

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), *ITPR3* (Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor Typ 3) und *CCND2* (Cyclin D2) sowie in einen unbekanntem Genlocus („viral tagged gene“ 1, *VTG1*) identifiziert worden. Weitere Integrationen in *NOS3* (epitheliale Stickstoffmonoxid-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 Zelllinie 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 FDPC1-Zellen wurde nach Wachstumsfaktorentzug beobachtet. Es wurde nachgewiesen, dass die Funktion des GluR5 in beiden Zelllinien 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 Kolo-kalisation 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 Δ G5/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.