbildung 15: Reduzierte Anzahl BrdUTP-positiver Zellen durch 200 µM DNQX
TF1-Zellen wurden in Abwesenheit von GM-CSF ohne DNQX (Kontrolle) oder mit 200 µM DNQX kultiviert und der Anteil BrdUTP-positiver Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Fluoreszenz (BrdUTP-FITC, Y-Achse) von 8000-10000 Zellen wurde zusammen mit dem „forward light scatter“ (FS, X-Achse) gemessen.

Der Anteil apoptotischer Zellen stieg nach 60h auf 67 % an. Im Gegensatz dazu führte die Inkubation der Zellen mit 200 µM DNQX zu einem deutlich verringerten Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen nach 48 h (24 %) bzw. 60 h (41 %).

Die Induktion der Apoptose durch Wachstumsfaktorentzug und der Effekt des DNQX wurden auch in murinen FDCP1-Zellen untersucht. Wie in TF1-Zellen wurde durch Wachstumsfaktorentzug die Apoptose induziert, apoptotische Leitern bzw. BrdUTP-positive Zellen waren hier allerdings schon nach 12 h zu beobachten (Daten

nicht gezeigt). Auch konnte ein antiapoptotischer Effekt des DNQX nachgewiesen werden, der aber geringer ausgeprägt war (Daten nicht gezeigt).

TF1- und FDCP1-Zellen exprimierten nach Wachstumsfaktorentzug GluR5 und die Apoptose wurde induziert. Die Expression von GluR6 wurde nur in TF1-, nicht aber in FDCP1-Zellen beobachtet. In beiden Zellinien konnte die Induktion der Apoptose durch den Kainatrezeptor-spezifischen Antagonisten DNQX teilweise blockiert werden. Die Daten zeigen, dass die Expression des GluR5 nach Wachstumsfaktorentzug für die Induktion der Apoptose in TF1- und FDCP1-Zellen verantwortlich ist.

5.2.3. Kainatrezeptor-abhängige Proliferation von TF1-Zellen

Glutamat wird für die Kultivierung hämatopoetischer Zellen verwendet. Kontinuierlich wachsende TF1-Zellen exprimierten KA2 und GluR7. Es wurde vermutet, dass Kainatrezeptoren nicht nur eine Rolle für die Induktion der Apoptose, sondern auch für die Regulation der Proliferation in Anwesenheit von GM-CSF spielen könnten. Deshalb wurde untersucht, ob TF1-Zellen für ihr Wachstum Glutamat benötigen und ob hierfür die Funktion von Kainatrezeptoren notwendig ist. Die Zellen wurden hierzu für einen Tag mit GM-CSF und unterschiedlichen Glutamatkonzentrationen kultiviert und für 8 h mit [^{3}H]Thymidin inkubiert (4.2.8.). Die Dauer dieses Experiments betrug 24 h. Die Zellen zeigten eine erhöhte und nahezu identische, Dosis-abhängige Proliferation in Abhängigkeit von der Glutamat- oder Kainatkonzentration (Abb. 16A).

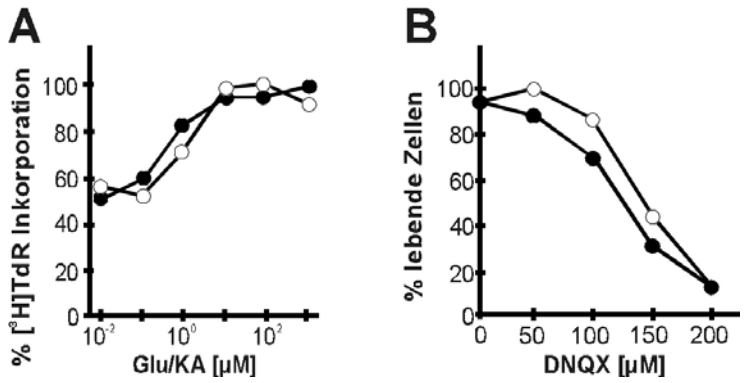


Abbildung 16: Kainatrezeptor-abhängige Proliferation von TF1- und 29A-Zellen
A: [^{3}H]Thymidininkorporation von TF1-Zellen, die 24h mit GM-CSF und unterschiedlichen Glutamat- (weiß) bzw. Kainatkonzentrationen (schwarz) kultiviert wurden. Die Werte sind in Prozent der maximalen Inkorporation angegeben.
B: TF1-Zellen (+GM-CSF, schwarz) und die Mutante 29A (-GM-CSF, weiß) wurden für drei Tage mit unterschiedlichen DNQX-Konzentrationen kultiviert. Die Zahl überlebender Zellen wurde durch Tryphanblaufärbung ermittelt und ist in Prozent der maximalen Zahl überlebender Zellen angegeben.

Dieses Ergebnis sollte durch Einsatz des Rezeptorantagonisten DNQX bestätigt werden. TF1-Zellen wurden hierzu in Anwesenheit von GM-CSF mit unterschiedlichen DNQX-Konzentrationen inkubiert. Die überlebenden Zellen wurden nach drei Tagen und Färbung mit Tryphanblau gezählt. Parallel dazu wurde auch die Wachstumsfaktor-unabhängige Mutante 29A analysiert. Es wurde beobachtet, dass die Zahl überlebender TF1- und 29A-Zellen mit steigender DNQX-Konzentration abnahm (Abb. 16B). Die Kultivierung mit ~130 µM DNQX reduzierte die Zahl überlebender Zellen um ~50 %.

Die kurzzeitige Proliferation kontinuierlich wachsender TF1-Zellen war abhängig von den Rezeptoragonisten Glutamat und Kainat. Der Antagonist DNQX blockierte das Wachstum der Zellen konzentrationsabhängig. Die Funktionen der Kainatrezeptoren und des GM-CSF-Rezeptors beeinflussten die Proliferation synergistisch und sind essentiell für das Überleben der Zellen. Die Inaktivierung GM-CSF-abhängiger Signaltransduktionskaskaden nach Wachstumsfaktorentzug führte zur GluR5-abhängigen Induktion der Apoptose in TF1-Zellen.

5.2.4. Stroma-abhängige Proliferation von TF1-Zellen

Die Frage war, ob ein Wechsel der Wachstumsbedingungen von einer Veränderung der Kainatrezeptor-abhängigen Proliferation abhängig ist. Deshalb wurden TF1-Zellen mit subletal bestrahlten MS-5-Stromazellen in Abwesenheit von GM-CSF kultiviert. Zunächst wurde untersucht, unter welchen Bedingungen MS-5-kokultivierte TF1-Zellen optimal proliferieren. Hierzu wurden TF1-Zellen in unterschiedlicher Dichte auf semikonfluenten, bestrahlten MS-5-Stromazellen ausgesät. Sie wurden in 96-Loch Kulturplatten ohne GM-CSF kultiviert und zu unterschiedlichen Zeiten mit [^{3}H]Thymidin inkubiert (4.2.8.). Die TF1-Zellen wuchsen in sehr engem Kontakt mit den Stromazellen (Abb. 17A). Die Analysen der [^{3}H]Thymidininkorporation zeigten, dass die Proliferation von der Dichte der TF1 auf den Stromazellen abhängt (Abb. 17B). In Abwesenheit von GM-CSF proliferierten $3x10^3$ TF1-Zellen pro Ansatz für mehr als drei Wochen. Eine Zellteilung bestrahlter Stromazellen war nach drei Tagen nicht mehr zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Apoptotische DNA-Leitern konnten in TF1-Zellen nachgewiesen werden, welche sich während der Kokultivierung von den Stromazellen ablösten (Daten nicht gezeigt).

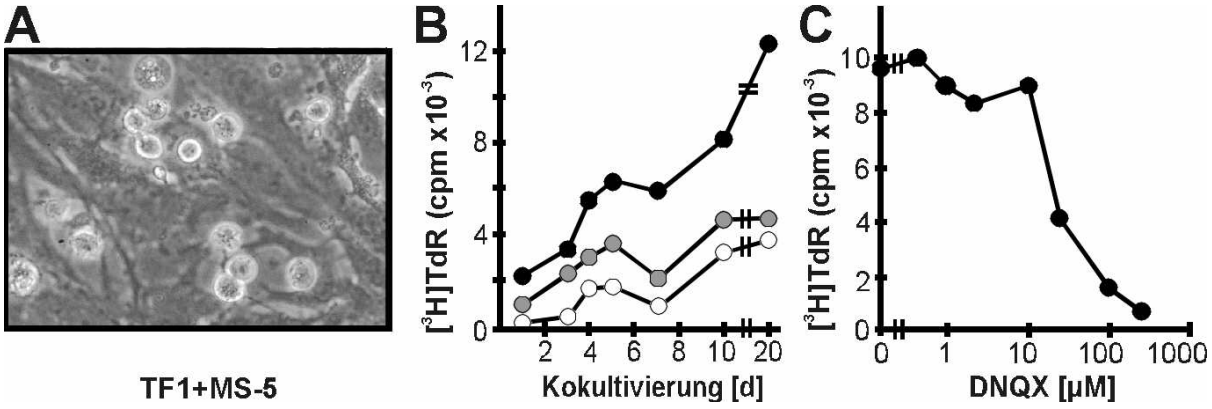


Abbildung 17: Kokultivierung von TF1- und MS-5-Stromazellen
A: Phasenkontrast-Photographie kokultivierter TF1-Zellen.
B: $3x10^3$ (schwarz), 10^3 (grau) und $3x10^2$ (weiß) TF1-Zellen pro Ansatz wurden unterschiedlich lang kokultiviert und anschließend mit [^{3}H]Thymidin inkubiert.
C: TF1-Zellen ($3x10^3$/Ansatz) wurden mit unterschiedlichen DNQX-Konzentrationen kokultiviert und nach drei Tagen mit [^{3}H]Thymidin inkubiert.

Für die Analyse der Kainatrezeptor-abhängigen Proliferation wurden die TF1-Zellen ($3x10^3$/Ansatz) in Anwesenheit unterschiedlicher DNQX-Konzentrationen mit MS-5-Zellen kultiviert und nach drei Tagen mit [^{3}H]Thymidin inkubiert. Die Proliferation MS-5-kokultivierter TF1-Zellen nahm durch DNQX konzentrationsabhängig ab (Abb. 17C).

Wachstumsfaktor-unabhängige Mutanten waren durch Kultivierung mit Virus-produzierenden Fibroblasten und anschließender Selektion ohne GM-CSF etabliert worden. Es wurde untersucht, ob die Kultivierung mit MS-5-Stromazellen die Etablierung autonom wachsender Zellinien ermöglicht. TF1-Zellen wurden hierzu für elf Tage mit MS-5-Zellen kultiviert und anschließend in Zellkulturagar kloniert (4.2.7.4.). Die Stroma-adherenten, aber auch Zellen, die sich vom Stroma abgelöst hatten, wurden in unterschiedlicher Zelldichte mit und ohne GM-CSF selektioniert. Die sich entwickelnden Zellklone wurden nach 2-3 Wochen gezählt. Kontinuierlich wachsende TF1-Zellen haben eine Klonierungseffizienz von 20-25 % in Anwesenheit von GM-CSF (B. Fehse, persönliche Mitteilung). Stroma-adherente, aber auch abgelöste TF1-Zellen hatten in Anwesenheit des Wachstumsfaktors eine Klonierungseffizienz von ~2 % (Tabelle 2). Im Gegensatz zu kontinuierlich wachsenden oder abgelösten TF1-Zellen entwickelten ~5 % der Stroma-adherenten TF1-Zellen Klone in Abwesenheit von GM-CSF.

	Zellzahl	+GM-CSF	-GM-CSF	% unabhängige Klone
TF1 +MS-5	$3x10^4$	541	30	
	$1x10^4$	182	8	4,8%
	$3x10^3$	72	3	
TF1 -MS-5	$3x10^4$	441	0	
	$1x10^4$	147	0	-
	$3x10^3$	42	0	

Tabelle 2: Etablierung Wachstumsfaktor-unabhängiger Mutanten nach Kultivierung mit MS-5-Stromazellen
TF1-Zellen wurden für elf Tage in Abwesenheit von GM-CSF mit MS-5-Stromazellen kultiviert. Die Stroma-adherenten (TF1+MS-5) bzw. abgelösten TF1-Zellen (TF1-MS-5) wurden in unterschiedlicher Zellzahl in Zellkulturagar kloniert. Sie wurden mit und ohne GM-CSF selektioniert und die sich entwickelnden Zellklone nach 2-3 Wochen gezählt. Der Anteil Wachstumsfaktor-unabhängiger Klone wurde für die verschiedenen Zellzahlen gemittelt.

Die Kultivierung von TF1-Zellen mit MS-5-Stromazellen oder Virus-produzierenden Fibroblasten ermöglichte die Etablierung Wachstumsfaktor-unabhängiger Mutanten. MS-5-kokultivierte TF1-Zellen proliferierten in Abwesenheit von GM-CSF, ohne das die Apoptose induziert wurde. Die Interaktion mit Oberflächenmolekülen der Stromazellen oder Fibroblasten könnte Signaltransduktionskaskaden aktivieren, die trotz Expression des GluR5 ein Überleben kokultivierter TF1-Zellen ermöglichen. Die Abrogation der Wachstumsfaktor-Abhängigkeit ist allerdings nur dann möglich, wenn die GluR5-abhängige Induktion der Apoptose nachhaltig blockiert werden kann. Es wurde daher im Folgenden analysiert, welcher Mechanismus hierfür verantwortlich sein könnte.

5.2.5. Nachweis von GluR5- und GluR6-Rezeptorkomplexen

Es wurde zunächst untersucht, ob die GluR5- und GluR6-mRNAs in 29A-Zellen translatiert werden. Für diese Analyse wurden Zellmembranextrakte hergestellt (4.2.4.). Die in diesen Extrakten enthaltenen Proteine wurden in 7,5 %-igen Polyacrylamidgelen (6 M Harnstoff) elektrophoretisch aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert (4.2.4.). Die Proteine wurden mit Antikörpern detektiert, die spezifisch für den carboxyterminalen Bereich des GluR5 (αG5) oder des GluR6

(αG6) sind. Neben dem monomeren GluR5 (120-130 kDa) wurde ein 200-220 kDa großer Proteinkomplex mit αG5 in 29A-Zellen nachgewiesen (Abb. 18).

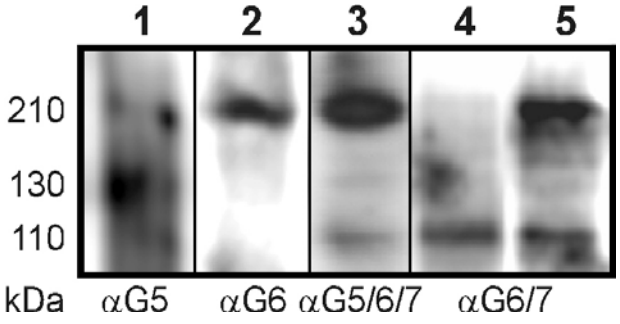


Abbildung 18: Expression von Kainatrezeptoren in 29A-Zellen
„Westernblot"-Analyse mit Proteinextrakten der Mutante 29A (1-3, 5) und kontinuierlich wachsender TF1-Zellen (4). Die transferierten Proteine wurden mit den angegebenen Antikörpern detektiert.

Ein ähnlich großer Komplex konnte auch mit αG6 detektiert werden. Es wurde keine monomere Form des GluR6 beobachtet. Auch mit einem aminoterminal-spezifischen GluR5/6/7- (αG5/6/7) bzw. carboxyterminal-spezifischen GluR6/7-Antikörper (αG6/7) wurden 200-220 kDa große Proteinkomplexe nachgewiesen. Mit αG5/6/7 wurden zudem geringe Mengen des monomeren GluR5 detektiert. Ein ~110 kDa großes Polypeptid wurde mit αG5/6/7 und αG6/7 nachgewiesen. Da es auch in kontinuierlich wachsenden TF1-Zellen beobachtet wurde (Abb. 18, Spur 4), handelt es sich bei dem Protein vermutlich um den monomeren GluR7.

Trotz Expression des GluR5 proliferierte die Mutante 29A. Daneben wurde die Zellteilung der Mutante, kontinuierlich wachsender TF1-Zellen und MS-5-kokultivierter TF1-Zellen durch DNQX gleichermaßen konzentrationsabhängig reduziert. Ungeachtet der unterschiedlichen Expression der Kainatrezeptoren, verhielten sich die Mutante und die kokultivierten Zellen wie kontinuierlich wachsende TF1-Zellen. Allerdings wiesen die GluR5-spezifischen Rezeptorkomplexe in der Mutante eine geringere Größe auf (200-220 kDa), als die in den TF1-Zellen nach Wachstumsfaktorentzug (~240 kDa). Es wird daher vermutet, dass in der Mutante heteromere Rezeptorkomplexe des GluR5 mit einer verkürzten, möglicherweise alternativ gespleißten, Rezeptorvariante gebildet wurden. Es wird auch angenommen, dass die beobachtete Komplexbildung die Funktion des GluR5 in der Mutante und in den MS-5-kokultvierten TF1-Zellen blockiert haben könnte.

5.2.6. Nachweis von GluR5- und GluR6-Spleißvarianten

Es wurden RNAs aus 29A, weiteren Mutanten und aus TF1-Zellen, die 20 Tage mit

MS-5-Stromazellen kultiviert wurden, isoliert. Die Transkription der Rezeptor-mRNAs wurde durch RT-PCR-Analysen untersucht (4.2.3.3.). Es wurden Oligonukleotide verwendet, mit denen die extrazellulären N-terminalen Domänen (NTD) amplifiziert werden konnten. Alternativ wurden die Regionen der Membrandomänen 1-3 (M1-3) amplifiziert (vgl. Abb. 10A). Die Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und mit klonierten, GluR-spezifischen und ^{32}Pi markierten cDNA-Fragmenten detektiert. Mit den N-terminal-spezifischen Oligonukleotiden konnte in allen Zellen je ein GluR5- und ein GluR6-spezifisches cDNA-Fragment nachgewiesen werden (Abb. 19).

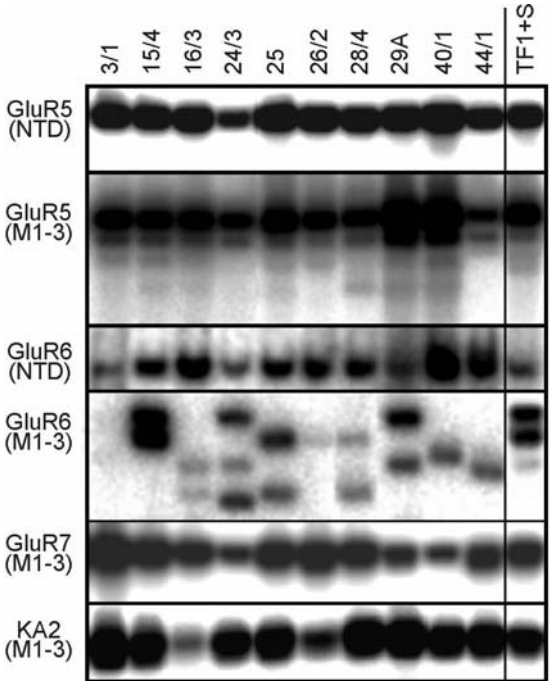


Abbildung 19: Identifikation alternativ gespleißter GluR5- und GluR6-mRNAs
RT-PCR-Analyse mit RNAs aus verschiedenen Mutanten und TF1-Zellen, die 20 d mit Stromazellen kultiviert wurden (TF1+S). Die NTD der Rezeptoren wurde mit 30 Zyklen und den Oligonukleotiden xp58/xp80 (GluR5) und dp103/xp44 (GluR6) amplifiziert. Die Region der M1-3 wurde mit 30 Zyklen und den Oligonukleotiden xp39/bp85 (GluR5), xp17/xp18 (GluR6), xp51/xp52 (GluR7) und xp53/xp48 (KA2) analysiert (Lother unveröffentlicht).

Durch die Amplifikation des Bereichs der M1-3 wurden in allen Proben ein ~900 bp großes, GluR5-spezifisches cDNA-Fragment nachgewiesen. Daneben wurden bis zu drei sukzessiv verkürzte Fragmente detektiert. Die Sequenzierung der Fragmente zeigte, dass alternativ gespleißte mRNAs revers transkribiert wurden. Das 891 bp große cDNA-Fragment entspricht einer vollständig transkribierten Rezeptor-mRNA. Die am höchsten transkribierte, 772 bp große Variante des GluR5 (ΔG5) entstand durch eine Deletion des 119 bp großen Exons 13 in der GluR5-mRNA (Hattori et al., 2000; Abb. 20A). Dies führt zu einer Verschiebung des offenen Leserahmens und zu einer vorzeitigen Termination der Translation. Die zusätzlich auftretenden GluR5-Varianten entstanden durch Deletion des 226 bp großen Exons 15 distal der M3

(665 bp) oder durch Deletionen beider Exone (546 bp).

Die Analyse mit GluR6-spezifischen Oligonukleotiden zeigte ein deutlich heterogeneres Muster der Amplifikation im Bereich der Domänen M1-3 (Abb.19). In den Mutanten 29A, 24/3, 15/4 und in MS-5-kokultivierte TF1-Zellen wurde ein ~900 bp großes, GluR6-spezifisches cDNA-Fragment beobachtet. Daneben wurden weitere verkürzte Varianten amplifiziert. In den übrigen Mutanten konnten ausschließlich verkürzte Fragmente detektiert werden. In der Mutante 3/1 war überhaupt kein cDNA-Fragment zu beobachten. Sequenzanalysen zeigten, dass das 891 bp große cDNA-Fragment einer vollständig transkribierten Rezeptor-mRNA entspricht. Sie zeigten auch, dass die größte GluR6-Variante (ΔG6) eine grundsätzlich ähnliche Struktur hatte wie ΔG5 (Abb. 20A). Die Deletion des Exons 13 führt auch hier zu einer Verschiebung des offenen Leserahmens und zu einer vorzeitigen Termination der Translation. Die zusätzlich detektierten GluR6-Varianten wiesen teilweise ähnliche Strukturen auf, wie die entsprechend großen GluR5-Varianten. Daneben wurden aber auch Varianten generiert, die intronische DNA-Sequenzen aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Der Anteil alternativ gespleißter GluR5-Varianten betrug insgesamt nur rund 30 % der gesamten GluR5-mRNA. Dieses Verhältnis war im Falle des GluR6 deutlich zu Gunsten der alternativ gespleißten Varianten verschoben. Das Muster der Amplifikation beider Rezeptoren variierte in verschiedenen RNA-Präparationen der gleichen Zellinie (Daten nicht gezeigt). Daneben konnten in allen Zellen KA2- und GluR7-mRNAs nachgewiesen werden (Abb. 19). Ein alternatives Spleißen dieser Rezeptoren wurde nicht beobachtet.

Die Deletion des Exons 13 führte zur Expression trunkierter GluR5 und GluR6 Rezeptorvarianten (Abb. 20). Den Proteinen fehlen die M2-4, die S2-Domäne sowie der gesamte carboxyterminale Bereich. Die Rezeptorvarianten können nicht aktiviert werden, da für die Bindung des Liganden sowohl S1 als auch S2 benötigt werden (Kuusinen et al., 1995). Die M2-Domäne ist ebenfalls nicht vorhanden. Da sie aber für die Bildung der Kanalpore essentiell ist (Sutcliffe et al., 1996), können beide Rezeptorvarianten keine Ionentransportfunktionen haben. In beiden Varianten wird sowohl die in der NTD lokalisierte Oligomerisierungsdomäne (Kuusinen et al., 1999; Leuschner und Hoch, 1999), als auch die M1-Domäne kodiert, die eine Verankerung des Proteins in der Zellmembran erlauben sollte.

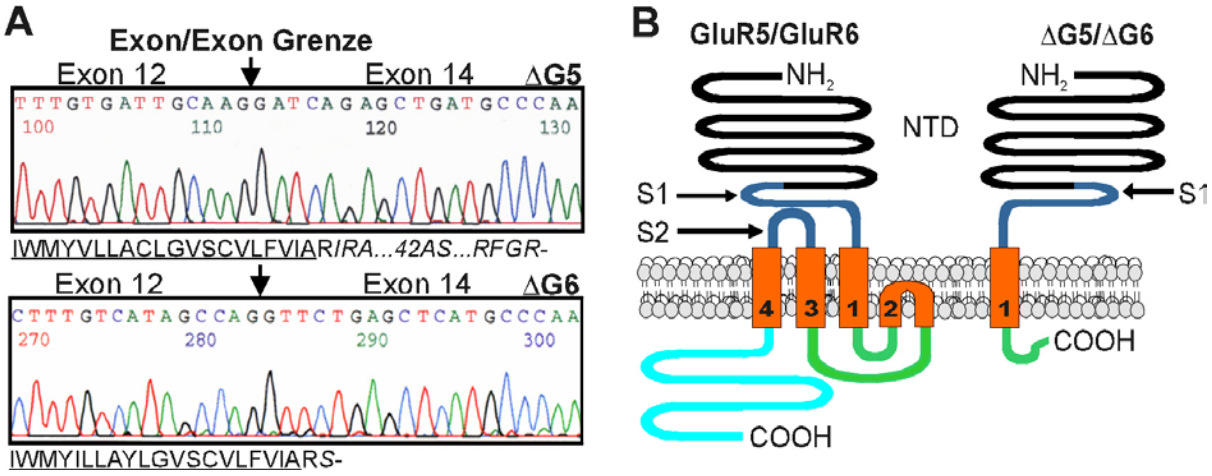


Abbildung 20: Struktur alternativ gespleißter GluR5- und GluR6-Varianten
A: Ergebnis der Sequenzierung der Rezeptorvarianten ΔG5 (oben) und ΔG6 (unten). In beiden Fällen wurde die Deletion des Exon 13 nachgewiesen. Die abgeleitete Aminosäuresequenz distal der M1 (unterstrichen) und die Position des vorzeitigen Stopkodons ist angegeben, veränderte Aminosäuren (AS) sind kursiv dargestellt.
B: Schematische Darstellung der monomeren Untereinheiten GluR5/GluR6 und ΔG5/ΔG6. Die S1- und S2-Domäne, M1-4, die NTD und intrazelluläre Bereiche des Rezeptors sind angeordnet (verändert nach Dingledine et al., 1999).

Es wurde vermutet, dass die Transkription des GluR5, GluR6 und der Spleißvarianten auch in primären und etablierten leukämischen Zellen nachzuweisen ist. Für die Analyse der Transkription wurden die RNAs aus Wachstumsfaktorunabhängigen, promyeloischen K562- und HL60-Zellen sowie aus mononukleären Zellen verschiedener AML-Patienten (D.K. Hossfeld, Hamburg) isoliert. Daneben wurden auch die RNAs peripherer Blutzellen eines gesunden Probanden und mononukleärer Zellen eines Patienten analysiert, der an chronisch myeloischer Leukämie (CML) erkrankt war. Die RNAs wurden revers transkribiert und die cDNAs mit Oligonukleotiden spezifisch für den Bereich der M1-M3 amplifiziert. Die cDNA-Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und mit klonierten, GluR-spezifischen und ^{32}Pi markierten cDNA-Fragmenten detektiert. Außer in HL60, konnte die Transkription des GluR5 in allen untersuchten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 21). Allerdings wurde nur in AML3 eine GluR6-mRNA beobachtet. In AML1 konnte die Transkription des GluR5 erst nach *ex vivo* Kultivierung (3 d) mit Wachstumsfaktoren (10 ng/ml „stem cell factor“, 3 ng/ml IL 1b und 20 ng/ml IL 3) und anschließendem Wachstumsfaktorentzug (24 h) beobachtet werden. Die Transkription in AML1 entspricht also der in murinen FDCP1-Zellen (vgl. Abb. 12).

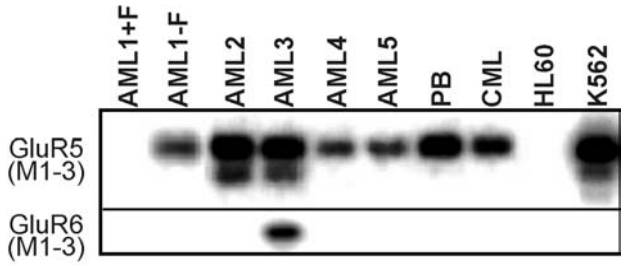


Abbildung 21: Transkription von GluR5 und GluR6 in leukämischen Zellen
RT-PCR-Analyse mit RNAs der angegebenen Zellen. Die cDNAs wurden mit den Oligonukleotiden xp39/bp85 (GluR5), xp17/18 (GluR6) und 30 Zyklen amplifiziert. AML2-5, periphere Blutzellen (PB) und Zellen eines CML-Patienten wurden direkt für die RNA-Isolierung eingesetzt. Die RNAs der AML1-Proben wurden aus Zellen isoliert, die drei Tage mit (+F) und anschließend für 24 h ohne (-F) Wachstumsfaktoren *ex vivo* kultiviert wurden.

In AML2, AML3 und K562-Zellen konnte neben einer vollständig transkribierten mRNA (891 bp), auch ein verkürztes GluR5-spezifisches cDNA-Fragment nachgewiesen werden (772 bp). In K562-Zellen wurde ein zusätzliches verkürztes Fragment (665 bp) beobachtet. Die Sequenzierung der cDNA-Fragmente zeigte, dass ihre Struktur den zuvor nachgewiesenen Spleißvarianten entsprach.

Die Transkription des GluR5, GluR6 und alternativ gespleißter mRNAs wurde in TF1-Mutanten und MS-5-kokultivierten TF1-Zellen sowie primären und etablierten leukämischen Zellen nachgewiesen. In den Rezeptorvarianten ΔG5 und ΔG6 wird die in der NTD lokalisierte Oligomerisierungsdomäne kodiert. Sie sind also vermutlich in der Lage Heteromere mit GluR5 und GluR6 auszubilden. Die trunkierten Rezeptorvarianten haben aber keine Ionentransportfunktion. Daher wird vermutet, dass eine mögliche Komplexbildung die Funktion des GluR5 blockieren und die GluR5-abhängige Induktion der Apoptose abrogieren könnte.

5.2.7. Abrogation der GluR5-abhängigen Apoptose in Hek 293-Zellen

Die Bildung heteromerer Rezeptorkomplexe und die GluR5-abhängige Induktion der Apoptose sollte in einem heterologen Zellsystem untersucht werden. Hierzu wurden verschiedene Rezeptor-cDNAs in pcDNA3.1. kloniert (Lother unveröffentlicht). Distal der Lokalisationssequenzen („leadersequences“) wurden kurze DNA-Motive eingeführt, die verschiedene Peptid-Epitope kodieren. Die Expression von GluR5 (HA1), GluR6a (FLAG), ΔG5 und ΔG6 (beide c-Myc) wurde in einzelnen Hek 293-Zellen

durch Immunfluoreszenz-Technik analysiert. Mit Hilfe parallel durchgeführter Analysen der Zellmorphologie und Färbungen der Nuklei mit DAPI sollten Effekte der ektopen Expression auf die zelluläre Integrität untersucht werden. Es wurde zunächst geprüft, ob die Rezeptorvarianten exprimiert werden. Hierzu wurden Hek 293-Zellen mit äquimolaren Mengen der Expressionsplasmide und SuperFect Transfektion-Reagenz (Qiagen) transfiziert. Sie wurden nach 24 h fixiert, mit Epitop-spezifischen Antikörpern gefärbt und mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Expression aller vier Rezeptorvarianten konnte nachgewiesen werden (Abb. 22).

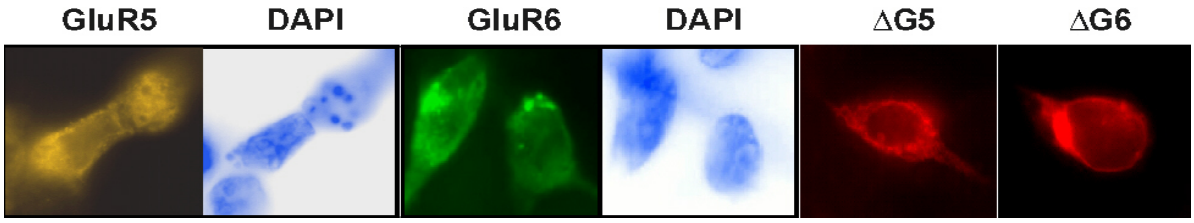
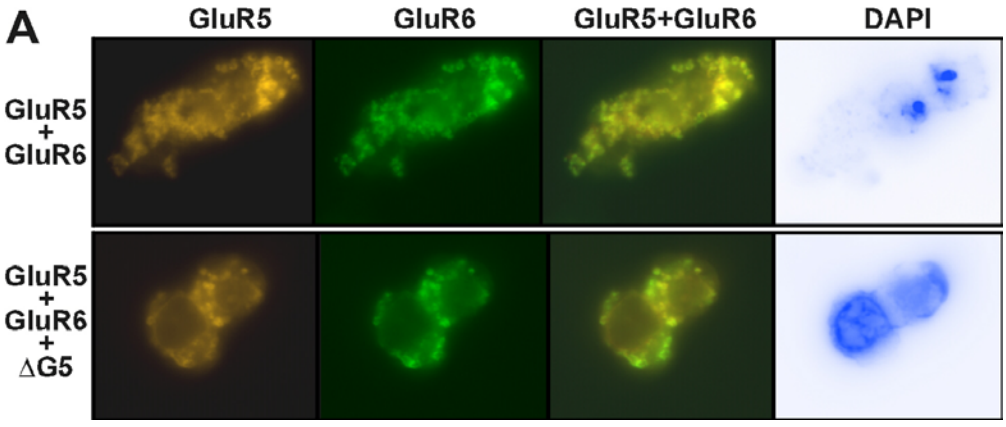


Abbildung 22: Ektope Expression verschiedener Rezeptorvarianten
Hek 293-Zellen wurden mit den angegebenen Rezeptor-cDNAs transfiziert und ihre Expression nach 24 h mit Immunfluoreszenz-Technik analysiert. Die Zellen wurden mit αHA1 Rhodamin- (GluR5), αFLAG FITC- (GluR6a) und αc-Myc Cy3- (ΔG5, ΔG6) gekoppelten Antikörpern gefärbt. Für die Transfektionen mit GluR5 und GluR6 sind DAPI Färbungen der gleichen Zelle gezeigt.

Mit GluR5 transfizierte Zellen wiesen keine intakte Zellmorphologie auf und zeigten kondensierte Nuklei. Die Expression des GluR5 führte also auch in Hek 293-Zellen zur Induktion der Apoptose. Die Expression des GluR6a oder der trunkierten Rezeptorvarianten hatte keinen apoptotischen Effekt.

Die Kotransfektion der Hek 293-Zellen mit GluR5 und GluR6 führte ebenfalls zu einem Verlust der intakten Zellmorphologie, daneben konnten auch kondensierte Nuklei nachgewiesen werden (Abb. 23A).



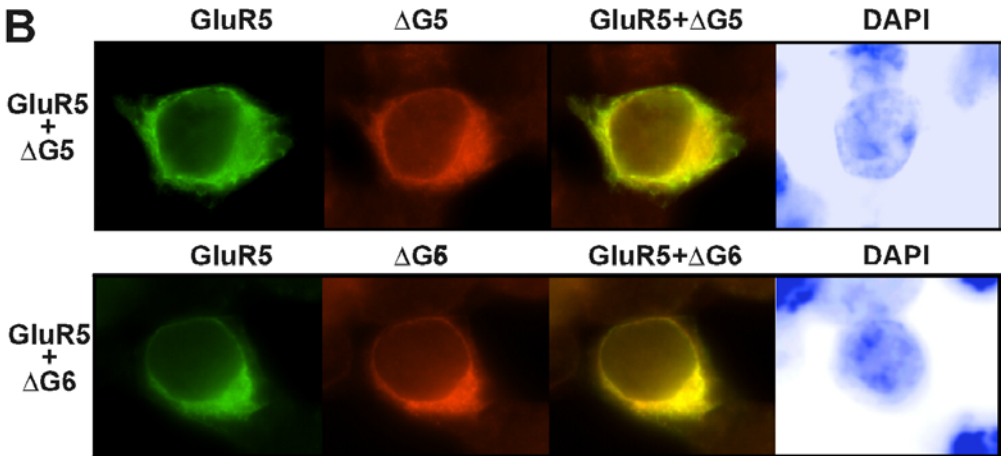


Abbildung 23: Kotransfektion verschiedener Rezeptorvarianten
A+B: Hek 293-Zellen wurden mit äquimolaren Mengen der angegebenen Rezeptor-cDNAs kotransfiziert und die Expression nach 24 h mit Immunfluoreszenz-Technik analysiert. Die Zellen wurden mit αHA1 Rhodamin- oder αHA1 FITC- (GluR5), αFLAG FITC- (GluR6a) und αc-Myc Cy3- (ΔG5, ΔG6) gekoppelten Antikörpern gefärbt. Für alle Kotransfektionen sind DAPI Färbungen der gleichen Zelle gezeigt.

Die GluR5-abhängige Induktion der Apoptose wurde durch die Expression des GluR6 nicht beeinflusst. Sie konnte jedoch durch die zusätzliche Expression des ΔG5 in einzelnen Zellen blockiert werden. Die durchgeführten Analysen zeigten zudem die teilweise Kolokalisation von GluR5 und GluR6a (Abb. 23A).

Es wurden weitere Kotransfektionen durchgeführt, um die Existenz heteromerer Rezeptorkomplexe nachzuweisen. Die Transfektion der Zellen mit GluR5 und ΔG5 zeigte die teilweise Kolokalisation beider Rezeptorvarianten (Abb. 23B). Die GluR5-abhängige Induktion der Apoptose wurde auch in diesen Zellen abrogiert, da sie eine intakte Morphologie der Zelle und der Nuklei aufwiesen. Die Kotransfektion von GluR5 und ΔG6 zeigte ein ähnliches Ergebnis.

Es wurde die Kolokalisation von ΔG5 und ΔG6 mit GluR5 in transfizierten Hek 293-Zellen nachgewiesen. Vermutlich führte die Ausbildung heteromerer GluR5/ΔG5- und GluR5/ΔG6-Rezeptorkomplexe in einzelnen Zellen zur Abrogation der GluR5-abhängigen Induktion der Apoptose. Es sollte untersucht werden, ob dieser Effekt auch in Massenkultur zu beobachten ist. Hierzu wurden Hek 293-Zellen mit äquimolaren Mengen der Expressionsplasmide und SuperFect Transfektion-Reagenz (Qiagen) transfiziert. Der zytotoxische Effekt der Expression verschiedener Rezeptorkombinationen wurde nach 24 h mit dem CytoTox 96 Non-Radioactive-Cytotoxicity-Assay (Promega) analysiert. Hierbei wird die Konzentration von Lactat-

dehydrogenase (LDH) kolorimetrisch bestimmt. Sie ist ein Maß für die relative Zytotoxizität, da apoptotische Zellen LDH in das Kulturmedium abgeben. Die höchste Zytotoxizität wurde beobachtet, wenn GluR5 alleine oder in Kombination mit GluR6a transfiziert wurde (Abb. 24).

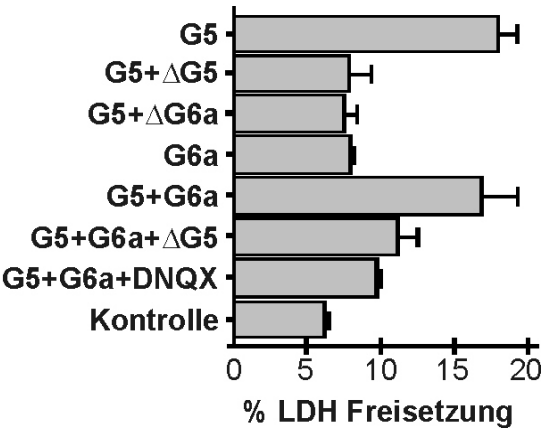


Abbildung 24: Zytotoxizität verschiedener Rezeptorkombinationen
Die Freisetzung von Lactatdehydrogenase (LDH) wurde in Hek 293-Zellen 24 h nach Transfektion äquimolarer Mengen der angegebenen cDNAs analysiert. Zur Abschätzung der basalen Zytotoxizität der Transfektion wurden Zellen analysiert, die mit pcDNA3.1. transfiziert wurden (Kontrolle). Abkürzungen: G5- GluR5; G6a- GluR6a (Lother unveröffentlicht).

Die Transfektion von GluR5 mit ΔG5 oder ΔG6 reduzierte die zuvor beobachtete Zytotoxizität des GluR5 um über 50 %. Die Abnahme war geringer, wenn neben GluR5 und ΔG5 auch GluR6a kotransfiziert wurde. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass ΔG5 auch mit GluR6a heteromerisiert und nicht vollständig für die Blockierung des GluR5 zur Verfügung steht. In Zellen, die nur mit GluR6a transfiziert wurden, konnte keine erhöhte Zytotoxizität beobachtet werden. Die Inkubation mit 200 µM DNQX reduzierte den zytotoxischen Effekt der GluR5-Expression ebenfalls. Dies bestätigte auch in Hek 293-Zellen den zuvor nachgewiesenen antiapoptotischen Effekt des DNQX.

In einem heterologen Zellsystem führte die Expression von GluR5 zum Zelltod. Die Expression von GluR6a hatte diesen Effekt nicht. Die trunkierten Rezeptorvarianten ΔG5 und ΔG6 waren in der Lage, die GluR5-abhängige Induktion der Apoptose in Hek 293-Zellen durch Bildung heteromerer Komplexe mit GluR5 teilweise zu blockieren.

5.2.8. ΔG5-Expression und Signaltransduktion des GM-CSF-Rezeptors

Die Ergebnisse der ektopen Expression in Hek 293-Zellen sollten durch retroviralen Gentransfer in einem myeloischen System überprüft werden. Es sollte zudem bewiesen werden, dass die GluR5-abhängige Induktion der Apoptose auch in TF1-

Zellen durch Heteromerisierung blockiert werden kann und dass Wachstumsfaktor-unabhängige Mutanten etabliert werden können.

5.2.8.1. Transduktion des ΔG5

Die cDNA des ΔG5 wurde in den retroviralen Vektor pM5neo (Bergemann et al., 1995) kloniert. Die Plasmide pMΔG5 (Abb. 25) und pM5neo wurden in Zellen der amphotropen Verpackungszellinie GP+*env*Am12 (GA-Zellen) elektroporiert (4.2.7.5).

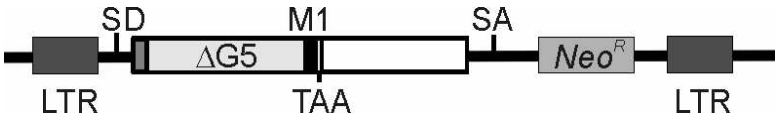


Abbildung 25: Struktur des retroviralen Vektors pMΔG5
Die LTRs, der offene Leserahmen des GluR5, die M1-Domäne und das vorzeitige Stopkodon sowie Spleißdonor (SD) und Spleißakzeptor (SA) sind schematisch dargestellt.

Die transfizierten Zellen wurden in Anwesenheit von G418 kloniert. Die sich entwickelnden Zellklone wurden nach 2-3 Wochen mit Trypsin/EDTA abgelöst und mit G418 expandiert. Die Anzahl der Plasmidintegrationen verschiedener Klone wurde durch „Southernblot"-Analyse überprüft (Daten nicht gezeigt). Für die anschließende Transduktion wurden Klone verwendet, die eine singuläre Plasmidintegration aufwiesen. TF1-Zellen wurden mit Virusüberständen des jeweiligen Klons infiziert (MOI 0,05; 4.2.7.6) und anschließend in Anwesenheit von G418 mit und ohne GM-CSF in Zellkulturagar kloniert (4.2.7.4.). Die sich entwickelnden Zellklone wurden nach 2-3 Wochen gezählt und mit G418 in Flüssigkultur expandiert. In der Kontrollinfektion (M5Neo) entwickelten sich unabhängige Klone in Anwesenheit von GM-CSF. Es konnten aber keine autonom wachsenden Klone nachgewiesen werden (Tabelle 3). Die Infektion der Zellen mit MΔG5 führte ebenfalls zum Wachstum unabhängiger, G418-resistenter Klone in Anwesenheit von GM-CSF (Klontyp A). Es entwickelten sich aber auch Klone durch Selektion ohne den Wachstumsfaktor (Klontyp B). Die Transduktion der Zellen mit ΔG5 führte zur Etablierung autonom wachsender Mutanten mit sehr hoher Frequenz (47 %). Im Vergleich zur Klonierung der TF1-Zellen nach Kultivierung mit MS-5-Stromazellen, war der Anteil Wachstumsfaktor-unabhängiger Klone um den Faktor 25 erhöht (vgl. Tabelle 2, S. 64).

	Zellzahl	+GM-CSF	-GM-CSF	% unabhängige Klone
MΔG5	$3x10^4$	120	63	
	$1x10^4$	35	17	47%
	$3x10^3$	18	5	
M5neo	$3x10^4$	130	0	
	$1x10^4$	48	0	-
	$3x10^3$	21	0	

Tabelle 3: Infektion von TF1-Zellen
Die Zellen wurden mit MΔG5 und M5neo infiziert und die angegebenen Zellzahlen in Anwesenheit von G418 mit und ohne GM-CSF kloniert. Die sich entwickelnden Zellklone wurden nach 2-3 Wochen gezählt. Der Anteil Wachstumsfaktor-unabhängiger Klone wurde für die verschiedenen Zellzahlen gemittelt.

Die Kolonien des Klontyps A zeigten die typische Morphologie von Vorläuferzellen der Granulozyten/Makrophagen-Entwicklungslinie (Abb. 26A). Im Gegensatz dazu waren Klone des Typs B deutlich kleiner und kompakter und sie entwickelten sich sehr langsam. Eine ähnliche Morphologie zeigten autonom wachsende Klone, die nach Kultivierung mit MS-5-Stromazellen etabliert wurden (Daten nicht gezeigt).

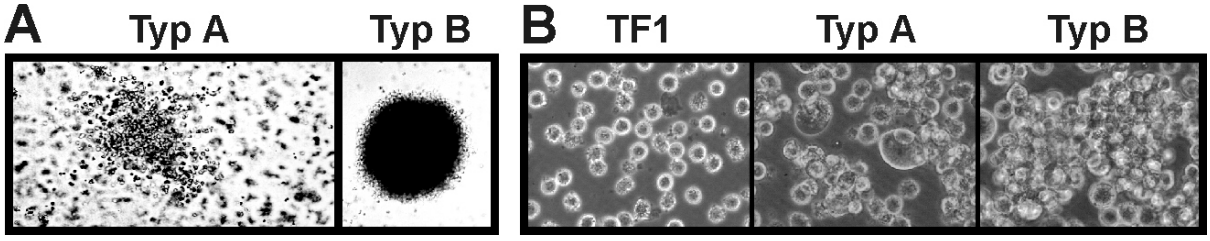


Abbildung 26: Etablierung Wachstumsfaktor-unabhängiger TF1-Mutanten
A: Photographien repräsentativer Zellklone, die in Zellkulturagar mit (Typ A) oder ohne GM-CSF (Typ B) selektioniert wurden.
B: Aufnahmen von TF1- und Klontyp A-Zellen, die mit GM-CSF und Klontyp B-Zellen, die ohne GM-CSF expandiert wurden.

Die Morphologie der Klone des Typs B in Zellkulturagar könnte auf eine gestörte Zellteilung zurückzuführen sein oder aber die Entwicklung der Klone ist von der Zelldichte abhängig. Eine ähnliche Wachstumscharakteristik konnte auch beobachtet werden, als die Klone expandiert wurden (Abb. 26B). Die Zellen des Klontyps A wuchsen trotz Anwesenheit von GM-CSF sehr heterogen in Flüssigkultur. Zudem wiesen einige Klone nach lang andauernder Kultivierung eine ähnliche Wachstumscharakteristik auf, wie die Klone des Typs B.

5.2.8.2. Expression von GluR5 und GluR6 in Klonen des Typs A und B

Die Klone des Typs A und B wurden charakterisiert. Es wurde zunächst untersucht, ob die Klone GluR5 und/oder GluR6 exprimierten. Die RNAs aus jeweils zehn Klonen des Typs A und B wurden isoliert und die Transkription durch RT-PCR-Analysen untersucht (4.2.3.3.). Im Falle des GluR5 wurde ein Oligonukleotid (bp66) verwendet mit dem ausschließlich der carboxyterminale Bereich des endogenen GluR5 amplifiziert werden konnte (vgl. Abb. 10A). Die Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und mit klonierten, GluR-spezifischen und ^{32}Pi markierten cDNA-Fragmenten detektiert. Die Transkription des endogenen GluR5 wurde in allen Klonen des Typs B nachgewiesen (Abb. 27). Sie war durch die Selektion der Klone ohne GM-CSF induziert worden. Alternative Spleißvarianten des carboxyterminalen Bereichs konnten in drei Klonen des Typs B (Nr. 8-10) nachgewiesen werden. Sie wurden auch in den zuvor analysierten Wachstumsfaktor-unabhängigen TF1-Mutanten beobachtet (Daten nicht gezeigt).

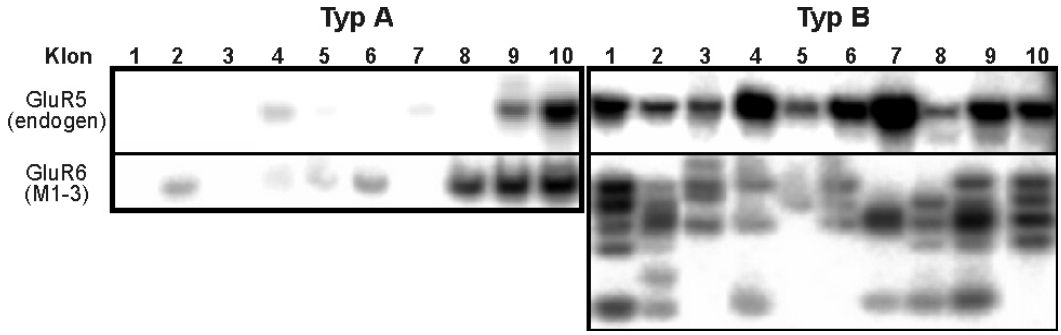


Abbildung 27: Transkription des GluR5 und GluR6 in Klonen des Typs A und B
Die RNAs von jeweils zehn verschiedenen Klonen wurden isoliert und die cDNAs mit 30 Zyklen und den Oligonukleotiden xp39/bp66 (GluR5 endogen) und xp17/xp18 (GluR6 M1-3) amplifiziert.

Daneben konnte in nahezu allen Klonen die Expression vollständig transkribierter GluR6-mRNAs und alternativ gespleißter Rezeptorvarianten beobachtet werden.

Klone des Typs A wurden in Anwesenheit von GM-CSF etabliert. Trotzdem wurde in einigen Klonen die Transkription des GluR5 und GluR6 nachgewiesen. Im Gegensatz zu Klonen des Typs B wurden allerdings keine alternativ gespleißten GluR5- oder GluR6-mRNAs beobachtet. Folglich muss es in diesen Klonen kurz vor der mRNA-Isolierung zur Induktion der Apoptose gekommen sein.

Die Selektion in Abwesenheit von GM-CSF führte in Klonen des Typs B zur Transkription von GluR5 und GluR6. Die Translation beider Rezeptoren sowie des

transduzierten ΔG5 wurde untersucht. Hierzu wurden Zellmembranextrakte (4.2.4.) aus pMΔG5-transfizierten GA-Zellen sowie Klonen des Typs A und B hergestellt. Die in diesen Extrakten enthaltenen Proteine wurden in 7,5 %-igen Polyacrylamidgelen (6 M Harnstoff) elektrophoretisch aufgetrennt, auf PVDF Membranen transferiert und mit dem aminoterminal-spezifischen GluR5/6/7-Antikörper (αG5/6/7) analysiert. In allen Proben wurden unterschiedliche Mengen eines ~85 kDa großen Polypeptids detektiert (Abb. 28). Bei dem detektierten Polypeptid handelte es sich um ektop exprimierten ΔG5, da seine Größe einerseits dem kalkulierten Molekulargewicht einer translatierten ΔG5-mRNA entsprach und es andererseits auch in transfizierten GA-Zellen nachgewiesen werden konnte.

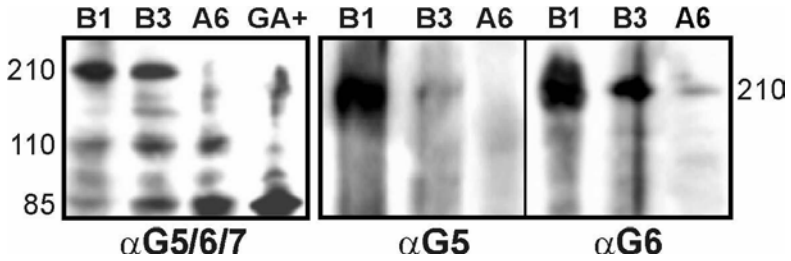


Abbildung 28: Nachweis heterodimerer Kainatrezeptor-Komplexe
Proteinextrakte der Klone A6 (Typ A), B1 und B3 (Typ B) sowie pMΔG5-transfizierter GA-Zellen (GA+) wurden transferiert und mit aminoterminal-spezifischen GluR5/6/7- (αG5/6/7) und carboxyterminal-spezifischen GluR5- (αG5) oder GluR6- (αG6) Antikörpern analysiert.

Daneben wurde in Klonen des Typs B ein 200-220 kDa großer Rezeptorkomplex mit αG5/6/7 detektiert. Hierbei handelt es sich höchstwahrscheinlich um Heterodimere des monomeren GluR5 (120-130 kDa, siehe Abb. 12) und des trunkierten ΔG5 (85 kDa). In Klonen des Typs A und transfizierten GA-Zellen konnte dieser Komplex nicht beobachtet werden (komplette Daten nicht gezeigt). Bei dem ebenfalls nachgewiesenen ~110 kDa großen Polypeptid handelt es sich um monomeren GluR7 (vgl. Abb. 18). In beiden Klontypen konnten keine monomeren Formen des GluR5 oder GluR6 beobachtet werden. Es wurden aber weitere, vermutlich degradierte oder alternativ gespleißte, Rezeptorvarianten beobachtet.

„Westernblot"-Analysen mit dem carboxyterminal-spezifischen GluR5-Antikörper zeigten in Klonen des Typs B einen ähnlich großen Rezeptorkomplex wie zuvor mit αG5/6/7. Daneben wurden die sehr schwach exprimierte, monomere Form des GluR5 beobachtet. Die Detektion mit dem carboxyterminal-spezifischen GluR6-

Antikörper wies einen ebenfalls 200-220 kDa großen Rezeptorkomplex nach. Es konnten allerdings keine monomeren Rezeptorproteine beobachtet werden.

5.2.8.3. GM-CSF Signaltransduktion nach ΔG5-Expression

Eine Abrogation der Wachstumsfaktor-Abhängigkeit kann auch durch die konstitutive Aktivität GM-CSF-abhängiger Signaltransduktionskaskaden ermöglicht werden. Es wurde deshalb untersucht, ob die Proliferation der Zellen weiterhin durch GM-CSF stimulierbar war. Hierzu wurden zehn Klone beiden Typs für drei Tage ohne GM-CSF kultiviert und. Sie wurden anschließend in Anwesenheit von [^{3}H]Thymidin für 12 h mit GM-CSF stimuliert oder weiter ohne GM-CSF kultiviert. Die Stimulierung führte zu einer signifikanten Erhöhung der Proliferation beider Klontypen. (Abb. 29).

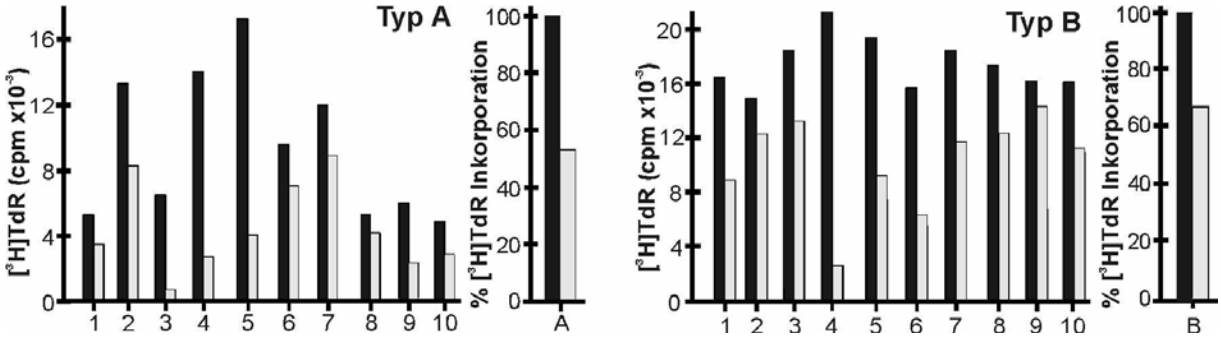


Abbildung 29: Proliferation von Klonen des Typs A und B
Jeweils zehn verschiedene Klone wurden 72 h ohne GM-CSF kultiviert und anschließend in Anwesenheit von [^{3}H]Thymidin für 12 h mit GM-CSF stimuliert (schwarz) oder weiter ohne GM-CSF kultiviert (grau). Die Ergebnisse der einzelnen Klone wurden für beide Klontypen gemittelt und sind in Prozent der maximalen gemessenen [^{3}H]Thymidininkorporation angegeben.

Wie erwartet, proliferierten Klone des Typs B auch in Abwesenheit des Wachstumsfaktors. Klone des Typs A proliferierten ebenfalls ohne GM-CSF, obwohl sie mit dem Wachstumsfaktor etabliert worden waren und die Proliferation parentaler TF1-Zellen nach drei Tagen kaum noch nachzuweisen war (vgl. Abb. 13). Es wird angenommen, dass in den Klonen des Typs A die Expression des GluR5 durch Wachstumsfaktorentzug induziert wurde. Die GluR5-abhängige Induktion der Apoptose konnte in diesen Klonen jedoch teilweise abrogiert werden, da auch diese Klone ΔG5 exprimierten. Die Proliferation der verschiedenen Klone zeigte deutliche Unterschiede. Sie ist vermutlich auf ein unterschiedliches Expressionsniveau des ΔG5 in den Klonen zurückzuführen.

5.3. *loxP*-Expressionsplasmide

Es wurden retrovirale Integrationen in verschiedenen Genen identifiziert, die eine Rolle in der Proliferation, Differenzierung und Apoptose hämatopoetischer Vorläuferzellen spielen könnten. Es war geplant, die Funktion verschiedener Gene in primären Knochenmarkstammzellen zu analysieren. Daher wurden Expressionsplasmide hergestellt, die eine effiziente Genexpression in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen ermöglichen sollten.

Die Expression eines Gens könnte zu einem veränderten Phänotyp der Zellen führen. Möglicherweise ist dieser Phänotyp revertierbar, wenn die Genfunktion wieder abgeschaltet wird. Allerdings könnte selbst eine vorübergehende Expression zu einer nachhaltigen Veränderung der Zelle führen. Vergleichende Analysen der Zellphysiologie vor, während und nach einer ektopen Expression waren geplant. Sie könnten Rückschlüsse auf die Funktionen exprimierter Gene und möglicherweise zusätzlich auftretender Mutationen für die Entwicklung leukämischer Erkrankungen erlauben.

Transfektionen von Plasmidvektoren durch Elektroporation oder Kalziumphosphat verändern die Zellphysiologie. Hingegen integrieren Retroviren natürlicherweise in das Genom der Wirtszelle. Die zu analysierenden Gene sollten daher durch retroviralen Gentransfer transduziert werden. Es war geplant das Cre-*loxP* System des Bakteriophagen P1 für die vorübergehende Expression der Gene einzusetzen. Dieses System ermöglicht eine reversible sequenzspezifische Rekombination (Dale und Ow, 1991). Die Infektion erlaubt zunächst die Expression des Gens in der Zelle. Die Transfektion mit einem Cre-Rekombinase kodierenden Plasmid führt zur Aggregation der *loxP*-Sequenzen. Das anschließende „crossing-over“ in der *loxP*-Kernregion führt zur Exzision des exprimierten Gens und die Funktion des Gens wird abgeschaltet.

5.3.1. Konstruktion von *loxP*-Expressionsplasmiden

Es wurde ein Plasmidvektor (pSFßloxIN) und ein retroviraler Vektor (prSFßloxIN) konstruiert. Die Expressionsplasmide waren modular aufgebaut und wiesen neben einer *loxP*-Sequenz folgende funktionelle DNA-Abschnitte auf:

1) Die LTR (prSFßloxIN) bzw. die U3-Region (pSFßloxIN) des F-SFFV (Friends „Spleen Focus-forming Virus“) ermöglicht eine effiziente Genexpression in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (Eckert et al., 1996).

2) Restriktionsschnittstellen für SalI und NotI sind statistisch selten im Genom vorhanden und ermöglichen die Klonierung vollständiger Genabschnitte oder cDNAs.
3) Die interne ribosomale Einstrittssequenz (IRES) des Poliovirus erlaubt die Transkription bicistronischer mRNAs von einem Promoter aus.
4) Das Neomycinresistenzgen ermöglicht eine Selektion von Säugetierzellen.
5) Das Polyadenylierungssignal des „Bovine Growth Hormon"-Gens in pSFβloxIN erlaubt die Prozessierung der prä-mRNA.

Die funktionellen DNA-Sequenzen wurden durch PCRs mit *Pfu* DNA-Polymerase amplifiziert (4.2.1.3.). Die verwendeten Oligonukleotide wurden anhand veröffentlichter DNA-Sequenzen synthetisiert. Es wurden zusätzliche Restriktionsschnittstellen in die Oligonukleotide eingeführt, um die Klonierung der Fragmente zu ermöglichen. Die amplifizierten DNA-Fragment wurden subkloniert, sequenziert und sukzessiv in pRC1 eingeführt (Abb. 30). Für die Klonierungen wurde ein Rekombinationsdefizienter *E. coli*-Stamm (Epicurian-*Coli*, Stratgene) verwendet.

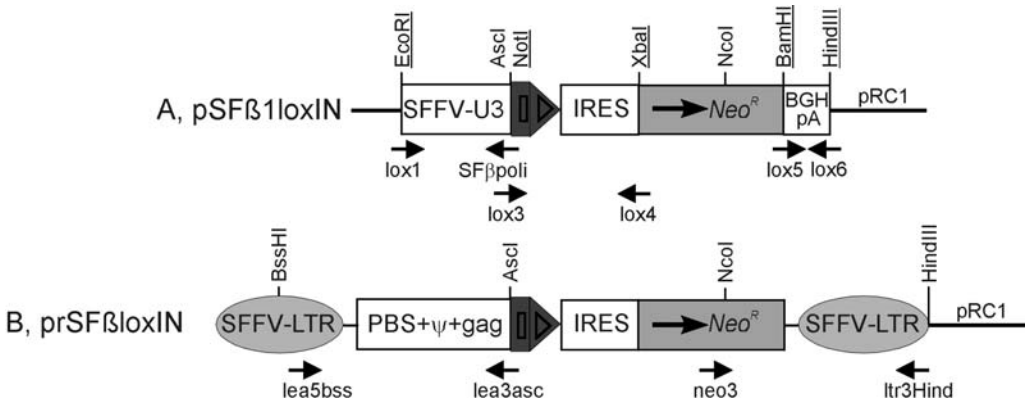


Abbildung 30: Konstruktion von pSFβ1loxIN und prSFβloxIN
A: Konstruktion von pSFßloxIN. Die funktionellen DNA-Sequenzen wurden mit den Oligonukleotiden lox1/Sfßpoli (SFFV-U3; Matrize pSFβCAT), lox3/4 (*loxP*+IRES; Matrize pSBC) und lox5/6 (BGHpA; Matrize pcDNA3.1.Zeo) amplifiziert. Die subklonierten Fragmente wurden durch die unterstrichenen Restriktionsschnittstellen sukzessiv in pRC1 kloniert. Das *Neo*^{R}-Fragment wurde direkt aus pMO1n mobilisiert.
B: Konstruktion von prSFßloxIN. Der 3´Bereich des *Neo*^{R} sowie die 3´LTR des F-SFFV wurden mit neo3/ltr3Hind amplifiziert (Matrize pSFβ1Neo). Das Fragment wurde über NcoI/HindIII Verdau in den zuvor hergestellten pSFßloxIN eingeführt. Hierdurch wurde das BGHpA durch eine LTR ersetzt. Die R/U5-Region der 5´LTR wurde zusammen mit der PBS, dem Verpackungssignal und dem 5´ Bereich des SFFV GagPol-Fusionsgens mit den Oligonukleotiden lea5bss/lea3bss amplifiziert (Matrize pSFβ1ΔCLNGFR). Das Fragment wurde mit BssHI/AscI verdaut. Die Erkennungssequenz des BssHI ist in der Restriktionsschnittstelle des AscI enthalten.

Daher konnte das Fragment in die AscI-Schnittstelle des pSFßloxIN kloniert werden. Hierdurch wurde die komplette 5´LTR des SFFV rekonstituiert (LTR=U3+R+U5). Abkürzungen: SFFV- „Spleen Focus-forming Virus“, IRES- interne ribosomale Einstrittssequenz, BGHpA- Polyadenylierungssignal des „Bovine Growth Hormon“-Gens, PBS- Oligonukleotid-Bindungs-Stelle, ψ- Verpackungssignal, gag- 5´ Bereich des SFFV GagPol-Fusionsgens

In beiden Konstrukten ist nur eine *loxP*-Sequenz vorhanden. Da die direkte Nachbarschaft zweier *loxP*-Sequenzen zu einer unerwünschten inter- oder intramolekularen Rekombination führen kann, wurde die Klonierung der Gene in zwei Schritten durchgeführt (Abb. 31).

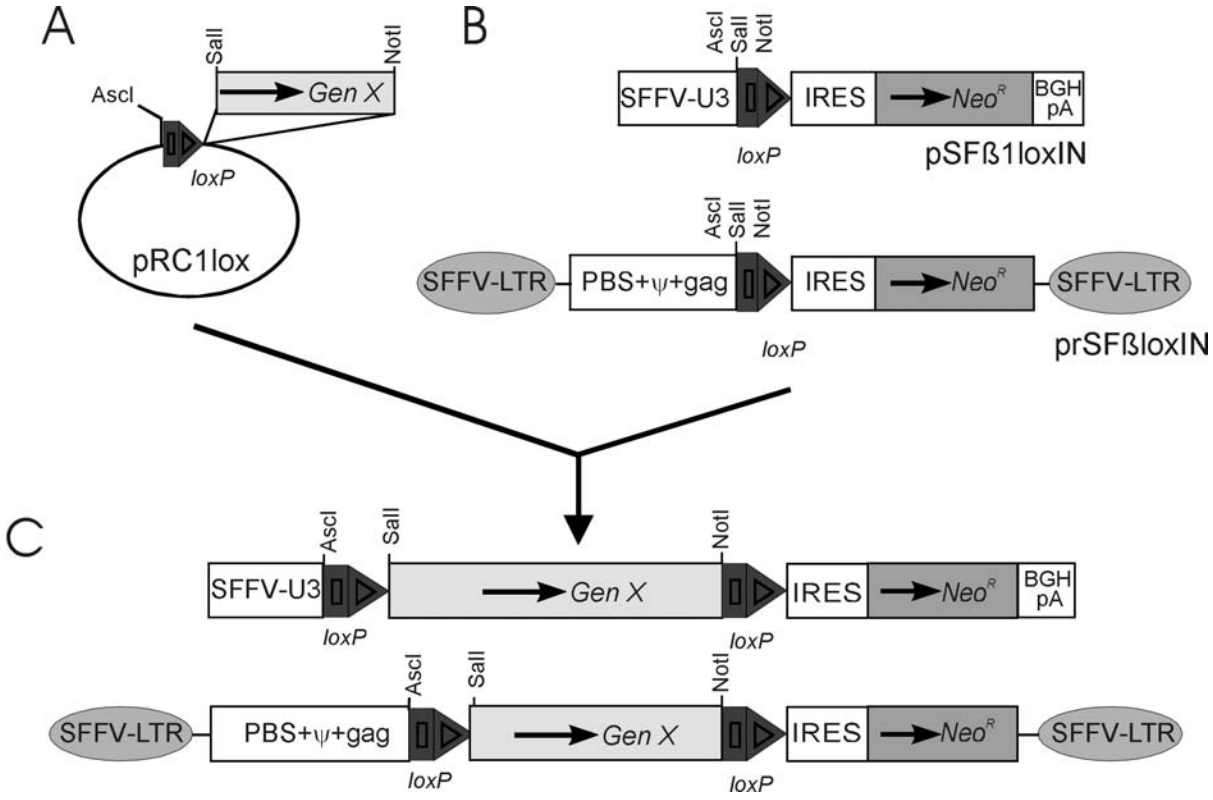


Abbildung 31: Klonierungsstrategie der *loxP*-Expressionsplasmide
Erläuterung siehe Text, Abkürzungen siehe Abb. 30.

Es wurde zunächst ein weiteres Plasmid (pRC1lox) konstruiert. Hierzu wurden angelagerte Oligonukleotide (oliloxa/oliloxB) mit EcoRI/SalI verdaut, isoliert und in pRC1 kloniert. Das entstandene Plasmid wies eine *loxP*-Sequenz auf, die im 5´Bereich durch eine AscI- und im 3´Bereich durch SalI- und NotI-Schnittstellen flankiert wurde. Die Gene wurden zunächst über einen SalI/NotI Restriktionsverdau in pRC1lox klo-

niert (Abb. 31A). Anschließend wurden sie zusammen mit der flankierenden 5´*loxP*-Sequenz über AscI/NotI mobilisiert und in pSFßloxIN bzw. prSFßloxIN (Abb. 31B) kloniert. In den entstehenden Expressionsplasmiden ist das Gen von zwei *loxP*-Sequenzen flankiert (Abb. 31C).

5.3.2. Funktionsanalyse von *loxP*-Expressionsplasmiden

Die Funktion der konstruierten Vektoren wurde überprüft. Eine trunkierte Version des humanen „low-affinity nerve growth factor receptor" (ΔLNGFR) wurde in pSFßloxIN und prSFßloxIN kloniert. Die Konstrukte (pSFßloxINΔ und prSFßloxINΔ) wurden in Cre-Rekombinase exprimierende *E. coli* elektroporiert und die Bakterien anschließend mit dem G418-Analog Kanamycin selektioniert. Die Plasmid-DNAs verschiedener Klone wurde isoliert, mit EcoRV linearisiert und elektrophoretisch aufgetrennt. In zehn von zwölf Klonen konnte eine vollständige Exzision der ~1 kb großen cDNA des ΔLNGFR nachgewiesen werden (Abb. 32).

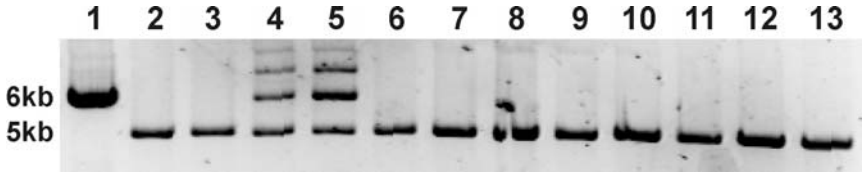


Abbildung 32: Spezifische Rekombination in *E. coli*
pSFßloxINΔ wurde in *E.coli* elektroporiert und die Bakterien mit Kanamycin selektioniert. Die Plasmid-DNA von zwölf Klonen (2-13) wurde isoliert, mit EcoRV linearisiert und elektrophoretisch aufgetrennt. In Spur 1 wurde das untransfizierte Plasmid mit EcoRV linearisiert.

Die sequenzspezifische Rekombination führte zu einer Verkürzung des linearisierten pSFßloxINΔ von 6 kb auf 5 kb. In zwei Klonen (4 und 5) war die Rekombination unvollständig. Es traten hochmolekulare linearisierte Plasmide auf, bei denen es sich vermutlich um intermolekular rekombinierte DNAs handelt. Die Analyse des retroviralen Vektors prSFßloxINΔ zeigte ein ähnliches Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

Vorläufige Funktionsanalysen in myeloischen Vorläuferzellen und Fibroblasten zeigten, dass die konstruierten Expressionsplasmide eine ektope Expression erlauben. Daneben konnten die Genfunktionen durch sequenzspezifische Rekombination abgeschaltet werden. Die *loxP*-Expressionsplasmide können also in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen eingesetzt werden, um die Funktion verschiedener Gene in der Tumorprogression zu analysieren.

6. Diskussion

Ionotrope Glutamatrezeptoren sind an der neuronalen Signaltransmission, der neuronalen Entwicklung und der Entstehung neuronaler Erkrankungen beteiligt. Aufgrund ihrer pharmakologischen Charakteristika werden sie in NMDA-Rezeptoren, AMPA-Rezeptoren und Kainatrezeptoren eingeteilt. Die Expression von Kainatrezeptoren außerhalb des ZNS wurde in embryonalen Stammzellen, aber nicht in Stammzellen des hämatopoetischen Systems oder von diesen abgeleiteten Blutzellen nachgewiesen. Es wurde jedoch gezeigt, dass murines Knochenmark und humane Megakaryozyten funktionelle NMDA-Rezeptoren exprimieren (Genever et al., 1999). Die Blockierung der Rezeptorfunktionen beeinträchtigt die Differenzierung der Megakaryozyten. Die Autoren nehmen an, dass heteromere Rezeptorkomplexe, wie auch in neuronalen Zellen, für die Funktionen der Rezeptoren verantwortlich sind.

In der vorliegenden Arbeit wird die Expression verschiedener Kainatrezeptoren in Knochenmarkstammzellen, hämatopoetischen Vorläuferzellen, etablierten leukämischen und AML-Zellen beschrieben. Da neuronale Vorläuferzellen Kainatrezeptoren exprimieren (Gallo et al., 1995), untermauern die hier dargestellten Ergebnisse die Plastizität von Stamm- und Vorläuferzellen unterschiedlicher Gewebe (Bjornson et al., 1999; Priller et al., 2001; Terskikh et al., 2001). Dies wird insbesondere durch Sequenzanalysen bestätigt, die zeigten, dass Kainatrezeptoren in hämatopoetischen Zellen exprimiert werden, die auch in neuronalen Zellen nachgewiesen wurden. Es ist daher anzunehmen, dass die in dieser Arbeit vorgestellten Befunde funktionelle Parallelen in der Entwicklung und der Erkrankung dieser Zellsysteme aufzeigen.

6.1. Expression und Funktion von Kainatrezeptoren in normalen Blutzellen

In ruhenden Knochenmarkstammzellen wird nur der KA2-Rezeptor exprimiert. Dieser Rezeptor bindet Kainat mit hoher Affinität, aber seine alleinige Expression in heterologen Expressionssystemen erlaubt keinen Ionentransport (Dingledine et al., 1999). Allerdings bindet der carboxyterminale Bereich des KA2-Rezeptors in neuronalen Zellen SAP90 (Garcia et al., 1998). Es wurde gezeigt, dass die Assoziation ionotroper Glutamatrezeptoren mit verschiedenen SAP die Interaktion der Rezeptoren mit Signalmolekülen ermöglicht, die auch durch SAP gebunden werden (Sheng und Pak, 2000). Beispielsweise ist die Proteinkinase Lyn in primären Nervenzellen

physikalisch mit AMPA-Rezeptoren assoziiert (Hayashi et al., 1999). Sie wird durch Inkubation der Zellen mit dem Rezeptoragonisten AMPA Kalzium-unabhängig aktiviert. Diese Befunde lassen vermuten, dass der KA2-Rezeptor in hämatopoetischen Stammzellen eine ähnliche Funktion übernehmen könnte. Insbesondere könnte dieses Protein aufgrund seiner Interaktionen mit SAP in der Lage sein Signaltransduktionskaskaden und direkt oder indirekt die Funktion von Glutamat-Transportern zu beeinflussen, die z.B. in Makrophagen exprimiert werden (Rimaniol et al., 2000). Dies würde die Regulation der extra- und intrazellulären Glutamatkonzentration wesentlich beeinflussen.

Knochenmarkstammzellen exprimieren nach einer kurzzeitigen *ex vivo* Kultivierung in Gegenwart von Wachstumsfaktoren KA2, GluR5, GluR6 und GluR7. Neben den NMDA-Rezeptoren spielen vermutlich auch diese Kainatrezeptor-Untereinheiten eine Rolle im Rahmen des zellulären Wachstums, der Differenzierung und des induzierten Zelltods. Da menschliche Knochenmarkstammzellen aus ethischen Gründen nur sehr bedingt für molekulargenetische und molekularbiologische Untersuchungen zur Verfügung stehen, wurden für weiterführende Funktionsstudien etablierte, hämatopoetische Vorläuferzellen verwendet. Die durchgeführten Analysen zeigten, dass GM-CSF-abhängige, humane TF1- aber auch IL-3-abhängige, murine FDCP1-Zellen die Untereinheiten KA2 und GluR7 exprimieren. Untersuchungen der Kurzzeit-Proliferation wiesen nach, dass diese Zellen für ihr Wachstum Glutamat benötigen und dass Glutamat mit nahezu identischer Wirkung durch Kainat ersetzt werden kann. Diese Ergebnisse zeigen, dass GM-CSF und Glutamat durch ihre jeweiligen Rezeptoren synergistisch wirken. Diese Annahme wurde durch die Inkubation der Zellen mit dem Kainatrezeptor-spezifischen Antagonisten DNQX bestätigt, da dieser das Zellwachstum blockiert, was zum Tod der Zellen führt. Folglich ist die Aktivität beider Rezeptoren für die Proliferation hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen essentiell.

Analysen mit heterologen Expressionssystemen zeigten, dass der KA2-Rezeptor zwar Kainat und Glutamat bindet, aber alleine keine Ionentransportfunktion hat. Der Einstrom von Kalzium bzw. Natrium in die Zelle ist nur in heteromerer Konfiguration mit GluR5, GluR6 und GluR7 möglich (Dingledine et al., 1999). Unter Berücksichtigung dieser Befunde bilden sich vermutlich heteromere KA2/GluR7- und/oder homomere GluR7-Komplexe (Schiffer et al., 1997) in TF1- und FDCP1-Zellen, die

durch Glutamat aktiviert werden und den Einstrom von Ionen erlauben. Es kann angenommen werden, dass die funktionellen Rezeptorkomplexe für die Ionen-Homöostase verantwortlich sind.

In kontinuierlich wachsenden TF1- und FDCP1-Zellen wurde eine KA2- und GluR7-, aber keine GluR5- oder GluR6-Expression gefunden. Der Entzug des Wachstumsfaktors führte in TF1-Zellen zur Expression des GluR5 und des GluR6. In FDCP1-Zellen wurde unter diesen Bedingungen die Expression des GluR5 beobachtet. Ungeachtet dieses Expressionsunterschiedes induzierte der Wachstumsfaktorentzug in beiden Zellinien die Apoptose. Der induzierte Zelltod konnte durch DNQX blockiert werden. Dieses Ergebnis wurde durch unterschiedliche Techniken bestätigt und zeigt, dass die Expression des GluR5 für die Apoptose verantwortlich ist. Diese Annahme konnte durch Expressionsanalysen mit Hek 293-Zellen untermauert werden. Diese Untersuchungen wiesen nach, dass die ektope Expression des GluR5, nicht aber die des GluR6, zur Induktion der Apoptose führt. Da die Expression des GluR6 nur in proliferierenden, aber nicht in ruhenden Knochenmarkstammzellen gefunden wurde, ist anzunehmen, dass die *ex vivo* Kultivierung nicht nur zum Zellwachstum und zur Apoptose, sondern auch zur Differenzierung der Zellen führt. Wesentlich für die Differenzierung scheint die Expression des GluR6 zu sein. Für diese Hypothese spricht, dass TF1-Zellen potentiell differenzierungsfähig sind (Chrétien et al., 1996). Im Gegensatz hierzu sind FDCP1-Zellen in ihrer Differenzierung blockiert (Dexter et al., 1980). Da Wachstumsfaktorentzug in FDCP1-Zellen, anders als in primären Knochenmarkstammzellen und in TF1-Zellen, zu einem sehr schnellen Zelltod führt, ist zu vermuten, dass das langsamere Eintreten des TF1-Zelltod, auf die GluR6-Expression zurückzuführen ist. Es ist anzunehmen, dass in diesen Zellen, wie auch in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen, Differenzierungssignale aktiviert werden. Erreicht eine solche Zelle jedoch keine weitere Differenzierungsstufe, da ihr hierfür die notwendigen Signale fehlen, so führt die eingeleitete Differenzierung zu einer verzögerten Apoptose. Ob die Differenzierung oder die Apoptose induziert wird, hängt von den Ionenimportfunktionen des GluR5 und GluR6 ab. Diese Funktionen werden insbesondere von der Kombination der Untereinheiten in den nativen Rezeptorkomplexen bestimmt (Dingledine et al., 1999). Expressionsanalysen zeigten, dass heteromere KA2/GluR5- und KA2/GluR6-Komplexe einen höheren Einstrom von Ionen erlauben als homomere GluR5- und

GluR6-Komplexe (Lerma et al., 2001). Darüber hinaus haben GluR7-Varianten, die alternativ gespleißte carboxyterminale Bereiche aufweisen, unterschiedliche Ionenimportfunktionen (Schiffer et al., 1997). Ob diese unterschiedlichen Eigenschaften auf eine direkte Beeinflussung der Kanalfunktionen zurückzuführen sind, ist nicht klar. Auch in hämatopoetischen Zellen wurde die Expression von Rezeptorvarianten mit alternativ gespleißten, bisher unveröffentlichten, carboxyterminalen Bereichen nachgewiesen (KA2a, GluR6a, GluR7a). Es ist daher anzunehmen, dass diese myeloischen Rezeptorvarianten mit zellspezifischen Signalmolekülen kommunizieren, die für die Regulation der Ionenimportfunktion zuständig sind. Die Kultivierung primärer Vorläuferzellen neuronaler Mikroglia (Oligodendrozyten) mit Kainat führt zu einer Kalzium-abhängigen Aktivierung der MAPK und zur Phosphorylierung des CREB (Pende et al., 1997). In Anlehnung an diese Befunde sollte die Aktivierung von Kainatrezeptoren auch in kontinuierlich wachsenden, hämatopoetischen Zellen zur einer regulierten, zellspezifischen Aktivierung Kalzium-abhängiger, Wachstumsunterstützender Signaltransduktionskaskaden führen.

Die selektive Aktivierung von Kainatrezeptoren erhöht die zytoplasmatische Kalziumkonzentration in neuronalen Gliazellen und induziert Apoptose (Alberdi et al., 2002). In Neuronen des Hippocampus führt die Inkubation mit Glutamat zu einer Kalzium-abhängigen Aktivierung des Calcineurin (Wang et al., 1999). Calcineurin ist in der Lage Bad zu dephosphorylieren. Dies ermöglicht die Translokation des Bad zur Mitochondrienmembran, die Heterodimerisierung von Bad und Bcl2 und die Induktion der Apoptose. Die Bildung homo- oder heteromerer GluR5-Komplexe in TF1- und FDCP1-Zellen könnte zu einem Anstieg der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration und zur Induktion der Apoptose geführt haben.

6.2. Abrogation der GluR5-abhängigen Apoptose

Die Assoziation nativer Rezeptorkomplexe wird einerseits von der Oligomerisierungsdomäne im N-terminalen Bereich der Untereinheiten bedingt (Ektodomän-abhängig; Kuusinen et al., 1999; Leuschner und Hoch, 1999). Andererseits wird auch eine Region benötigt, die M1-M3 und M4 sowie den carboxyterminalen Bereich der S2-Domäne umfasst (Ayalon und Bach, 2001). Die Ektodomän-abhängige Oligomerisierung ermöglicht zunächst die Bildung dimerer Rezeptorkomplexe. Die

zweite Domäne ist für die anschließende Assoziation der Dimere in native tetramere Rezeptorkomplexe verantwortlich (Ayalon und Bach, 2001).

Trotz Expression des GluR5 proliferieren Wachstumsfaktor-unabhängige TF1-Zellmutanten. Die Sequenzanalysen des GluR5 aus der Zellmutante 29A wiesen u.a. eine Deletion des Exons 13 nach. Die Deletion führt zu einer Verschiebung des offenen Leserahmens, zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation und zur Expression einer trunkierten Rezeptorvariante (ΔG5). Eine grundsätzlich ähnliche Spleißvariante wurde im Falle des GluR6 gefunden (ΔG6). Die Transfektion beider Spleißvarianten führte zu einer stabilen Expression von ΔG5 und ΔG6 in Hek 293. In Zellen, die mit ΔG5 und GluR5 oder aber mit ΔG6 und GluR5 transfiziert wurden, konnte die Kolokalisation beider Spleißvarianten mit GluR5 nachgewiesen werden. Hochmolekulare Proteinkomplexe wurden nach Transduktion des ΔG5 in Wachstumsfaktor-unabhängigen TF1-Mutanten beobachtet. Es ist anzunehmen, dass diese hochmolekularen Komplexe dimere ΔG5/GluR5-Komplexe bzw. ΔG6/GluR5-Komplexe darstellen. Angenommen wird auch, dass beide Spleißvarianten aufgrund der N-terminalen Oligomerisierungsdomäne mit GluR5 heterodimerisieren können. In den Spleißvarianten ist jedoch keine S2-Domäne vorhanden. Damit fehlt den trunkierten Proteinen die zweite Oligomerisierungsdomäne. Die beobachteten Heterodimere können, wenn überhaupt, nur sehr eingeschränkt native Rezeptorkomplexe ausbilden.

Die Transduktion des ΔG5 in TF1-Zellen ermöglichte die Selektion von Klonen in Abwesenheit von GM-CSF. In der Spleißvariante ist keine M2-Domäne vorhanden. Die M2-Domänen der oligomerisierten Untereinheiten bilden die Kanalpore nativer Rezeptorkomplexe (Sutcliffe et al., 1996). Selbst wenn es zu einer Assoziation der Dimere kommt, würde dies nur zur Bildung von tetrameren Rezeptorkomplexen führen, die keinen Ionenimport erlauben.

Die Ektodomän-abhängige Oligomerisierung der Spleißvarianten mit GluR5 verhinderte die Ausbildung funktioneller nativer Rezeptorkomplexe. Hierdurch wurde die GluR5-abhängige Apoptose in kotransfizierten Hek 293-Zellen und Wachstumsfaktor-unabhängigen Klonen des Typs B abrogiert. In den Klonen des Typs B wurden nur sehr geringe Mengen eines monomeren GluR5-spezifischen Proteins beobachtet. Es wird angenommen, dass GluR5 in diesen Zellen nahezu vollständig mit dem

sehr hoch exprimierten ΔG5-Protein assoziierte. In kotransfizierten Hek 293-Zellen reichte die äquimolare Menge des ektop exprimierten ΔG5 aus, um die Funktion des GluR5 vollständig zu blockieren. In den Mutanten, die nach der Kultivierung von TF1-Zellen mit Virus-produzierenden Fibroblasten selektioniert wurden, betrug der Anteil trunkierter GluR5-Varianten jedoch nur rund 30 %. Es ist nicht klar, ob diese Transkriptmengen ausreichen, um die Funktion des GluR5 vollständig zu blockieren. In den Mutanten wurden aber auch alternativ gespleißte GluR6-Varianten beobachtet. Die ektope Expression des ΔG6 in kotransfizierten Hek 293-Zellen führte ebenfalls zur Abrogation der GluR5-abhängigen Apoptose. Angenommen werden kann daher, dass auch die GluR6-Spleißvarianten die Ausbildung nativer GluR5-Komplexe blockieren, was die Etablierung der Wachstumsfaktor-unabhängigen Mutanten unterstützt haben könnte.

Wachstumsfaktor-unabhängige TF1-Mutanten waren durch Kultivierung mit Virus-produzierenden Fibroblasten etabliert worden (Stocking et al., 1993). In dieser Arbeit war eine Frequenz der spontanen Wachstumsfaktor-Unabhängigkeit von 5-6 x 10^{-8} beobachtet worden. Im Gegensatz dazu entwickelten sich durch Überstandsinfektion mit M5neo keine Wachstumsfaktor-unabhängigen Klone. TF1-Zellen sind jedoch in der Lage ohne GM-CSF zu proliferieren, wenn sie mit MS-5 Stromazellen kultiviert werden. Nach Kultivierung der TF1-Zellen mit MS-5 Stromazellen wurden Wachstumsfaktor-unabhängige Mutanten mit einer Frequenz von 1,25 x 10^{-5} selektioniert. Die Frequenz ist um den Faktor 4000-5000 höher als oben beschrieben. Schließlich wurde auch in MS-5-kokultivierten TF1-Zellen die Expression von GluR5 und GluR6 sowie alternativ gespleißter Varianten nachgewiesen. Hingegen konnten in TF1-Zellen keine Spleißvarianten nach Wachstumsfaktorentzug beobachtet werden.

Es ist anzunehmen, dass die Kultivierung von TF1-Zellen ohne GM-CSF, wie schon oben diskutiert, Differenzierungssignale aktivierte. Die Interaktion der TF1-Zellen mit Stromazellen oder Fibroblasten könnte alternative Wachstums-unterstützende Signaltransduktionskaskaden aktiviert haben. Die Stimulierung solcher Kaskaden könnte durch Integrine, membrangebundene und/oder sezernierte Wachstumsfaktoren der Stromazellen und Fibroblasten erfolgt sein. Im Anschluss wurden alternativ gespleißte GluR5- und GluR6-mRNAs gebildet. Die Expression der Varianten führte schließlich zur Abrogation der Wachstumsfaktor-Unabhängigkeit in

den kokultivierten Zellen. Der Unterschied in der Klonierungseffizienz zeigt, dass hämatopoetische Stromazellen die Etablierung Wachstumsfaktor-unabhängiger Klone deutlich besser unterstützten als Fibroblasten. Die Wachstumsfaktor-Unabhängigkeit wurde noch effizienter abrogiert, wenn ΔG5 in TF1-Zellen transduziert wurde. Die Zahl der Klone war um den Faktor 10 höher, als im Falle der Selektion nach Kultivierung mit Stromazellen.

6.3. Alternatives Spleißen

Das alternative Spleißen interner Exone des GluR5 und GluR6 führte in Wachstumsfaktor-unabhängigen TF1-Mutanten zur Blockierung der apoptotischen Funktion des GluR5. Das alternative Spleißen spielt auch eine Rolle bei der Entstehung der amyotrophen Lateralsklerose (ALS). Patienten, die an der sporadischen Form der ALS leiden, weisen eine reduzierte Expression des Glutamattransporters EAAT2 um 30-95 % auf (Rothstein et al., 1992, 1995; Shaw et al., 1994). Es kommt zu einem Anstieg der extrazellulären Glutamatkonzentration und zur einer exzitotoxischen Neurodegeneration von Motorneuronen. Lin et al. (1998) konnten zeigen, dass in 65 % der untersuchten Patienten EAAT2-Spleißvarianten auftraten, wobei 70 % der gesamten EAAT2-mRNA alternativ gespleißt ist. Expressionsanalysen *in vitro* wiesen nach, dass die Varianten keinen Glutamattransport ermöglichen und dass ihre Expression zu einer reduzierten Menge des EAAT2-Proteins führt. Das alternative Spleißen ist auch hier für einen dominant-negativen Effekt und die Abrogation einer essentiellen Genfunktion verantwortlich.

Das alternative Spleißen wird u.a. durch regulatorische Regionen der prä-mRNA (u.a. „exonic splice enhancer“, ESE) und ihre Interaktion mit Faktoren des Spleißapparats (u.a. SR-Proteinen), die auch zellspezifisch sein können, reguliert (Blencowe, 2000; Smith und Valcárcel, 2000). Die Expression alternativ gespleißter Isoformen ionotroper Glutamatrezeptoren ist abhängig von dem Zelltyp, Differenzierungsgrad der Zelle und ontogenetischen Entwicklungsstadium (Dingeldine et al., 1999). Daher müssen u.a. extrazelluläre Signale in die Regulation des alternativen Spleißens involviert sein. Komatsu et al. (1999) wiesen die Existenz spezifische SR-Proteine nach, die eine Funktion für die Regulation des alternativen Spleißen von AMPA-Rezeptoren haben. Eine modifizierte Expression von SR-Proteinen kann zur Generierung alternativer Spleißprodukte führen. In malignen Tumoren können Spleißvari-

anten des Adhesionsmolekül CD44 nachgewiesen werden (Cooper und Mattox, 1997). Die Proteinmengen verschiedener SR-Spleißfaktoren verändert sich während der Tumorprogression (Stickeler et al., 1999). Sie korrelieren mit der Expression einer CD44-Spleißvariante, die eine Funktion in der Metastase von Tumorzellen haben könnte. Kontinuierlich wachsende B-Zell Lymphomazellen exprimieren gleiche Mengen einer normalen und einer alternativ gespleißten Variante des Spleißfaktors SRp20 (Jumaa et al., 1997). Die Kultivierung der Zellen in Abwesenheit von Serum führt zu einer erhöhten Expression der Spleißvariante, während die Proteinmenge der normalen Variante abnimmt. Vermutlich haben diese alternativ gespleißten Varianten unterschiedliche Funktionen in der Regulation des Spleißvorgangs.

Möglicherweise kann die Regulation des alternativen Spleißens auch in TF1-Zellen auf extrazelluläre Signale zurückgeführt werden. Die Interaktion mit Stromazellen könnte zur Aktivierung verschiedener Signaltransduktionskaskaden führen, die Funktionen von SR-Proteinen oder den Zugang zu bestimmten Regulationssequenzen der mRNA beeinflussen. Auch der Wachstumsfaktorentzug selbst könnte, ähnlich wie die Kultivierung ohne Serum, zu einer veränderten Expression verschiedener Spleißfaktoren führen. Allerdings müssen hier zusätzliche Signale eine Rolle für das alternative Spleißen des GluR5 und GluR6 spielen, da TF1-Zellen in Abwesenheit von GM-CSF keine Spleißvarianten zeigen. In den Mutanten, die nach Kokultivierung mit Virus-produzierenden Fibroblasten etabliert worden waren, wurden neben alternativ gespleißten auch vollständige GluR5-mRNA exprimiert. Möglicherweise hat eine basale Aktivität des GluR5 selbst einen Einfluss auf die Regulation des Spleißvorgangs.

6.4. Tumorprogression

Mehrere aufeinander folgende genetische Veränderungen sind für die Progression leukämischer Erkrankungen verantwortlich (Hanahan und Weinberg, 2000). Primäre Knochenmarkzellen können *ex vivo* nur kurzfristig kultiviert werden. Ein internes Programm limitiert ihre Teilungshäufigkeit (Morrison et al., 1997). Genetische Veränderungen in einzelnen Zellklonen erlauben es Wachstumsfaktor-abhängige Zellinien, wie der erythroleukämischen TF1, zu selektionieren. Solche Zellinien haben ein unbegrenztes Zellteilungspotential, welches eine Eigenschaft von Tumorzellen ist (Hanahan und Weinberg, 2000). In Anwesenheit von GM-CSF entwickeln TF1-Zellen

Tumore in Mäusen (Thacker und Hodge, 1994). Ein sehr viel schnelleres Tumorwachstum wurde mit autonom wachsenden Zellklonen gefunden (Hu et al., 1998). Die Expression alternativ gespleißter Rezeptorvarianten stellt eine epigenetische Veränderung dar, die mit hoher Frequenz auftritt und die Abrogation der Wachstumsfaktor-Abhängigkeit ermöglicht. Dies ist ein weiterer Schritt in der Tumorprogression (Hanahan und Weinberg, 2000) und kann zur Entwicklung aggressiver Verlaufsformen der AML führen (Loewenberg et al., 1993).

In den Klonen des Typs A war der retrovirale Vektor integriert und ΔG5 wurde exprimiert. Trotzdem zeigten die Klone und TF1-Zellen eine sehr ähnliche Wachstumscharakteristik. Entsprechend wurde in den Klonen keine Expression des GluR5 oder des GluR6 nachgewiesen. Im Gegensatz zu TF1-Zellen starben diese Klone nicht, wenn sie in Abwesenheit des Wachstumsfaktors kultiviert wurden. Es kam zur Abrogation der GluR5-abhängigen Apoptose, da in ihnen die Spleißvariante ektop exprimiert wird.

Die etablierten Wachstumsfaktor-unabhängigen leukämischen Zellinien K562 und HL60 entwickeln Tumore in Mäusen (Cesano et al., 1992). Die Expression des GluR5 und GluR6 wurde in ihnen und in primären leukämischen Zellen verschiedener AML-Patienten untersucht. In K562 und Zellen zweier AML-Patienten wurde die Expression des GluR5 und alternativ gespleißter GluR5-mRNAs nachgewiesen. Vermutlich kann die Generierung der Spleißvarianten und die Abrogation der GluR5-abhängigen Apoptose eine Rolle in der Entstehung leukämischer Erkrankungen spielen. Daneben wurde jedoch auch die Transkription des GluR5, aber keiner Spleißvarianten, in Zellen zweier weiterer Patienten beobachtet. Es muss angenommen werden, dass die GluR5-abhängige Apoptose hier durch andere Mechanismen abrogiert werden konnte. Schließlich wurde in HL60 und den Zellen eines Patienten keine GluR5-Expression gefunden. Jedoch konnte die Transkription des GluR5 durch Kultivierung, in Anwesenheit von Zytokinen, und anschließendem Wachstumsfaktorentzug in den Zellen des Patienten induziert werden. Daneben wurde GluR6-mRNA nur in den Zellen eines Patienten nachgewiesen, in denen auch GluR5 und GluR5-Spleißvarianten gefunden wurden. Das unterschiedliche Expressionsmuster des GluR5 und GluR6 in den leukämischen Zellen lässt vermuten, dass Mutationen in unterschiedlichen Differenzierungsstadien auftraten und zur Progression, möglicherweise unterschiedlich aggressiver Verlaufsformen, der AML führten.

6.5. Retrovirale Integrationen und Funktionen der identifizierten Gene

Ausgangspunkt der oben beschriebenen Untersuchungen war die Identifikation von Genen mit proviralen Integrationen. Eine dieser retroviralen Integrationen war im Genlokus *GRIK1* (GluR5) erfolgt. Eine weitere wurde im Gen des Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptors Typ 3 (InsP3R3) gefunden. Es ist bekannt, dass die Kultivierung unreifer T-Lymphozyten mit dem Glucocorticosteroid Dexamethason zu einer erhöhten Expression des InsP3R3 und zur Induktion der Apoptose führt (Khan et al., 1996). Es war auch gezeigt worden, dass die ektope Expression einer komplementären InsP3R3-mRNA die Apoptose in einer leukämischen T-Zellinie abrogiert. Angenommen werden kann, dass die Aktivität beider Rezeptoren die zytoplasmatische Kalziumkonzentration reguliert und eine Rolle für die Regulation der Proliferation, Differenzierung und Apoptose hämatopoetischer Zellen spielt.

Weitere Analysen 3´proviral-flankierender Regionen hatten gezeigt, dass retrovirale Integrationen in den Genloci *NOS3* (endotheliale Stickstoffmonooxid-Synthetase, eNOS), *CCDN2* (Cyclin D2), *TBK1* („TANK-binding kinase“ 1), *E2F1* (E2F1-Transkriptionsfaktor und *VTG1* („virus tagged gene“ 1) erfolgt waren. Bekannt ist auch hier, dass die Expression dieser Gene oder aber die Aktivität der Genprodukte durch die zytoplasmatische Kalziumkonzentration beeinflusst wird. Beispielsweise ist die Funktion von Stickstoffmonooxid-Synthetasen von Calmodulin (Bredt, 1999) abhängig. Darüber hinaus führt der Anstieg der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration zu einer erhöhten Aktivität der konstitutiv exprimierten eNOS (Heales et al., 1999). Die ebenfalls konstitutiv exprimierte nNOS, ein neuronales Isoenzym von eNOS, wird in neuronalen Zellen durch die Aktivierung eines AMPA-Rezeptors stimuliert (Yun et al., 1998). Ob die Aktivität dieses Enzyms von Kainatrezeptoren modifiziert wird, ist bislang unklar. Es ist jedoch bekannt, dass hohe intrazelluläre NO-Konzentrationen einen negativen Einfluss auf die Atmungskette in den Mitochondrien haben (Heales et al., 1999). Eine solche Beeinflussung führt zu einem Energiedefizit der Zelle und zur Induktion der Apoptose.

Cyclin D2 und E2F1 spielen eine zentrale Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus. Die Aktivität beider Proteine ist für den G_1/S-Phase-Übergang essentiell. Transkriptionsfaktoren wie c-Fos, c-Jun und c-Myc sind in der Lage die Expression von Cyclin D2, E2F1 und anderen Zellzyklus-regulierenden Proteinen zu induzieren. Die Aktivität des Cyclin D2 wird durch seine Interaktion mit dem inhibitorischen Protein Kip1

(p27) kontrolliert. Das „Tumor-Suppressor"-Gen Rb (Retinoblastoma-Protein) bindet E2F1 und blockiert die E2F1-abhängige Genexpression. Die Aktivität des Cyclin D2 in der G_1-Phase erlaubt die Phosphorylierung des Rb. Dadurch wird die Interaktion mit E2F1 aufgehoben. Die Genexpression verschiedener Gene, deren Funktionen für die DNA-Synthese und Replikation in der S-Phase benötigt wird, kann durch E2F1 induziert werden. Die Expression des E2F1 ist erhöht, wenn Wachstumsfaktor-abhängige 32D.3-Zellen in Abwesenheit von IL-3 kultiviert werden (Eischen et al., 2001). Die ektope Expression des E2F1 in diesen murinen myeloischen Zellen inhibiert die Expression des Bcl2 und induziert die Apoptose.

TBK1 aktiviert den Transkriptionsfaktor NF-κB (Pomerantz und Baltimore, 1999). NF-κB ist im Zytoplasma durch Bindung eines inhibitorischen Proteins (IκB) inaktiviert. Die Stimulierung von Zellen, u.a. durch TNFα („Tumor necrosis factor α"), führt zur Phosphorilierung des Inhibitors durch TBK1, ermöglicht die Translokation des NF-κB in den Nukleus und aktiviert die Expression unterschiedlicher Gene (Ghosh et al., 1998). Die Funktion des NF-κB kann sowohl antiapoptotisch, als auch Apoptose-unterstützend sein (Foo und Nolan, 1999). Die Translokation des NF-κB wird in Rattengehirnen durch Antagonisten der NMDA-, AMPA-Rezeptoren und VGCC blockiert (Shen et al., 2002). Folglich könnte auch die Aktivität der TBK1 von der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration abhängig sein.

In der Tumorzellinie Saos-2 (epitheliale Knochengewebszellen) wird kein endogenes p53 exprimiert. Ryan et al. (2000) etablierten Zellinien, in denen die Expression des p53 induziert werden kann. Die induzierte Apoptose wird abrogiert, wenn das Gen des NF-κB ausgeschaltet oder seine Funktion durch die ektope Expression des IκB blockiert wird. Die Aktivität des NF-κB ist essentiell für die Induktion der Apoptose durch p53. Trotzdem p53 in Saos-2-Zellen nicht exprimiert wird, führt die Stimulierung der Zellen mit TNFα zur Induktion der Apoptose (Phillips et al., 1999). In diesem alternativen apoptotischen Signalweg blockiert die erhöhte Expression des E2F1 eine antiapoptotische Funktion des NF-κB.

Die Expression komplementärer p53-mRNA in TF1-Zellen abrogiert die Induktion der Apoptose nach Wachstumsfaktorentzug (Zhu et al., 1994). TRAIL (Apo2L), ein Mitglied der TNF-Familie, hat eine apoptotische Funktion in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (Zamai et al., 2000). Die Induktion der Apoptose ist al-

lerdings stark abhängig vom Differenzierungsgrad der Zellen. Anzunehmen ist, dass auch in hämatopoetischen Zellen die Apoptose abhängig oder unabhängig von p53 induziert wird. Es wird weiter angenommen, dass E2F1 und TBK1, da es NF-κB aktiviert, eine Apoptose-unterstützende Funktion in TF1 haben könnten.

Neben GluR5 und InsP3R3 spielen höchstwahrscheinlich auch alle anderen identifizierten Gene eine Rolle für die Regulation der Proliferation, der Differenzierung und der Apoptose in hämatopoetischen Zellen. Allerdings kann nicht davon ausgegangen werden, dass die retroviralen Integrationen in einem direkten kausalen Zusammenhang mit der Abrogation der Wachstumsfaktor-Abhängigkeit stehen. Der Grund für diese Annahme ist u.a., dass sowohl eine veränderte Expression des GluR5, als auch des Cyclin D2 und des *VTG1* unabhängig von einer retroviralen Integration in allen untersuchten Mutanten beobachtet wurde. Deshalb ist anzunehmen, dass die Etablierung der Mutanten durch Wachstumsfaktorentzug zur Induktion der Expression von Genen führte und die retrovirale Integration präferentiell in solche Gene erfolgt war. Trotz der für diese Interpretation fehlenden molekularbiologischen Beweise, zeigen diese Integrationen Gene auf, die zu einem Signaltransduktionsweg gehören. Dieser Signaltransduktionsweg wird durch Wachstumsfaktorentzug induziert, führt zu einer veränderten Expression zweier Kalziumkanäle, zu einer möglichen Modifikation der identifizierten Genfunktionen durch Kalzium und zu einem Selektionsvorteil der Mutanten. Es kommt schließlich zur Abrogation der Wachstumsfaktor-Abhängigkeit und zur Progression leukämischer Erkrankungen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde exemplarisch die Funktion des GluR5 für die Progression leukämischer Erkrankungen untersucht. Die Abrogation der GluR5-abhängigen Apoptose in der prototypische AML-Zellinie stellt einen Mutationsschritt in der Tumorentwicklung dar. Genetische oder epigenetische Veränderungen (Baylin, 1997), die zu einer modifizierten Expression der identifizierten Gene führen, erlauben die weitere Entwicklung. Sie konnten in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht werden. Die beschriebenen *loxP*-Expressionsplasmide ermöglichen eine detailliertere Funktionsanalyse der identifizierten Gene, auch in primären, hämatopoetischen Knochenmarkstammzellen. Die reversible Expression verschiedener Gene sollte es ermöglichen, die Abfolge verschiedener Mutationsereignisse und die komplexe Entwicklung leukämischer Erkrankungen zu untersuchen.

7. Zitierte Literatur

1. Alberdi, E., Sanchez-Gomez, M.V., Marino, A. und Matute, C. (2002). Ca^{2+} influx through AMPA or kainate receptors alone is sufficient to initiate excitotoxicity in cultured oligodendrocytes. Neurobiol. *9*, 234-243.

2. Allen, J.D. und Berns, A.R. (1996). Complementation tagging of cooperating oncogenes in knockout mice. Seminars in Cancer Biology *7*, 269-306.

3. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, L.W. und Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. *215*, 403-410.

4. Ayalon, G. und Stern-Bach, Y. (2001). Functional assembly of AMPA and kainate receptors is mediated by several discrete protein-protein interactions. Neuron *32*, 103-113.

5. Bain, G., Kitchens, D., Yao, M., Huettner, J.E., und Gottlieb, D.I. (1995). Embryonic stem cells express neuronal properties *in vitro*. Developmental. Biol. *168*, 342-357.

6. Barria, A., Derkach, V. und Sonderling, T. (1997). Identification of the Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II regulatory phosphorylation site in the alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate-type glutamate receptor. J. Biol Chem. *272*, 32727-32730.

7. Bartholomew, C. und Ihle, J.N. (1991). Retroviral insertions 90 kilobases proximal to the Evi-1 myeloid transforming gene activate transcription from the normal promoter. Mol. Cell. Biol. *11*, 1820-1828.

8. Baylin, S.B. (1997). Tying it all together: Epigentics, genetics, cell cycle, and cancer. Science *277*, 1948-1949.

9. Bergemann, J., Kühlcke, K., Fehse, B., Ratz, I., Ostertag, W. und Lother H. (1995). Excision of specific DNA-Sequences from integrated retroviral vectors by specific recombination. Nucleic Acid Res. *23*, 4451-4456.

10. Berridge, M.J. (1998). Neuronal calcium signaling. Neuron *21*, 13-26.

11. Bettler, B., Boulter, J., Hermans-Borgmeyer, I., O'Shea-Greenfield, A., Deneris, E.S., Moll, C., Borgmeyer, U., Hollmann, M. und Heinemann, S. (1990). Cloning of a novel glutamate receptor subunit, GluR5: Expression in the nervous system during development. Neuron *5*, 583-595.

12. Bjornson, C.R., Rietze, R.L., Reynolds, B.A., Magli, M.C. und Vescovi, A.L. (1999). Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. Science *283*, 534-537.

13. Blencowe, B.J. (2000). Exonic splicing enhancers: Mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. TIBS *25*, 106-110.

14. Bredt, D.S. (1999). Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. Free Radic. Res. *31*, 577-596.

15. Carson, D.A. und Ribeiro, J.A. (1993). Apoptosis and disease. Lancet. *341*, 1251-1253.

16. Cesano, A., Hoxie, J.A., Lange, B., Nowell, P.C., Bishop, J. und Santoli, D. (1992). The severe combined immunodeficient (SCID) mouse as a model for human myeloid leukemias. Oncogene *7*, 827-836.

17. Chrétien, S., Varlet, P., Verdier, F., Gobert, S., Carton, J.P., Gisselbrecht, S., Mayeux, P. und Lacombe, C. (1996). Erythropoietin-induced erythroid differentiation of the human erythroleukemia cell line TF-1 correlates with impaired STAT5 activation. EMBO J. *15*, 4174-4181.

18. Clapham, D.E. (1995). Calcium signaling. Cell *80*, 259-268.

19. Clark, B.R. und Keating A. (1995). Biology of bone marrow stroma. Ann. N Y Acad. Sci. *770*, 70-78.

20. Cooper, T.A. und Mattox, W. (1997). The regulation of splice-site selection, and its role in human disease. Am. J. Hum. Genet. *61*, 259-266.

21. Crabtree, G.S. (1999). Generic signals and specific outcomes: Signaling through Ca^{2+}, calcineurin and NF-AT. Cell *96*, 611-614.

22. Cross, M. und Dexter, T.M. (1991). Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis. Cell *64,* 271-280.

23. Dale, E.C. und Ow, D.W. (1991). Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *88*, 10558-10562.

24. Dexter, T.M., Garland, J., Scott, D., Scolnick, E. und Metcalf, D. (1980). Growth of factor-dependent hemopoietic precursor cell lines. J. Exp. Med. *152*, 1036-1047.

25. Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D. und Traynelis, S.F. (1999). The glutamate receptor ion channels. Pharmacol. Reviews. *51*, 7-61.

26. Dorshkind, K. (1990). Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. Ann. Rev. Immunol. *8*, 111-137.

27. Eckert, H.G., Stockschlader, M., Just, U., Hegewisch-Becker, S., Grez, M., Ude, A., Zander, A., Ostertag, W. und Baum, C. (1996). High-dose multidrug resistance in primary human hematopoietic progenitor cells transduced with optimized retroviral vectors. Blood *88*, 3407-3415.

28. Egebjerg, J., Bettler, B., Hermans-Borgmeyer, I. und Heinemann, S. (1991). Cloning of a cDNA for a glutamate receptor subunit activated by kainate but not AMPA. Nature, *351*, 745-748.

29. Eischen, C.M., Packham, G., Nip, J., Fee, B.E., Hiebert, S.W. und Zambetti, G.P. (2001). Bcl-2 is an apoptotic target suppressed by both c-Myc and E2F-1. Oncogene *25*, 6983-6993.

30. Erickson, P., Gao, J., Chang, K.S., Look, T., Whisenant, E., Raimondi, S., Lasher, R., Trujillo, J., Rowley, J. und Drabkin, H. (1992). Identification of breakpoints in t(8;21) acute myelogenous leukemia and isolation of a fusio transcript, AML1/ETO, with similarity to Drosophila segmentation gene, runt. Blood *80*, 1825-1831.

31. Fehse, B. (1996). Klonierung und Charakterisierung retroviraler Insertionstellen aus Wachstumsfaktor-unabhängigen Zellmutanten. Dissertation, Fachbereich Biologie, Hamburg.

32. Fehse, B., Kühlcke, K., Langer, A., Ostertag, W. und Lother, H. (1999). Rapid and efficient cloning of proviral flanking fragments by kanamycin resistance gene complementation. Nucleic Acid Res. *27*, 706-707.

33. Ferrer-Montiel, A.V. und Montal, M. (1996). Pentameric subunit stoichiometry of a neuronal glutamate receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *93*, 2741-2744.

34. Foo, S.Y. und Nolan, G.P. (1999). NF-kappaB to the rescue: RELs, apoptosis and cellular transformation. Trends Genet. *15*, 229-235.

35. Friedrich, G. und Soriano, P. (1993). Insertional mutagenesis by retroviruses and promoter traps in embryonic stem cells. Meth. Enzymol. *225*, 681-701.

36. Gallo, V., Kingsbury, A., Balazs, R. und Jorgensen, O.S. (1987). The role of depolarization in the survival and differentation of cerebellar granule cells in culture. J. Neurosci. *7*, 2203-2213.

37. Gallo, V., Pende, M., Scherer, S., Molne, M. und Wright, P. (1995). Expression and regulation of kainate and AMPA receptors in uncommitted and committed neural progenitors. Neurochem. Res. *20*, 549-560.

38. Garcia, E.P., Mehta, S., Blair, L.A., Wells, D.G., Shang, J., Fukushima, T., Fallon, J.R., Garner, C.C. und Marshall, J. (1998). SAP90 binds and clusters kainate receptors causing incomplete desensitization. Neuron *21*, 727-739.

39. Genever, P.G., Wilkinson, D.J., Patton, A.J., Peet, N.M., Hong, Y., Mathur, A., Erusalimsky, J.D. und Skerry, T.M. (1999). Expression of a functional N-Methyl-D-Aspartate-Type glutamate receptor in bone megakaryocytes. Blood *93*, 2876-2883.

40. Ghosh, S., May, M.J. und Kopp, E.B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. Annu. Rev. Immunol. *16*, 225-260.

41. Gonzalez-Scarano, F. und Baltuch, G. (1999). Microglia as mediators of Inflammatory and degenerative diseases. Annu. Rev. Neurosci. *22*, 219-240.

42. Grabowski, P.J. (1998). Splicing regulation in neurons: tinkering with cell-specific control. Cell *92*, 709-712.

43. Gratacos, E., Perez-Navarro, E., Tolosa, E., Arenas, E. und Alberch, J. (2001). Neuroprotection of striatal neurons against kainate excitotoxicity by neurotrophins and GNDF family members. J. Neurochem. *78*, 1287-1289.

44. Gregor, P., O´Hara, B.F., Yang, X. und Uhl, G.R. (1993). Expression and novel subunit isoforms of glutamate receptor genes GluR5 and GluR6. Neuroreport *4*, 1343-1346.

45. Hanahan, D. und Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. Cell *100*, 57-70.

46. Hanna, Z., Jankowski, M., Tremblay, P., Jiang, X., Milatowich, A., Franke, U. und Jolicoeur, P. (1993). The Vin-1 gene, identified by provirus insertional mutagenesis, is the cyclin D2. Oncogene *8*, 1661-1666.

47. Hattori et al. (2000). The DNA sequence of human chromosome 21. Nature *405*, 311-319.

48. Hayashi, T., Umemori, H., Mishima, M. und Yamamoto, T. (1999). The AMPA receptor interacts with and signals through the protein tyrosine kinase Lyn. Nature *397*, 72-76.

49. Heales, S.J., Bolanos, J.P., Stewart, V.C., Brookes, P.S., Land, J.M. und Clark, J.B. (1999). Nitric oxide, mitochondria, and neurological disease. Biochim. Biophys. Acta. *1410*, 215-228.

50. Honore', T., Davies, S.N., Drejer, J., Fletcher, E.J., Jacobsen, P., Lodge, D. und Nielsen, F.E. (1988). Quinoxalinediones: Potent competitive non-NMDA glutamate receptor antagonists. Science *241*, 701-703.

51. Hoo, K.H., Nutt, S.L., Fletcher, E.J., Elliott, C.E., Korcak, B., Deverill, R.M. Rampersad, V., Fantaske, R.P. und Kamboj, R.K. (1994). Functional expression and pharmacological characterization of the human EAA4 (GluR6) glutamate receptor: A kainate selective channel subunit. Recep. Chann. *2*, 327-337.

52. Hu, X. Moscinski, L.C, Hill, B.J., Chen, Q., Wu, J., Fisher, A.B. und Zuckerman, K.S. (1998). Characterization of a unique factor-independent variant derived from human factor-dependent TF-1 cells: a transformed event. Leuk. Res. *22*, 817-826.

53. Hunter, T. (1997). Oncoprotein networks. Cell *88*, 333-346

54. Ihle, J.N. und Kerr, I.M. (1995). Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. TIG. *11*, 69-74.

55. Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vockler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefoyska, V., Turski, L. und Olney, J.W. (1999). Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. Science *283*, 70-74.

56. Itoh, K., Tezeku, H., Sakoda, H., Konno, M., Nagata, K., Uchiyama, T., Uchino, H. und Mori, K.J. (1989). Reproducible establishment of hemopoietic supportive stromal cell lines from murine bone marrow. Exp. Hematol. *17*, 145-153.

57. Jaconi, M., Pyle, J., Bortolon, R., Ou, J. und Clapham, D.E. (1997). Calcium release and influx colocalize to the endoplasmic reticulum. Curr Biol. *7*, 599-602.

58. Jonkers J. und Berns, A. R. (1995). Retroviral insertion mutagenesis as a strategy to identify cancer genes. Biochim. Biophys. Acta. *1287*, 29-57.

59. Jumaa, H., Guenet, J.L. und Nielsen, P.J. (1997). Regulated expression and RNA processing of transcripts from the Srp20 splicing factor gene during the cell cycle. Mol. Cell. Biol. *17*, 3116-3124.

60. Kamboj, R.K., Schoep, D.D. Nutt, S., Shekter, L., Korczak, B., True, R.A., Zimmerman, D.M. und Wosnik, M.A. (1992). Molecular Structure and pharmacological characterization of humEAA2, a novel human kainate receptor subunit. Molec. Pharmacol. *42*, 10-15.

61. Kaul, M., Garden, G.A. und Lipton, S.A. (2001). Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. Nature *410*, 988-994.

62. Khan, A.A., Soloski, M.J., Sharp, A.H., Schilling, G., Sabatini, D.M., Li, S.H., Ross, C.A. und Snyder, S.H. (1996). Lymphocyte apoptosis: mediated by increased type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Science *273*, 503-507.

63. Kitamura, T., Tange, T., Terasawa, T., Chiba, S., Kuwaki, T., Miyagawa, K., Piao, Y.-F., Miyazono, K., Urabe, A. und Takaku, F. (1989). Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. J. Cell. Physiol. *140*, 323-334.

64. Kolonics, A., Apati, A., Janossy, J., Brozik, A., Gati, R., Schaefer, A. und Magocsi, M. (2001). Activation of Raf/ERK1/2 MAP kinase pathway is involved in GM-CSF-induced proliferation and survival but not in erythropoietin-induced differentiation of TF-1 cells. Cell Signal. *13*, 743-754.

65. Komatsu, M., Kominami, E., Arahata, K. und Tsukahara, T. (1999). Cloning and characterization of two neural-salient serine/arginine-rich (NSSR) proteins involved in the regulation of alternative splicing in neurones. Genes to Cells *4*, 593-606.

66. Korczak, B., Nutt, S.L., Fletcher, E.J., Hoo, K.H., Elliott, C.E., Rampersad, V., McWhinnie, E.A. und Kamboj, R.K. (1995). cDNA cloning and functional properties of human glutamate receptor EAA3 (GluR5) in homomeric and heteromeric configuration. Receptors Channels *3*, 41-49.

67. Kuusinen, A., Arvola, M. und Keinänen, K. (1995). Molecular dissection of the agonist binding site of an AMPA receptor. The EMBO J. *14*, 6327-6332.

68. Kuusinen, A., Abele, R., Madden, D.R. und Keinänen, K. (1999). Oligomerization and ligand-binding properties of the ectodomain of the α-amino-3-hydoxy-5-methyl-4-isooxazole propionic acid receptor subunit GD. J. Biol. Chem. *274*, 28937-28943.

69. Laird, P.W. und Jaenisch, R. (1996). The role of DNA methylation in cancer genetics and epigenetics. Annu. Rev. Genet. *30*, 441-464.

70. Lerma, J., Paternain, A.V., Rodriguez-Moreno, A. und Lopez-Garcia, J.C. (2001). Molecular physiology of kainate receptors. Physiol. Rev. *81*, 971-998.

71. Leuschner, W.D. und Hoch, W. (1999). Subunit-specific assembly of the α-amino-3-hydoxy-5-methyl-4-isooxazole propionic acid receptor subunits is mediated by their N-terminal domains. J. Biol. Chem. *274*, 16907-16916.

72. Lewis, R.S. und Cahalan, M.D. (1995). Potassium and calcium channels in lymphocytes. Annu. Rev. Immunol. *13*, 623-653.

73. Li, X. und Darzynkiewicz, Z. (1995). Labeling DNA strand breaks with BrdUTP. Detection of apoptosis and cell proliferation. Cell Prolif. *28*, 571-579.

74. Lin, C.L., Bristol, L.A., Jin, L., Dykes-Hoberg, M., Crawford, T., Clawson, L. und Rothstein, J.D. (1998). Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. Neuron *20*, 589-602.

75. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D. und Darnell, J. (1999). Molecular Cell Biology. 4. Auflage, W.H. Freeman and Company, New York.

76. Löwenberg, B., van Putten, W.L., Tow, I.P., Delwel, R. und Santini, V. (1993). Autonomous proliferation of leukemic cells *in vitro* is a determinant of prognosis in adult acute myeloid leukemia. N. Eng. J. Med. *328*, 614-619.

77. Löwenberg, B., Downing J.R. und Burnett, A. (1999). Acute myeloid leukemia. N. Engl. J. Med. *341*, 1051-1062.

78. Lombardi, G., Dianzani, C., Miglio, G., Canonico, P.L. und Fantozzi, R. (2001). Characterization of ionotropic glutamate receptors in human lymphocytes. Br J. Pharmacol. *133*, 936-944.

79. Look, T.A. (1997). Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. Science *278*, 1059-1084.

80. Markowitz, D., Goff, S. und Bank, A. (1988). A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. J. Virol. *62*, 1120-1124.

81. Matute, C., Alberdi, E., Domercq, M., Perez-Cerda, F., Perez-Samartin, A. und Sanchez-Gomez, M.V. (2001). The link between excitotoxic oligodendroglial death and demyelinating diseases. Trends Neurosci. *24*, 224-230.

82. Meldrum, B.S. (2000). Glutamate as a Neurotransmitter in the brain: Review of physiology and pathology. J. Nutrition. *130*, 1007S-1015S.

83. Morrison, S.N. Shah, N.M. und Anderson, D.J. (1997). Regulatory mechanisms in stem cell biology. Cell *88*, 287-298.

84. Noda, M., Nakanishi, J., Nabekura, J. und Akaike, N. (2000). AMPA-Kainate subtypes of glutamate receptor in rat cerebral microglia. J. Neurosci. *20*, 251-258.

85. Nutt, S.L, Hoo, K.H., Rampersad, V., Deverill, R.M., Elliot, C.E., Fletcher, E.J., Adams, S.L., Korczak, B., Folders, R.L. und Kamboj, R.K. (1994). Molecular characterization of the human EEA5 (GluR7 receptor: a high-affinity kainate receptor with novel potential RNA editing sites. Recep. Chann. *2*, 315-326.

86. Pende, M., Fisher, T.L., Simpson, P.B., Russell, J.T., Blenis, J. und Gallo, V. (1997). Neurotransmitter- and growth factor-induced cAMP response element binding protein phosphorylation in glial cell progenitors: role of calcium ions, protein kinase C, and mitogen-activated protein kinase/ribosomal S6 kinase pathway. J. Neurosci. *17*, 1291-1301.

87. Perkinton, M.S., Sihra, T.S. und Williams, R.J. (1999). Ca^{2+}-permeable AMPA receptors induce phosphorylation of cAMP response element-binding protein through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent stimulation of the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in neurons. J. Neurosci. *19*, 5861-5874.

88. Perkinton, M.S., Ip, J.K., Wood, G.L., Crossthwaite, A.J. und Williams, R.J. (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase is a central mediator of NMDA receptor signalling to MAP kinase (Erk1/2), Akt/PKB and CREB in striatal neurones. J. Neurochem. *80*, 239-254.

89. Phillips, A.C., Ernst, M.K., Bates, S., Rice, N.R. und Vousden, K.H. (1999). E2F-1 potentiates cell death by blocking antiapoptotic signaling pathways. Mol. Cell. *4*, 771-81.

90. Pomerantz, J.L. und Baltimore, D. (1999). NF-kappaB activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase. EMBO J. *18*, 6694-6704.

91. Priller, J., Persons, D.A., Klett, F.F., Kempermann, G., Kreutzberg, G.W. und Dirnagl, U. (2001). Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo. J. Cell Biol. *155*, 733-738

92. Rajotte, D., Sadowski, H.B., Haman, A., Gopalbhai, K., Meloche, S., Liu, L., Krystal, G. und Hoang, T. (1996). Contribution of both STAT and SRF/TCF to c-fos promoter activation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Blood *88*, 2906-2916.

93. Raymond, L.A., Blackstone, C.D. und Huganir, R.L. (1993). Phosphorylation and modulation of recombinant GluR6 glutamate receptors by cAMP-dependent protein kinase. Nature *361*, 637-641.

94. Rimaniol, A.C., Haik, S., Martin, M., Le Grand, R., Boussin, F.D., Dereuddre-Bosquet, N., Gras, G. und Dormont, D. (2000). Na^+-dependent high-affinity glutamate transport in macrophages. J. Immunol. *164*, 5430-5438.

95. Roche, K.W., O´Brian, R.J., Mammen, A.L., Bernhardt, J. und Huganir, R.L. (1996). Characterization of multiple phosphorylation sites on the AMPA receptor GluR1 subunit. Neuron *16*, 1179-1188.

96. Rosen, L.B. und Greenberg, M.E. (1996). Stimulation of growth factor recptor signal transduction by activation of voltage-sensitive calcium channels. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *93*, 1113-1118.

97. Rosenmund, C., Stern-Bach, Y. und Stevens, C.F. (1998). The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. Science *280*, 1596-1599.

98. Rothstein, J.D., Martin, L.J. und Kuncl, R.W. (1992). Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. N. Engl. J. Med. *326*, 1464-1468.

99. Rothstein, J.D., Van Kammen, M., Levey, A.I., Martin, L.J. und Kuncl, R.W. (1995). Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. Ann. Neurol. *38*, 73-84.

100. Ryan, K.M., Ernst, M.K., Rice, N.R. und Vousden, K.H. (2000). Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death. Nature *404*, 892-897.

101. Sambook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Sprimg Harbor, New York.

102. Sastry, P.S. und Rao, K.S. (2000). Apoptosis and the nervous system. J. Neurochem. *74*, 1-20.

103. Schiffer, H.H., Swanson, G.T. und Heinemann, S.F. (1997). Rat GluR7 and a carboxy-terminal splice variant, GluR7b are functional kainate receptors with a low sensitivity to glutamate. Neuron *19*, 1141-1146.

104. Schubert, D., Kimura, H. und Maher, P. (1992). Growth factors and vitamin E modify neuronal glutamate toxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *89*, 8264-8267.

105. Schurov, I.L., McNulthy, S., Best, J.D., Sloper, P.J. und Hastings, M.H. (1999). Glutamatergic induction of CREB phosphorylation and Fos expression in primary cultures of the suprachiasmatic hypothalamus in vitro is mediated by co-ordinate activity of NMDA and non-NMDA receptors. J. Neuroendocrinol. *11*, 43-51.

106. Shaw, P.J. (1994). Excitotoxicity and motor neurone disease: a review of the evidence. J. Neurol. Sci. *124*, Suppl. 6-13.

107. Shen, W., Zhang, C. und Zhang, G. (2002). Nuclear factor kappaB activation is mediated by NMDA and non-NMDA receptor and L-type voltage-gated Ca(2+) channel following severe global ischemia in rat hippocampus. Brain Res. *933*, 23-30.

108. Sheng, M. und Pak, D.T.S. (2000). Ligand-gated ion channel interactions with cytoskeletal and signaling proteins. Annu. Rev. Physiol. *62*, 755-778.

109. Smith, C.W. und Valcarcel, J. (2000). Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. TIBS *25*, 381-388.

110. Sommer, B., Keinanen, K., Verdoorn, T.A., Wisden, T.A., Burnashey, N., Herb, A., Kohler, M., Takagi, T., Sakmann, B. und Seeburg, P.H. (1990). Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. Science *249*, 1580-1585.

111. Sommer, B., Köhler, M., Sprengel, R. und Seeburg, P.H. (1991). RNA editing in brain controls a determinant in glutamate-gated channels. Cell *67*, 11-19.

112. Stern-Bach, Y., Bettler, B., Hartley, M., Sheppard, P.O., O´Hara, P.J. und Heinemann, S.F. (1994). Agonist selectivity of glutamate receptors is specified by two domains structurally related to bacterial amino acid-binding proteins. Neuron *13*, 1345-1357.

113. Stickeler, E., Kittrell, F., Medina, D. und Berget, S.M. (1999). Stage-specific changes in SR splicing factors and alternative splicing in mammary tumorigenesis. Oncogene *18*, 3574-82.

114. Stocking, C., Bergholz, U., Friel, J., Klingler, K., Wagner, T., Starke, C., Kitamura, T., Miyajima, A. und Ostertag, W. (1993). Distinct classes of factor-independent mutants can be isolated after retroviral mutagenisis of a human myeloid stem cell line. Growth factors *8*, 197-209.

115. Sutcliffe, M.J., Wo, Z.G. und Oswald, R.E. (1996). Three-dimensional models of non-NMDA glutamate receptors. Biophys. J. *70*, 1575-1589.

116. Terskikh, A.V., Easterday, M.C., Li, L., Hood, L., Kornblum, H.I., Geschwind, D.H. und Weissman, I.L. (2001). From hematopoiesis to neuropoiesis: Evidence of overlapping genetic programs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *98*, 7934-7939.

117. Thacker, J.D. und Hodge, D.E. (1994). Cytokine-dependent engraftment of human myeloid leukemic cell lines in immunosuppressed nude mice. Leukemia *8*, 871-877.

118. Turetsky, D.M., Huettner, J.E., Gottlieb, D.I., Goldberg, M.P. und Choi, D.W. (1993). Glutamate receptor-mediated currents and toxicity in embryonal carcinoma cells. J. Neurobiol. *24*, 1157-1169.

119. Wang, H.G., Pathan, N., Ethell, I.M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., McKeon, F., Bobo, T., Franke, T.F. und Reed, J.C. (1999). Ca^{2+}-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. Science *284*, 339-343.

120. Weissman, I.L., Anderson, D.J. und Gage, F. (2001). Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *17*, 387-403.

121. Whitcomb, J.M. und Hughes, S.M. (1992). Retroviral reverse transcription and integration: progress and problems. Annu. Rev. Cell Biol. *8*, 275-306.

122. Yakel, J.L., Vissayaijhala, P., Derkach, V.A., Brickley, D.A. und Soderling, T.R. (1995). Identification of a Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II regulatory phosphorylation site in non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *92*, 1376-1380.

123. Yun, H.Y., Gonzalez-Zulueta, M., Dawson, V.L. und Dawson, T.M. (1998). Nitric oxide mediates N-methyl-D-aspartate receptor-induced activation of p21ras. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *95*, 5773-5778.

124. Zamai, L., Secchiero, P., Pierpaoli, S., Bassini, A., Papa, S., Alnemri, E.S., Guidotti, L., Vitale, M. und Zauli, G. (2000). TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as a negative regulator of normal human erythropoiesis. Blood *95*, 3716-3724.

125. Zhu, Y.M., Bradbury, D.A. und Russell, N.H. (1994). Wild-type p53 is required for apoptosis induced by growth factor deprivation in factor-dependent leukaemic cells. Br. J. Cancer *69*, 468-472.

8. Häufig verwendete Abkürzungen und Anglizismen

APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar
BrdUTP	Bromodeoxyuridin (5-Bromo-2´-Deoxyuridin-5´-triphosphat)
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cAMP	zyklisches Adenosin-3´,5´-Monophosphat
cDNA	komplementäre DNA
dATP	2´- Desoxyadenosin-5´-Triphosphat
dCTP	2´- Desoxycytosin-5´-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNQX	6,7-Dinitroquinoxalin-2,3-dion
dNTP	2´- Desoxynukleotid-5´-Triphosphate
FACS	„Fluorescence activated cell sorting”
FITC	Fluoresceinthiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
G418	Geneticin
GluR	Glutamatrezeptor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
h	Stunde
InsP3R3	Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor Typ 3
LTR	„long terminal repeat” (endständige, retrovirale Wiederholungssequenz)
kb	Kilobasen
min	Minute
mRNA	„messenger“ (Boten-) Ribonukleinsäure
Na_2EDTA	Ethylendiamin Tetraessigsäure Natriumsalz
OD	optische Dichte
PBS	„Phosphat buffered saline“ (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	„Polymerase chain reaction“ (Polymerase-Ketten-Reaktion)
pfu	„plaque forming units“
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	„revers transcripted“ PCR
SDS	Dodecylsulfat Natriumsalz
TEMED	N, N, N´, N´-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	„Terminal Deoxynucleotidyl Transferase mediated dUTP nick end labeling“
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
vgl	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

9. Anhang

Verwendete Oligonukleotide:

GluR5-spezifisch:

BP43: 5'-GCATTCTCTACCGGAAGC-3'
BP44: 5'-GGGGTTGAGGAAGGAGAA-3'
BP59: 5'-AGCGCGCAGCGTGCTTG-3'
BP60: 5'-GTGATGGGCTAGCGACAG-3'
BP64: 5'-CTTTTTCTTCCTACAGGCGTTTTCCTT-3'
BP66: 5'-GTCACTTCCCAAGTCATATCTATGTGA-3'
BP85: 5'-GATGCCTCCAATATTTTCCACTC –3'
XP39: 5'-GGAGAAAGTCATTGACTTCTCCA-3'
XP58: 5'-CCACATTAACCTATGACATCCAG-3'
XP80: 5'-CATGGACCACTTCTCAATGATGG-3'

GluR6-spezifisch:

DP103: 5'-GGATTGGATATTCTCAAGGAACC-3'
XP12: 5'-CAGATATCAGGGGAGAGAGGATTCA-3'
XP13: 5'-ATGAAGATTATTTTCCCGATTCTAAGTAA-3'
XP14: 5'-TTATGCCATGGTTTCTTTACCTGG-3'
XP17: 5'-ATGGGAAATATGGAGCCCAGGATG-3'
XP18: 5'-CCCATGGGAGTGCCAACGCCATA-3'
XP19: 5'-CCAGAAGAGGAAAGCAAAGAGGC-3'
XP36: 5'-GACGACAGTTTGTGCTTGGGTGA-3'
XP44: 5'-CAGCATCAGTCGTCATAAATCCATC-3'

GluR7-spezifisch:

DP24: 5'-CTCCAGGCCATCCTCTTTCAG-3'
DP51: 5'-CCTAGGGGAACACAGGGGC-3'
XP28: 5'-GCTTGCGGACGGATTTTGATCTGGA-3'
XP47: 5'-CACGCTCGGTGGCGCCCAAC-3'
XP51: 5'-AGCCCAATGGCACCAACCCC-3'
XP52: 5'-AAGATGCCCCCGATCTTCTGGA-3'
XP56: 5'-CATATCATGAAGGAGAAGTGGTGG-3'

KA2-spezifisch:

DP64: 5'-GAAGGCAGCCAGGTTGGCCGT-3'
XP9: 5'-GGTCACTCGTGCTCCGCCAGCTC-3'
XP21: 5'-CGCGGCAGCTGCGTCCCCATG-3'
XP22: 5'-GTGTCAGCGGAGTCTGGTGGGC-3'
XP23: 5'-TCCATGACCGCCACGAAGACAGC-3'
XP24: 5'-AAGGTTTGGGCATGGAGAACATTGG-3'
XP48: 5'-GGCACCTCCATGCGCTGCAC-3'
XP53: 5'-GAGGGCTTCTGCGTGGACATG-3'

Oligonukleotide, *loxP*-Expressionsplasmide:

lea5bss: 5'-ACTCGGCGCGCAAGTCCTCCGAT-3'
lea3asc: 5'-ATTGGCGCGCCGGCGCCTAGAGAAGGAGTGAG-3'
lox1: 5'-CCGGAATTCTGCAGTAACGCCATTTTG-3'
lox3: 5'-GAACGCGGCCGCATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT
CAGCTCTGGGGTTGTACCC-3'
lox4: 5'-GCTCTAGACCAATTCGCTTTATGATAACAATCTGTG-3'
lox5: 5'-CGGGATCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTG-3'
lox6: 5'-CCCAAGCTTCCCCAGCATGCCTGCTATTG-3'
ltr3Hind: 5'-CGCAAGCTTAGAATGAAAGACCCCCGAGG-3'
neo3: 5'-GGCGAGGATCTCGTCGTG-3'
Sfβpoli: 5'-GAGGTCGACGGCGCGCCGAGTGAGGGGTTG-3'
Oliloxa: 5'-GAGAGAATTCGGCGCGCCATAACTTCGTATAATGTATGCTATACCG-3'

Oliloxb: 5’-CTCGTCGACATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATGG-3’

Weitere Oligonukleotide:

1211: 5’-GTAAAACGACGGCCAGT-3’, Sequenzierprimer (NEB)
1233: 5’-AGCGGATAACAATTTCACACAGGA-3’, Sequenzierprimer (NEB)
AUAPx: 5’-AGGCCACGCGTCGACTAGTAC-3’, RT-RACE
APx: 5’-AGGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTT-3’,RACE-PCR
BP9: 5’-ACCCTCTTGCAGTTGCATCCG-3’, LTR-spezifisch
BP27: 5’-TCTCAGTATTCTGACCACAG-3’, vtg1-spezifisch
BP28: 5’-TGCCAAGGGGTGGAAAAC-3’, vtg1-spezifisch
BP51: 5’-GACATGTTAAAAGTAGAGTTAC-3’, vtg1-spezifisch
CS21: 5’-CGCTGCGCTGGTCGTCGACA-3’, Aktin-spezifisch, 5’Bereich
CS37: 5’-GTCACGCACGATTTCCCGCT-3’, Aktin-spezifisch, 3’Bereich
DP96: 5’-TTCGGCCCAACTGGCATCCT-3’, Cyclin D2-spezifisch

Nukleotidsequenzen der 3´proviral-flankierenden Regionen

1) vtg1, p623, Mutante 10/1, Teilsequenz des λ-Klons

```
1   TAGCTTATCA GGTCCCAGGT TACTTTTTAA ATCTCAAGCT AATCAGAACT ATGCTGGTGC
61  CAAATTTAGT GAGCCGCCAT CACCAAGTGT TCTTCCCAAA CCACCAAGCC ACTGGGTCCC
121 TGTTTCCTTT AATCCTTCAG ATAAGGAAAT AATGACATTT CAACTTAAAA CCTTACTTAA
181 AGTACAGGTA TAAAATAAGA CAAATGTTTA AATTTAGTTA TGTTCACGGG TAGTTGTCAA
241 TTGGTCTGAA ACAAATTTGC TAGGGAATCT ATTTGTGTAG AACTAATTAA TGTAAAAAAA
301 ATAGACCATC TCGTGTTGTG TGCACTGTGA TATNATGGTA GTATCAGNGC NACTTAAACT
361 AATGATTGTC TTGGATATC
```

2) vtg4, p413, Mutante 10/1

a) LTR-flankierende Sequenz

```
1   GGTAAAATGA GGTTATTACA GTGAAATTCT AGTTCTACAA AAGTAAAGTG ACTGGTAGAC
61  AACAAATAAA TCATGTTTAT CACCTTATAT TTAATTTTTA TGGTTTTTGT ATGGCACCTT
121 AATAATAAAA AGGACTGTGG TAGAAGACTG AGGCATTATT ATCCATCAAA GCTGTCCACT
181 TAGACAATGT TACTCAAGGT CCTGCTGACT TATTGAAATT AGAAAAATCA CTTTTGTAAT
241 TTTAAAAACA AAACCTCCAA TTTAATGGAA AAATCTGTTT TCAATCACCT CTTTTAAAGG
301 AATATATTTT GCTCTGCTCA ATTTAAAAAA ATCGTTATTC ATGGGATGAA GGGATAGAAG
361 AAATGGACTG AGAACTGTAG AACTCTTGGC ACATGACTCC ATCCAAACCT CTGAGTTACT
421 AAGAGACAAA CTTTAGCATG CCTTCTAGCA GTGTCAGATC ATGTCCCTAG GAGAACCCCA
481 GCTCCCCCAT GAAAATGCCT GCCTGAGAAA GCTCAATGCT ACCAGGAGAA TTTACTATTT
541 GTTCTAGCCA ACACCTGATG ATAGGCTCCT GACCTCCCTT TCTCAGGGCG TTTATTAAGG
601 GCTTACCATT ATGAATCCTT CCTTCTTCTC TTTAA
```

b) NcoI-flankierende Sequenz

```
1   CCATGGAGCT GCCTGCCTGC AAAGGAGCCC CAGCCCCAGG TCAGACTCAT CCGAAGGACA
61  GCCATTTCCG GGAGCCTCAG AAAATACCGA AACAGGCGCT CTACCTTTGG GATATACCTG
121 GCCCAGTGGA TTTGGCTCTG ACTGTAACAT CAGAATCCCT TCTCACCCCA CCCAGACTAA
181 GAGAATCCAC ATGTCTGGAA AGGCTCAGGT AAGGGTATTT TTGAAGCTCC CTGGTGGCTT
241 TTTATGGACG GTGGATGGAA ACCCAGTAAA TGCACTGAGA ATCCAGAGAA ATGAACACCC
301 ACCTAAAGCA CTGAAACACA TGATCAGAGC AATGTGCATG GTCTAGTGAA CTGTCAACAC
361 TCAAAGGGAC CTCGAAAGAC AAACACCCCA ATCTCCTCCT CATCTTGAAA GCCCAAGCAC
421 AGAAGGGCAA AATGCCACCG GCCTCCTCCG TGAAGGGTGC CCCTCAAGCC AGGCTGCCTC
481 TCTCACACAG CAAGAAGACA CTGACTCCCT GCTGAGGTCA GAGCACTGGC GTACCCACAC
541 CTGTGTCATC AAATGAGGGA AGCTATTACT AGACCTTTCC TCCCTATACA ACCCACAACA
601 TTCCACAACG TGTTGTGCAG TTTAGCAAGA GAGACGAGGG TCTGCTTTAC CTTTTCCTGC
661 ACCAGCGACA TCACAAGTTC ACTGGAGGCA AAGTAAAGTC TTACGCTACC TTNATGTCTC
721 CAACTCTCAT AGAGCTNATC TGATAGAANA GTNAAGTGAT GACA
```

3) *CCND2*, p438, Mutante 15/3 (Fehse, 1996)

a) LTR-flankierende Sequenz

```
1   GCTTTTTTCT AAAATCACCC CCTCCCTAAT ATTAACANTT AGGGGACCNT TTTCTATATT
```

```
61  GNCTGAGGAC ACCCCATCTT CAGGTAGTCT ACCCTACANT CCTGGTTCTT AACNACAAGG
121 GNAGGGGGTN CAGGC
```

b) NcoI-flankierende Sequenz

```
1   CCATGGCCAG CCCGGCGGCC CCTCTCCCTC CTGCTTTCCC CGGCCTGGAA AAGGGTTTTT
61  CTGTTTTTGT TTTTTGGAAG GGGAGGGGAG AGCGTTCCCC TGACCTCCTT CCTTTGGCTA
121 AATAGGGGGT TTTCGGGGGA GAGGTGAGGG CAGAGAGAGA AGGTGGAGCA GAAGGGAGGC
181 GAGGATTGGG TGGTGGGCGA GCAGAGCCTC GGGGCTGCCT CACTCGCACC GGTCCTCCCC
241 TTAAAACTGG TCTCGCTCTC CCCTGCTCGC TCTTCTCCGN TCTGAANCGG TGAAGCAANC
301 TGGCTGNGGC ANTTAGCTCT CCTCCCNCTN NCCGNGTTCT CCCGCTCTGG NTCCTCCTAC
```

4) *TBK1*, p481, Mutante 19/1

a) LTR-flankierende Sequenz

```
1   ACTTAAGATA TTTATATTGA ACTGNTTATA CACTTCATGT CAGTAACAGA TAATGGGTGA
61  TCTTACTTGA GACTAAAAAC AGCTAACATT TGTTTCTTAG CTGTGTTACT CCCTTAAAAC
121 ATAGTTGCAA ATTTTTTTTT TCTCTTAGTA TAACAAGAGG ATTGCCTGAT CCAGCCAAGA
181 TGCAGAGCAC TTCTAATCAT CTGTGGCTTT TATCTGATAT TTTAGGCCAA GGAGCTACTG
241 CAAATGTCTT TCGTGGAAGA CATAAGGTTA GTACAGAGAA AACTTTGAAG ACCTTTTATC
301 ACTGTATGTA TTTTGTTCTA AGATGCATGT TGACACTAAA GTGTGTGACT TGGTGATTTT
361 GATCCCTTTG TCTGAAGAAA TTGTTTTAAT GATTTTTGTG GTCATTTAAG GCATAGCTGT
421 GTCAGGCAGT GAACATATCT ACCCAGTGGT GGCACAGGTT AAGTGTTAGT GAGTGGAGGA
481 AAACAGATTG GTTGAAAATG GACTGGGAAA GATTAGTGTT GTGCCTTTTG ATGCTTTCCC
541 CAGCCCANCT CCCTAATGGT TGAGTGATTT CC
```

b) NcoI-flankierende Sequenz

```
1   CCATGGTAAT CACACACATA TACACACACC CACACTCATA CTTTAGTAAC GAAAAGCAAT
61  TTAATAAAAA ACAGATTAAG TAGGTAATAT ACTTTGAATA ACAAGTAATA AATGTAAGAA
121 TTTGGTCATT CTAAGAAATA ATATAAAAGG GCTAATATCA TGGTAAAAAT CCTTTAAATA
181 GTTAAAGGGA AGCAGGATTT TTTGTAGGAT ATAGTCCTAA ACAGTTGCAA CTGCCATCAT
241 TAAGAACAAA TATGGTTTCT CAAAGCACAT CCCTAGGAAA ACTGTTGGGG ACTAAATACT
301 AGACTGGGCC TTGGCAATCT TTTTCGTGTG TGTATGTGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG
361 TGTGTGTTTA GTAGAGACAG GGTTTTGCCA TGTTGCCCAG GCTGGTCTCA AAACTCCTGG
421 GCACAAGCAA CCTACCTGCC TTGGCCTCCG AAAGTGCTGG GATTACAGGC GTGAGCCACC
481 GACTTCACAA TCTTTTAATT AATTCTTATA CTTCTGAAAT TCTCATTTTA GATTTCCACA
541 CTATAATGGG TAAAGNCATA TTTGTTTCCT TTGGAGAACT TTAGGTTGTC TTGGGGTAGN
601 CTAATCAGNC CTCATTCATT CACTTATTCT TTCATTCNCA AACATTT
```

5) AL135778, p419, Mutante 25

a) LTR-flankierende Sequenz

```
1   TTGATCAAAG GTTCAGCCTT TGGGGACAAT GGCCAAGGGC ATGTGAGCCG GGGCACAGGA
61  TGGATTACCC CAGTTGAGCT TTCATCCCGC CCCAAACAGA AGCGAGCCCC GCCCGGCCGG
121 GATCCGAGCG CCTTCCGCGG TCCTTTTGGG ACTTNCCTCT GCAACCTCCC CTAGTGCCGT
181 GGATACCTCT AAACATACTC ATGCCAAGTT TTCAAAGTTC CCAGCCGTTG
```

b) NcoI-flankierende Sequenz

```
1   CCATGGCCGG GGATCCATGG CTGGCTCCAC AGATTCTGTC AGGTCTCTGC TCAAGTGCTG
61  CTGTCAGGAG GTGATGCCTT ACCTGACCAT CCACACACTC CCTAGCCCCC TCCCCTGTTT
121 GAATTTTCTC CGCAGCACTT ACCACCCTAC TATATATGTG TTAGTTTCCC ATTGTTGTCA
181 AAACAAAATA TCACACATTT AGTGGCTTAA AACAACACAA GTTCATTGTC TCAGGGTCCC
241 ACAGATTGGA AGACCAGTAG GCTAGGCTCC CTTCTTCGTT CTGGGTCTCA CCAGGCTGAC
301 ATCAAGATGT CACCTGCCCT GGCTCTTATC TGGAGGCTCT AAGTAAGAAT CTGCTTCTAG
361 GCTTATTCAG GTTGTTGAAA GAATTCAGAA TTAAGACGGG GGTTGCTATT TTCTTGCTGG
421 CTTCCAGAGG TTGCCTGTAT TCCCTGGCCT GTGGCCTCTT CCCCTTCAAA ACCAGGGGCA
481 AAAATCATGA GGGCCAACAT CCTGCCTACC ACAGTATACA TTCCTAGTTA TTTTGTTACT
541 ATCCATTTCC CCATCTAGAA TCTATGTGGA CAGGGATTTC TGTTTGGTAT CCCAAAACCT
601 AGACCACTGC CTGGCACATA GGCATGGAAA GATGTGTTGA ATGAATGAAT GAAGACTGGG
661 TAATTAGCCT TCTCTT
```

6) *GRIK1*, p417, Mutante 29A (Fehse, 1996)

a) LTR-flankierende Sequenz

```
1   CTACTAAAAC TGAAGATGTT AAATGAAAAA TATTTAGGCA GGCTTGAAAT AGTCCCATAA
61  AAGTGCAGAG AGTTCCNATA AACAAGATAT ATGTGAATGT GCATGATTAG NAAAATAGAG
121 TACT
```

b) NcoI-flankierende Sequenz

```
1   CCATGGNTTA TGTCTATGGC ACTGTAGGGA GCTGACGGTC AGCTGGGATG CCCGGTGCGA
61  GGCAATGGCC ACCATGTACA CAGCATCGTA CATCAGAGCC GCTTCAGT CT GTGGAGGAAA
121 ACACACACCG CATCTTAANT TCCACTTNGG NTTACCTNTA CTCGNATAAT CACTCTCCCT
181 GCTTCCATAG CTCTTATCTG TCTGATCTCA AAGGCCATTT ACTCTTCAGC TAGGTAGTNC
241 TCACTCTCCA ATAGCTATTN TTCTCCAA
```

c) GluR5-Exon

```
1   CCATGGNTTA TGTCTATGGC ACTGTAGGGA GCTGACGGTC AGCTGGGATG CCCGGTGCGA
61  GGCAATGGCC ACCATGTACA CAGCATCGTA CATCAGAGCC GCTTCAGT
```

7) AC010418, p422, Mutante 38/5

a) LTR-flankierende Sequenz

```
1   CAAGGTCTCT CTGCTCTTCT CCTGTCCTTC TCTCCTGAAG CAGGCCCTAA AACACTTATC
61  CGACCTTCCT CTGAAGTAGG TTATAAAATC TTCATGTGAG AGAAGAACCT ATAACCAGAG
121 AAAAAGGAAT ATATCTCCGA GGATACTAAG AAGTATCTGA ACAAACAGGT TTTGCTAAGT
181 TCCCCTCATT TATTACCATT AGATTGCAGC CCCTTCACCC AATCATACTT CTGCACAACT
241 GCCCACACTT CATCAAACTT AGCATAAAAA TATATAGGGT TTCCTGTTTC TTTCAGCCTT
301 CATTTCTGAA GATGCAAAGC TTATGTTAAA TAAATTTGTA TGTCCCCTTT TGTCAATCTG
361 TCATTTGTTA TGGAAGTGTC AGCCATGAAT CTTGTGAAGG GTAAGAAAAA TCTATTACTT
421 TTACTTACCT ACAGAAGTAA TTGTTGAATC TATAAAGAAG AGGCAAGAAT GAGCTTCACT
481 GAGATGTGAG AATCAGGCAC TAAAGTGGAA ATATTAAACA AAAACTTCCA ATTTAAATAA
541 GCTTATTTGT GACTTAAGAA AAGATAACCC CTAGCTTAAC AAACAGGGCT GTGAACGGTC
601 TTCAGAATGA GAGTGATTCG AATATGATTA TATTGTGAAG AATAAATTGA ATAAAAATAA
661 GAGGAAACAA TTAAACTAAC ATAAAAATGG GTTTGCCATG TAGAGCAATT ANGTGATAT
```

b) NcoI-flankierende Sequenz

```
1   CCATGGCATG TATTCATTTC CAGTTGAACG CTAGTAACTC GATAAAAGGT TCATCCAGAA
61  TTTGCCTTAT TCGCTATTTT TAGTTCCTTG CATAATACCT AACACAAAAT GATAGTATCT
121 GAGACAAAAT GATGGCATCT GATGCAAAAT GTATAGATTC ATAATGTATA CATATATGTG
181 TATATGTATG CATGGGCATA CAAATGTATA TACATTATAT ACAATTAATA CTATTGAAAA
241 ATAATGAAGG AAGAAATTGC AAAAATAATT GTGATTTGTA GATCATGAAA GGATTCATCA
301 AACATTTTTT AAATATATAA TTTATTCTGA GGGAAAATGG AAATTAATAT CAACTTCCTA
361 TAAGCTTTTT CTTAAAGTTT TCAGCTCCTT CAGAACCACC CCCCTTCCTT TCTATCCATC
421 CATATTAATA AGCCTCTTAG ACTTGATGTC ATCCATACTT TATATGCTTA TCACCCACAC
481 TTCTATGAAA ACTTTGTAAG CCACACCATT TAATTAACTT TCATAACCTT AGTGCCTAGC
541 AAAGAGCCTG GAATGTAATA ACATCTCATA ATGATGTTGA TGACTAGAAT TTAATCTATT
601 GTAAAACATT TGGAGGGAAA NTATATCATA TATGCTATAT ATG
```

8) AL359513, p421, Mutante 38/5

a) LTR-flankierende Sequenz

```
1   ACATGATAAA TACATCAGGT AATAGGTACC CCCAAATAAC CCTGACTTGA TCATTACACA
61  TTTTATGCAT GTGTATTAAT AAAAATAGCC CCTGTACCCC ATAAATATGT AAGATATTA
121 GTATCAATAA AAAGTACTCA GGGCTGGGCA CGGTAGCTCA CACCTGTAAT CCCAGCACT
181 TGGGAGGCTG AGGCGGGCAG AATACCTGAG GTCAGGAGTT CGAGACCAGT CTGGCCAACA
241 TGGTGAAACC CTATCTCTAC TAAAAATACA AAAAAATTAT CTGGGTTTGG TGGTGTGTGC
301 CTGTAATCCC AGCTACTCAG GAGGTTGAGG CAGGGGAATT GCTTAAACCA GGAAGGT
```

b) NcoI-flankierende Sequenz

```
1   CCATGGATGG TTATTGCAGC ACTATTCACA ACAGTCAACA TCATTTGCAA CAACATGGAT
61  AGAACTGGAA GACATTGTTT AGTGAAGTAA CACAGAAAGA AAATATCACA TGTTCTCACT
```

```
121 CATTATGTGG GAGTTAAAAA AATTGATTTC ATGCAGATAG AGAGTAGAAA AATGGTCACT
181 AGAGGGTGGG AAGAGGAGTG GGGAAGGAGG GATAAAGAGA GGTTGGTTTA ATGGGTACAA
241 AAACACAATT AGAAGGAATA AGAGGCCAGA TGCAGTGGCC CATGCCTGTA ATCCCAGCAC
301 TTTGGGAGGC CAAGGGGGGT GGATCACCTG AAGGCAGGAG TTCAAGACCA GCCTGGCCAA
361 CATGGAGAAA CCCCGTCTCT ACTAAAAATA CAAAAATTAT CCAGGCGTGG TAGCCG
```

9) *NOS3*, p424, TF1-Mutante 39/1(Fehse, 1996)

a) LTR-flankierende Sequenz

```
1   ATATGTTTTG CTGATATTTA CATTCATATG TACAGTAATA GTTGATTTAT TTTAATGGCT
61  ATATATTATT CCATTGTTAG AATACACCAG GATTTATTTT TACTTATTTT TTTT
```

b) NcoI-flankierende Sequenz

```
1   CCATGGATCA TGGGGGATTT GCTGCCCACA CTCCTAGGCG GCCTCTTAGA CATCCGTTGG
61  TGCCTAACCC AAGCATCAGT TTGGCAGAGG CCGAGTCCCT CCTCTGTACT GGATACCAAG
121 TCACTTCCAT AGGGATGGGG AGACACCTGG CCCAGGGAGG AGATGAGAAG CAGCCCGGAT
161 GGTGCTACAT ATGTCAGAGA GCAGGGCAGG AAGGGATCAG TGTGGCTGCC AATGGTCAGG
241 AGGG
```

10.) *ITPR3*, p426, Mutante 42/5 (Fehse, 1996)

a) LTR-flankierende Sequenz

```
1    TTATCACTGC ACGACAGGCC CAGGGATACC ACACGTGTTC TTCGGGGCGC ATGGGTTTGC
61  TGTGGGATTT TTCCTGACAC CCAGAACTGT GAGGAGGCCC CTCTGCAGCA GCGGCTTCCG
121 TGCATCCCAG AG
```

b) NcoI-flankierende Sequenz

```
1   CCATGGGCTA CGCAACGGTG GTGGCGTGGG CGACATTCTC CGCAAGCCCT CCAAAGATGT
61  GAGCACTCCT GCCCACTCCC AAACCTGTGG GGCCCAAGCA CTGTCCAGAT CAGCAACTGT
121 GGAGAGTCCT GTCCTTGGCC TCGCGTCAGA TATTCAGGGT TGAACCCCCT CCCCCGAACT
181 TGTATCCACT TTTCCCTGCT TTCCACACCT GGCCAATTCC ATGATATTAC TGCTTAGCTG
241 CCCCCTCACC CTCCCATTCC ACAAGGAAAG ACTTTGGCAA CCAAAC
```

c) InsP3R3-Exon (7437-7494)

```
1   CCATGGGCTA CGCAACGGTG GTGGCGTGGG CGACATTCTC CGCAAGCCCT CCAAAGATGT
```

11) *E2F1*, p427, Mutante 44/4

a) LTR-flankierende Sequenz

```
1   ATTATTGCTC CATTTTATGA TGAGGAAATT TGAGGCCAAA AGGGCCTGAG TTTACCAAGT
61  AGATGAAAAG GTTATTTTTC AGGCTTGGTG AGGCTGAGGT TGGGGGTTTT CCAAAGTCCT
121 GCCCGCCCCA GAGTATTCAA GTACACATCC AGGTAGAAGT AGGCGCCCTC CGTCCCACAA
181 TCCTTCAGGT CCTGCTGAAG CAGAAAGGAG TGAAGACCAG CATTCCTAGC ATGAAACTGA
241 GGAAGAGATA AGGGCCTTCT GTACCTATTA ATACCTACTT GAAAGCAGAA AAGCCTGATA
301 GATGAGGCCC CTTGGCCCTA AGCCTGGCAG CTCCTGATAA GGCTGTTCTC AATGTCAACA
361 GTTTTCAAAA AACAGTTTCC AAAAAATCCA CAGTCACTGG GCAGCCACTT CCATTGATGA
421 TCTCCTTTCA ACCCCATAAT CCCGTAAGTA AGCTTGTTTA TCCACATGGT GCAGGAAGGA
481 AGAGGCTCAG AGAGGGGCAT TCATAGCTCA AGGTCACACA GCAGAACTGA GATGAGAACT
541 TCACTTGTCC CACTGCAAAA CCCAGGACCT GCCCTTGCCA CCCTCTGTAA ATACCCCAAA
601 AGCCAGGCTC AGGGCTGTCA AGATTATAAA GTGTAGTTTC TAAAGGGTA
```

b) NcoI-flankierende Sequenz

```
1   CCATGGGTGA GGCTTGGAGA GATGGGAGGT CCCCAGAGCG TGCACTCAGA GAGTGACCAG
61  CTGGGGGGAG ACTTGAGAAT CGACTGAGAC CTATGCAGTT ACCTTGGACC TCAGACCCTC
121 TGGCCTGAAC CCACGGAACA TATGGGCCAA CTGATGGTGA AGGACTTGGC CAAGGCCACA
181 CAGCCAGGCT GCTGGCTGGC ACCAAACCCC CTGTCTGCTG TTTGATTACA AATATCTGCC
241 TTTTTTTTTT TTTTTTTGAG ATGGAGTCTC ACTCTGTCAC CCAGGCTGGA GTGCAATGGC
301 TTGATCTTGG CTCACTACAA CCTCCACCTC CCCGGTTCAA GTGATTCTCC TGCCTCAGCC
361 TCCCAAGTTG CTGGGATTAC AGTCGCCTGC CACCACACCC AGCTAATTTT TGTATTTTTA
421 ATAGAGATGG GGTTTCACCA TGTTGGTCAG GCTGCTCTCG AACTCCTGAC CTCAGGTGAT
481 CCACCCACCT CGGCTTCCCA AAGTGCTGGA ATTACAGGCG TGAGCCACCG
```

10. Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 14.01.1999 bis zum 9.09.2002 unter der Anleitung von Herrn Privatdozent Dr. Heinz Lother in der Arbeitsgruppe „Somatische Stammzellen“ des Heinrich-Pette-Instituts für Experimentelle Virologie und Immunologie an der Universität Hamburg erstellt.

Ich danke Herrn Privatdozent Dr. Heinz Lother für die Überlassung des Themas, die aktive Anteilnahme am Entstehen der Arbeit und unsere fachlichen Diskussionen, die mir den Einblick in das komplexe Thema ermöglichten.

Ich danke den Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die freundschaftliche Atmosphäre, in der die Arbeit entstand. Insbesondere bedanke ich mich bei Frau Semsa Reus, Herrn Dr. Said Abd Alla und Herrn Dr. Daosong Xu.

Mein besonderer Dank gilt meinem Sohn, meiner Frau und meiner Familie, die mir Kraft geben.

11. Lebenslauf

Name	Andreas Langer	
Geburtstag	02.05.1967	
Geburtsort	Hamburg	
Schulausbildung	1973-1977:	Grundschule Hohnerkamp (Hamburg)
	1977-1986:	Gymnasium Grootmoor (Hamburg), Abitur
Zivildienst	1987-1988	
Studium	1989-1995	Biologie an der Universität Hamburg, Fächer: Zoologie, Biochemie und Genetik, Diplomarbeit am Zoologischen Institut der Universität Hamburg
Promotion	seit 1999	Arbeitsgruppe „Somatische Stammzellen“ des Heinrich-Pette-Instituts für Experimentelle Virologie und Immunologie an der Universität Hamburg

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Andreas Langer, dass ich mich zu keiner Zeit anderweitig um die Erlangung des Doktorgrades beworben habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und keine anderen als die erlaubten Hilfsmittel verwendet habe. Die wörtlich oder inhaltlich aus anderen Quellen stammenden Angaben habe ich als solche kenntlich gemacht sowie die Inanspruchnahme fremder Hilfe namentlich erwähnt.

Hamburg, den 9.September 2002 Andreas Langer