

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Biochemie
und
III. Medizinische Klinik und Poliklinik
am Klinikum rechts der Isar

**Entwicklung eines retroviralen shRNA-basierten Vektorsystems
zur Untersuchung BCR-ABL-abhängiger Signalkaskaden
in vitro und *in vivo***

Corinna Albers

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie
der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Chr. F. W. Becker
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. M. Groll
2. Univ.-Prof. Dr. J. G. Duyster

Die Dissertation wurde am 29. April 2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 13. Juli 2010 angenommen.

Für meine Eltern
und meine Schwester

Inhalt

Inhalt	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung	4
2.1 Die chronische myeloische Leukämie.....	4
2.1.1 Das Philadelphia-Chromosom.....	5
2.1.2 Die BCR-ABL-Tyrosinkinase und ihre assoziierten Signalwege.....	7
2.1.3 Imatinib mesylate – ein Inhibitor der BCR-ABL-Tyrosinkinase.....	13
2.2 RNA-Interferenz	16
2.2.1 Mechanismus der RNAi.....	16
2.2.2 Anwendung der RNAi	18
2.3 Aufgabenstellung	18
3 Ergebnisse.....	21
3.1 Entwicklung eines dualen retroviralen Vektorsystems	21
3.1.1 Raf-1-Suppression vermittelt durch eine konventionelle shRNAs	21
3.1.2 Raf-1-Suppression vermittelt durch eine miR30-basierte shRNA	24
3.1.3 Optimierung der Raf-1-spezifischen miR-Sequenz.....	26
3.1.4 <i>In vitro</i> Untersuchungen zur Rolle von Raf-1 in der BCR-ABL-abhängigen Tumorigenität	31
3.1.5 Die Rolle von Raf-1 im BCR-ABL-Leukämiemodell <i>in vivo</i>	39
3.2 Das Adapterprotein Grb10 und BCR-ABL	47
3.3 Eine sequenz- und ligationsunabhängige Klonierungsstrategie	52

4	Diskussion	55
4.1	Identifikation potentieller Targetproteine für die CML-Therapie	55
4.2	Die Bedeutung von Raf-1 für die BCR-ABL-abhängige Leukämogenese	59
4.3	Das Adapterprotein Grb10 und BCR-ABL	61
4.4	SLIC Klonierung zum vereinfachten Austausch der miR ^{TOI}	64
4.5	Anwendungsmöglichkeiten des neuartigen Vektorsystems	66
5	Material	67
5.1	Chemikalien und biogene Substanzen.....	67
5.2	Medien und Supplemente.....	69
5.3	Enzyme.....	70
5.4	Membranen.....	70
5.5	Antikörper.....	70
5.6	Verbrauchsmaterialien und molekularbiologische Kitsysteme	72
5.7	Molekulargewichtsmarker für DNA und Proteine.....	72
5.8	Standard Geräte.....	72
5.9	Oligonukleotide	74
5.9.1	Oligonukleotide für miR Klonierung	74
5.9.2	Sequenzierprimer.....	75
5.9.3	Taqman Primer.....	76
5.9.4	Klonierungsprimer.....	77
5.9.5	SLIC Klonierungsprimer	77
5.10	DNA-Konstrukte.....	78
5.11	Bakterienstämme.....	79
5.12	Eukaryotische Zelllinien.....	79
5.13	Mäuse und tierexperimentelle Materialien.....	80
5.14	Tierexperimentelle Materialien.....	80
5.15	Standard Lösungen und Puffer.....	80
6	Methoden.....	83
6.1	Molekularbiologische Arbeitstechniken.....	83
6.1.1	Polymerase-Kettenreaktion.....	83
6.1.2	Restriktionsverdau.....	84
6.1.3	Dephosphorylierung	84

6.1.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	85
6.1.5	Gelextraktion.....	85
6.1.6	Ligation.....	86
6.1.7	Sequenz- und ligationsunabhängige Klonierung.....	86
6.1.8	Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen und Geweben	87
6.1.9	Reverse Transkription zur Generierung von cDNA.....	87
6.1.10	Quantitative RT-PCR.....	87
6.2	Arbeiten mit Bakterien.....	88
6.2.1	Kultivierung von Bakterien.....	88
6.2.2	Transformation	88
6.2.3	Plasmid-Präparation.....	89
6.2.4	Sequenzierung	90
6.3	Arbeiten mit eukaryotischen Zellen.....	90
6.3.1	Kultivierung von Zellen.....	90
6.3.2	Kryokonservierung von Zellen.....	91
6.3.3	Auftauen von Zellen	91
6.3.4	Bestimmung der Zellzahl.....	91
6.3.5	Transiente Transfektion.....	91
6.3.6	Gewinnung von Retrovirus und retrovirale Transduktion.....	93
6.3.7	Durchflusszytometrische Messung (FACS-Analyse).....	96
6.3.8	Selektion mit G418 und Puromycin	96
6.3.9	Herstellung von Einzelklonen.....	97
6.4	Proteinbiochemische Methoden.....	97
6.4.1	Herstellung von Zelllysaten	97
6.4.2	Proteinbestimmung.....	98
6.4.3	SDS-Gelelektrophorese	98
6.4.4	Transfer von Proteinen auf PVDF Membranen (Western Blot)	99
6.4.5	Immunhistochemischer Nachweis transferierter Proteinen	100
6.5	Biologische Untersuchungen	100
6.5.1	Messung der proliferativen Aktivität.....	100
6.5.2	Methylzellulose-Assay primärer Knochenmarkzellen	101

6.6	Grundlegende tierexperimentelle Techniken.....	102
6.6.1	Haltung der Tiere.....	102
6.6.2	Präparation von primären Knochenmarkzellen aus Spender-Mäusen.....	102
6.6.3	Prästimulation muriner Knochenmarkzellen.....	103
6.6.4	Retrovirale Transduktion primärer Knochemarkszellen.....	103
6.6.5	Bestrahlung von Empfängermäusen.....	103
6.6.6	Knochenmarktransplantation	103
6.6.7	Blutentnahme aus der Schwanzvene	104
6.6.8	Überwachung transplanteder Mäuse.....	104
6.6.9	Hypotone Erythrozytenlyse.....	104
6.6.10	Aufbereitung von Organen transplanteder Mäuse	105
6.6.11	Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung muriner Zellen.....	105
7	Literaturverzeichnis	107
8	Abbildungsverzeichnis.....	133
9	Danksagung	137
10	Publikationen	139

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
α	alpha (anti)
β	beta
γ	gamma
λ	Wellenlänge
μg	10^{-6} Gramm
μl	10^{-6} Liter
μmol	10^{-6} Mol
μM ($\mu\text{mol/l}$)	10^{-6} Mol/Liter
Abb.	Abbildung
Abl	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
A. d.	Aqua destillata
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
b	Base
Bad	<i>Bcl-2-associated death promoter</i>
BBMM	<i>basal bone marrow medium</i>
Bcl2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCR	<i>breakpoint cluster region</i>
bp	Basenpaare

BRAF	<i>V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
C	Celsius
Cbl	<i>casitas B-lineage lymphoma</i>
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CHO	chinesischen Hamster Ovarien-Zellen
CIAP	alkalische Phosphatase (<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>)
CML	chronisch myeloische Leukämie
CR	konservierte Region (<i>conserved region</i>)
CREB	<i>cAMP-responsive element-binding protein</i>
CSF	<i>colony stimulating factor</i>
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid)
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ERK	extrazellulär regulierte Kinase (<i>extracellular signal regulated kinase</i>)
et al.	et alii
Exp5	Exportin 5
FACS	Durchflusszytometer (<i>fluorescence activated cell scan</i>)
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FS	Vorwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>)
g	Gravitationsbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GDP	Guanosin-Diphosphat
GFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)

Grb2	<i>growth factor receptor bound protein 2</i>
Grb10	<i>growth factor receptor bound protein 10</i>
GTP	Guanosin-Triphosphat
Gy	Gray (1 Gy=1 J/kg)
h	human, Stunde
HRP	Meerrettich Peroxidase (<i>horseradish peroxydase</i>)
Ig	Immunglobulin
IGF-IR	<i>Insulin-like growth factor receptor</i>
IL	Interleukin
IR	Insulin-Rezeptor
IRES	interne Ribosomeneintrittsstelle (<i>internal ribosomal entry site</i>)
IRIS-Studie	<i>International Randomized Study of Interferon and STI571</i>
IRS-1	Insulin-Rezeptor-Substrat 1
Jak	Janus-Kinase
kb	Kilobase(n), 1000 Basenpaare
kD	Kilodalton
KM	Knochenmark
ko	<i>knockout</i>
LB	Luria-Bertani
lin	linear
log	logarithmisch
LTR	<i>long terminal repeat</i>
m	murin
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase (<i>mitogen activated protein kinase</i>)
Mcl-1	<i>myeloid cell leukemia sequence 1</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
mM (mmol/l)	10 ⁻³ Mol/Liter
min	Minute(n)
miR	miR30-basierende shRNA
miR30	microRNA30
miRNA	microRNA

miR ^{TOI}	targetspezifische miR
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
ng	10 ⁻⁹ Gramm, Nanogramm
NLS	nukleäre Lokalisierungs-Sequenz
nm	10 ⁻⁹ Meter, Nanometer
nM (nmol/l)	10 ⁻⁹ Mol/Liter
NaCl	Natriumchlorid
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDGFR	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>
PDK	Pyruvat Dehydrogenase Kinase
PH	Pleckstrin Homolog
pH	pondus Hydrogenii
Ph ⁺	Philadelphia-Chromosom-positiv
PI	Propidiumiodid
PI3-K	Phosphoinositol 3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol (3,4)-Bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol (3,4,5)-Triphosphat
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC-γ	Phospholipase γ
PP2A	Protein Phosphatase 2A
pri-miR	primäre microRNA
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome ten</i>
PVDF	Polyvinylidifluorid
pY	Phosphotyrosin
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNAi	RNA-Interferenz
RNA Pol	RNA-Polymerase

Ras	<i>rat sarcoma protein</i>
Raf	<i>rat fibrosarcoma protein</i>
Raf-1	<i>V-Raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RSK	40S ribosomaler S6 Kinase
RT	Reverse Transkriptase/Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
SS	Seitwärtsstreulicht (<i>sideward scatter</i>)
SCF	Stammzellfaktor (<i>stem cell factor</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SH2	<i>Src-homology 2</i>
SH3	<i>Src-homology 3</i>
SHC	<i>src homologous and collagen protein</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
SLIC	sequenz- und ligationsunabhängige Klonierung (<i>sequence and ligation-independent cloning</i>)
SOS	<i>son of sevenless</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
STI	Signaltransduktionsinhibitor
TAE	Tris-Acetat Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TOI	<i>target of interest</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheit (unit)
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
Y	Tyrosin
YFP	gelb fluoreszierendes Protein (<i>yellow fluorescent protein</i>)

1 Zusammenfassung

Onkogene wie BCR-ABL aktivieren eine Vielzahl verschiedener, teilweise aberranter Signalkaskaden oder ganzer Signalnetzwerke in der malignen Leukämiezelle und induzieren hierdurch Proliferation, Transformation und Antiapoptose. Die Identifikation kritischer und zentraler Mediatorproteine innerhalb dieser Signalvermittlung ist wesentlich für die Entwicklung neuer Anti-Krebs-Therapien. Bislang war die Auswahl der untersuchbaren Mediatorproteine durch begrenzte Verfügbarkeit von Knochenmark aus *Knockout*-Mäusen limitiert. Ein duales Vektorsystem zur Expression des Onkogens und gleichzeitiger siRNA-vermittelter Depletion des zu untersuchenden Targetproteins könnte die kosten- und zeitintensive *Knockout*-Strategie ergänzen.

Nach erfolgreicher Generierung eines polycistronischen retroviralen Vektorsystems zur Expression des BCR-ABL-Onkogens und gleichzeitiger Suppression der zu untersuchenden Targets, wurde in der vorliegenden Arbeit die Bedeutung von Raf-1, BRAF und Grb10 für die BCR-ABL-vermittelte Leukämogenese *in vitro* und *in vivo* untersucht. Hierzu wurde ein murines Knochenmarktransplantationsmodell unter Verwendung des dualen Vektorsystems etabliert.

Die Expression des Onkogens wurde direkt an die Suppression des Targets gekoppelt. Dies gelang durch Klonierung des Onkogens mit einer targetspezifischen miR30-basierten shRNA (miR^{TOI}) zusammen auf einem gemeinsamen Vektor. Sowohl die Expression des Onkogens als auch die der miR^{TOI} wird durch den starken RNA-Polymerase II Promotor LTR angetrieben. Demnach wird innerhalb der Zelle ein einziges mRNA-Transkript generiert, welches sowohl das Onkogen als auch die miR^{TOI} umfasst. Das Vektorsystem gewährleistet

sowohl *in vitro* in verschiedenen Zelllinien und primären murinen Knochenmarkzellen als auch *in vivo* in Knochenmarktransplantationsexperimenten eine stabile, verlässliche und dauerhafte Suppression des zu untersuchenden Targetproteins in jeder onkogenexprimierenden Zelle.

Die Zuverlässigkeit des Vektorsystems wurde anhand der Zielstruktur Raf-1 aufgrund seiner zentralen Stellung innerhalb der MAPK/ERK-Kaskade überprüft. *Knockout*-Mäuse für Raf-1, welches unterhalb von Ras in die MAPK/ERK-Signalkaskade einzuordnen ist, weisen einen Phänotyp embryonaler Letalität auf. Daher konnte die Rolle von Raf-1 für die Signalvermittlung von BCR-ABL bis dato nicht *in vivo* charakterisiert werden. Erst unter Verwendung des Vektorsystems kann in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Raf-1, für die BCR-ABL-abhängige Transformation hämatopoetischer Zellen erforderlich ist. BRAF hingegen erwies sich als entbehrlich für die onkogene Aktivität von BCR-ABL. Auf molekularbiologischer Ebene führt die Depletion von Raf-1 zu einer Reduktion der BCR-ABL-abhängigen, nicht aber der Zytokin-abhängigen Phosphorylierung von ERK. Somit stellt Raf-1 ein Bindeglied zwischen der konstitutiv aktiven Tyrosinkinase BCR-ABL und dem promotogenen MAPK/ERK-Signalweg dar.

Auch die Bedeutung des Adapterproteins Grb10 für die Transformationsfähigkeit BCR-ABL-positiver Zellen wurde in dieser Arbeit untersucht. Grb10 vermag BCR-ABL direkt zu binden, und ist an der Aktivierung der AKT-Signalkaskade beteiligt. Hier konnte gezeigt werden, dass Grb10-dezimierte primäre Knochenmarkzellen der Maus eine geringere Fähigkeit aufweisen, transformierte Kolonien in semisolidem Methylzellulose-Medium zu bilden. Im murinen Transplantationsmodell induzierten Grb10-negative, BCR-ABL-transduzierte Knochenmarkzellen zwar eine myeloproliferative Erkrankung, doch war die hiermit einhergehende Leukozytose deutlich verlangsamt und insgesamt war eine signifikante Verlängerung des Latenz zu beobachten.

Um weitere interessante Targets *in vitro* und *in vivo* auf schnelle und zuverlässige Art untersuchen zu können, wurde außerdem eine sequenz- und ligationsunabhängige Klonierungsstrategie entwickelt, die einen einfachen Austausch der miR^{TOI} in dem polycistronischen Vektor ermöglicht. Mithilfe dieser Methode könnten ganze miR^{TOI}-Bibliotheken subkloniert werden um weitere relevante Targets für die CML-Therapie mittels groß angelegter Untersuchungen zu identifizieren. Somit stellt das Vektorsystem ein vielseitiges Werkzeug für die Untersuchung der molekularen Pathogenese verschiedener Onkogene dar.

Das Vektorsystem wäre theoretisch geeignet, jedes beliebige Target im Zusammenhang mit jedem beliebigen Onkogen oder auch anderem Transgen zu untersuchen, das keine Krebs erzeugende Eigenschaften aufweist. Auch bestünde die Möglichkeit, ein endogenes Wildtyp-Protein herunter zu regulieren und gleichzeitig eine mutierte Form des Proteins zu über-exprimieren. Hierdurch würde ein Genaustausch bzw. ein *knock-in* simuliert werden.

2 Einleitung

2.1 Die chronische myeloische Leukämie

Jedes Jahr erkranken in Deutschland 1000 Menschen neu an chronischer myeloischer Leukämie (CML), entsprechend etwa 20 % aller Leukämieerkrankungen¹. Unter den myeloproliferativen Erkrankungen ist die CML die am häufigsten vorkommende. Die Erkrankung tritt im späteren Erwachsenenalter auf, wobei Männer hierbei häufiger betroffen sind als Frauen. Regionale oder ethnische Unterschiede hinsichtlich der Inzidenz sind keine bekannt, doch gelten ionisierende Strahlung sowie Chemikalien wie Benzol als Risikofaktoren. Charakteristisch für die CML ist das durch reziproke Translokation der Chromosome 9 und 22 entstehende so genannte Philadelphia-Chromosom. In der Folge entsteht ein Fusionsgen aus den Genen für *breakpoint cluster region* (BCR) und *Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1* (ABL). Das Philadelphia-Chromosom wurde erstmals 1960 erwähnt². Die Rolle der BCR-ABL-Genfusion wird in Kapitel 2.1.2 detailliert beschrieben.

Die CML wird in drei Stadien eingeteilt, die chronische Phase, die Akzellerationsphase und schließlich den Blastenschub. Hierbei dauert die erste, die chronische, Phase unbehandelt in der Regel drei bis fünf Jahre an. In dieser Phase bleibt die Erkrankung meist symptomfrei, eine Erhöhung der Leukozyten ($>10.000/\text{mm}^3$) kann jedoch durch Zufall bei Routineuntersuchungen des Blutes nachgewiesen werden. Die Patienten sind allgemein müde und nur begrenzt leistungsfähig und teilweise lassen sich bereits in dieser Phase der CML unreife Vorstufen der myeloiden Reihe im Blut nachweisen, was als so genannte Linksverschiebung bezeichnet wird. Es handelt sich hierbei jedoch nicht um einen Reifungsstopp der neoplastischen Zelle, wie er bei akuten Leukämien zu beobachten ist³. An die chronische Phase schließt sich die Akzellerationsphase an. Die vermehrt produzierten Leukozyten verdrängen

zunehmend die gesunden Blutbestandteile wie Erythrozyten und Thrombozyten. Hierdurch kann es zu einer erhöhten Blutungsneigung und Blässe kommen. Gleichzeitig werden auch die funktionsfähigen Leukozyten durch die leukämischen Zellen verdrängt, was sich in erhöhter Infektanfälligkeit bemerkbar macht. In der dritten Phase, dem Blastenschub, beginnen die unreifen Blasten, die während der Akzelerationsphase im Knochenmark lokalisiert waren, ins periphere Blut auszuschwemmen. Diese Blasten lassen sich nun in hoher Zahl im Blut des Patienten nachweisen (> 20 % Blasten). In dieser Phase gleicht die Leukämie einer akuten Form und führt unbehandelt rasch zum Tod.

2.1.1 Das Philadelphia-Chromosom

Charakteristisches Merkmal der CML ist das Philadelphia-Chromosom. Es entsteht durch die reziproke Translokation zwischen den q-Armen der Chromosome 9 und 22. Diese Translokation, die bereits in der hämatopoetischen Stammzelle stattfindet, führt zur Genfusion von BCR und ABL (Abb. 2.1). Für das Chromosom 9 wurde der Bruchpunkt in 9q34, für das Chromosom 22 in 22q11 nachgewiesen⁴.

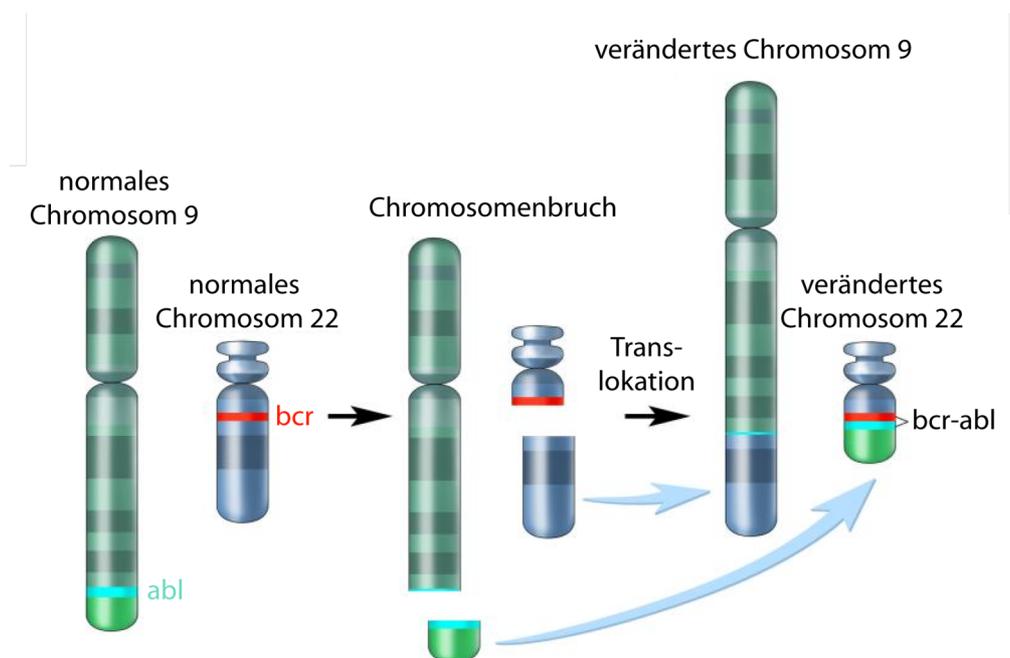


Abb. 2.1: Reziproke (9;22)-Translokation resultiert in der Bildung des Philadelphia-Chromosoms

Auf DNA-Ebene wurden sowohl innerhalb des ABL-Gens als auch innerhalb des BCR-Gens verschiedene Bruchpunkte detektiert (Abb. 2.2). Die verschiedenen großen Fusionsgene kodieren für p190 BCR-ABL, p210 BCR-ABL und p230 BCR-ABL abhängig vom jeweiligen Bruchpunkt. Das kleinere p185 BCR-ABL (auch bekannt als p190 BCR-ABL) ist vornehmlich mit der akuten lymphatischen Leukämie (ALL)⁵, p210 BCR-ABL hauptsächlich mit der CML⁶⁻⁸ und p230 BCR-ABL vorwiegend mit der chronischen neutrophilen Leukämie⁹ assoziiert. Die einzelnen Domänen sowohl von BCR und ABL als auch der verschiedenen Formen von BCR-ABL sind in Abb. 2.2 schematisch dargestellt.

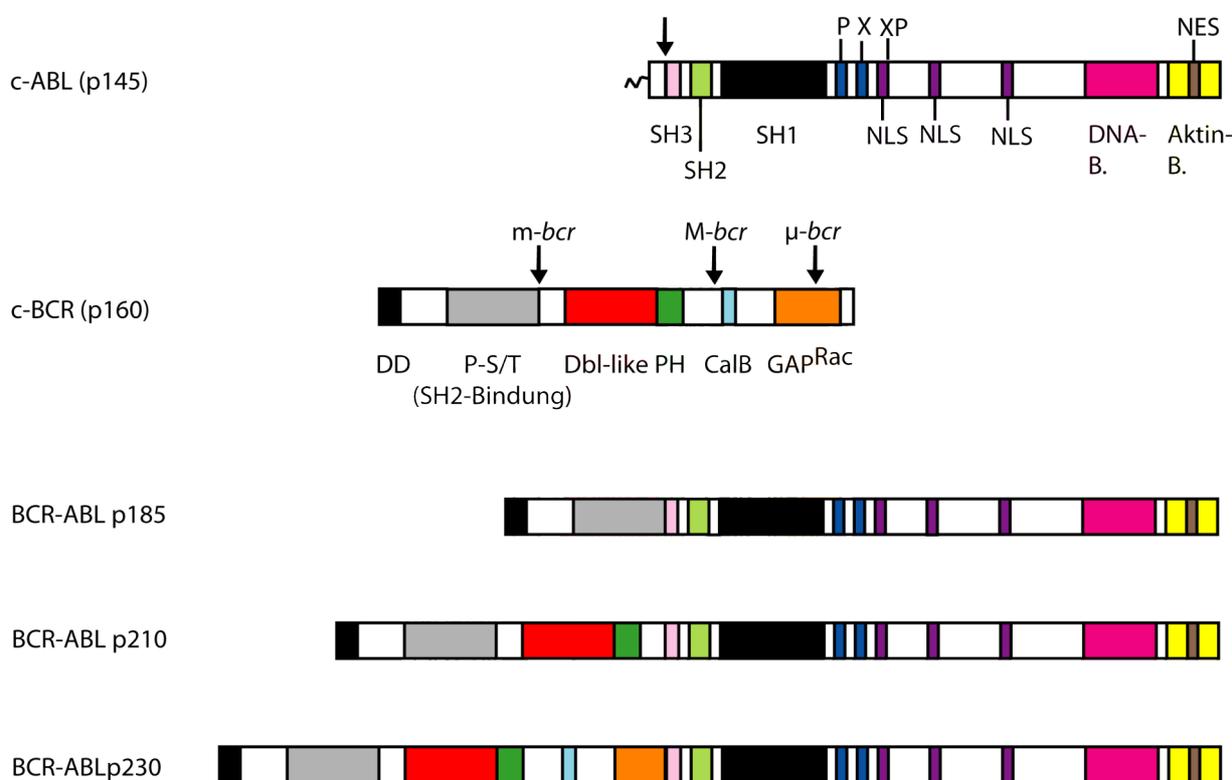


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von c-ABL, c-BCR und BCR-ABL

adaptiert nach Carella¹⁰. DD: Dimerisierungsdomäne; P-S/T: Prolin-, Serin-, Threoninreiche Domäne; Dbl-like: Dbl-homologe Domäne; PH: Pleckstrin-homologe Domäne; CalB: Calciumabhängige Membran/Phospholipid-Domäne; GAP^{Rac}: Rac-GTPase-aktivierende Domäne; SH3: Src-homologe Domäne 3; SH2: Src-homologe Domäne 2; SH1: Abl-Tyrosinkinase-Domäne; NLS: Nukleäres Translokationssignal; DNA-B.: DNA bindende Domäne; NES: Nukleäres Exportsignal; Aktin-B.: Aktin-bindende Domäne

2.1.2 Die BCR-ABL-Tyrosinkinase und ihre assoziierten Signalwege

Die Fusion der beiden Genloki führt in der Philadelphia-Chromosom-positiven (Ph^+)-Zelle zur Expression des chimären Proteins BCR-ABL, einer konstitutiv aktive Tyrosinkinase. Trotz der Tatsache, dass sowohl die Kinase Abl als auch das Fusionsprotein BCR-ABL eine nukleäre Lokalisierungs-Sequenz (NLS)-Domäne enthält, ist nur BCR-ABL ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert. Eine mögliche Ursache hierfür könnte eine verstärkte Bindung an filamentäres Aktin sein¹¹, die durch die Tetramerisierung von BCR-ABL hervorgerufen wird¹². Die Homotetramerisierung wird durch die N-terminale *coiled-coiled*-Domäne des BCR ermöglicht¹³ und ist auch wichtig für die konstitutive Aktivierung von BCR-ABL¹⁴ und die Interaktion mit Proteinen, die *src homology 2* (SH2)-Domänen enthalten¹⁵.

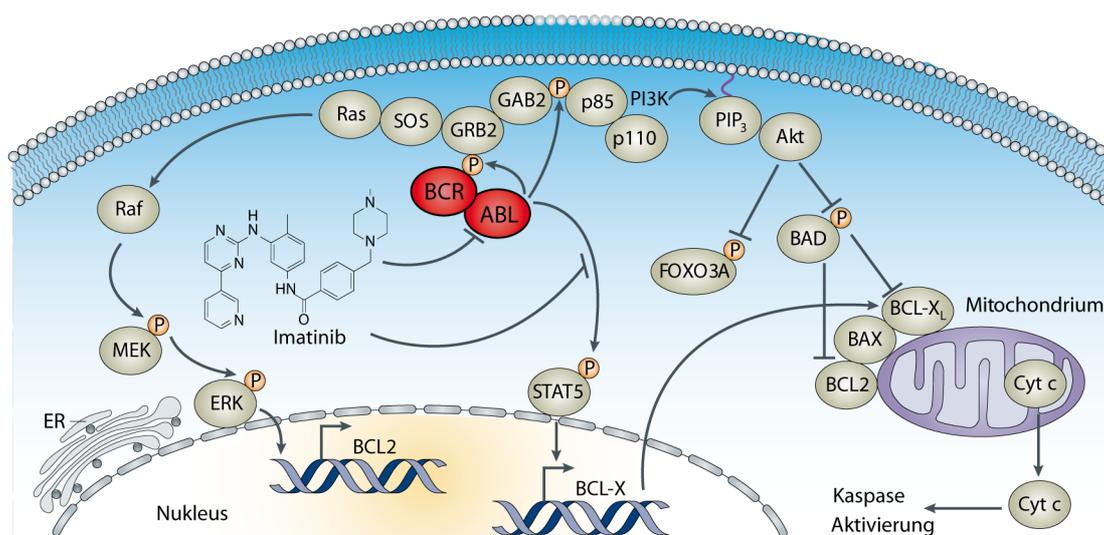


Abb. 2.3: Signalkaskaden des BCR-ABL Onkogens

BCR-ABL aktiviert in der leukämischen Zelle unter anderem die MAPK/ERK-Kaskade, den PI3-Kinase/AKT-Signalweg und STAT5 und vermittelt somit sowohl antiapoptische Signale als auch Signale für Proliferation und Transformation. Abbildung adaptiert nach Force *et al.*¹⁶.

Innerhalb der leukämischen Zelle aktiviert BCR-ABL eine Vielzahl verschiedener Kaskaden und vermittelt auf diese Weise Signale für Transformation, Proliferation, reduzierte Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren und Antiapoptose. In Abb. 2.3 sind die Hauptsignalkaskaden schematisch dargestellt. Hierzu zählen die Raf/MAPK/ERK-Kaskade¹⁷, die unter anderem die Expression von *B-cell lymphoma 2* (Bcl2) vermittelt und die Phos-

phatidylinositol-3-Kinase (PI3-K)/AKT-Kaskade^{18,19}, die zum einen über *Bcl-2-associated death promoter* (Bad) die Einleitung der mitochondrialen Apoptose hemmt, zum anderen die Phosphorylierung und somit Inaktivierung des Transkriptionsfaktors FOXO3A induziert²⁰. Als dritter Hauptsignalweg ist die Janus-Kinase (Jak)/*signal transducer and activator of transcription* (STAT)-Kaskade zu nennen²¹⁻²³, dessen Aktivierung zu einer Hochregulierung der *proto-oncogene serine/threonine* Proteinkinase Pim-1 und der antiapoptotisch wirkenden Gene der Bcl-2-Familie, A1 und Bcl-X, führt²⁴⁻²⁶. Auch *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF-κB) wird vermehrt durch BCR-ABL aktiviert²⁷.

2.1.2.1 Die MAPK/ERK-Signalkaskade und Raf-1

BCR-ABL rekrutiert Adaptermoleküle, wie *growth receptor bound Protein 2* (Grb-2), *Crk-like Protein* (CRKL) und *src homologous and collagen Protein* (SHC), die SH2- und SH3-Domänen enthalten, um an Ras zu binden²⁸. Die Bindung zwischen BCR-ABL und Grb2 erfolgt über Y177 in BCR²⁸⁻³⁰, ein konstitutiv phosphorylierter Tyrosinrest. Durch die Bindung des Komplexes aus Adaptermolekülen an BCR-ABL wird der Austausch von Guanosin-Diphosphat (GDP) durch die Aktive Form Guanosin-Triphosphat (GTP) im *rat sarcoma* Protein (Ras) induziert. Ras-GTP wiederum ist die aktive Form von Ras und stimuliert die Serin-/Threonin-Kinase *rat fibrosarcoma* (Raf). Raf phosphoryliert die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen MEK1 und MEK2, diese wiederum phosphorylieren und aktivieren dadurch die Serin-/Threonin-Kinasen extrazellulär regulierte Kinase 1 und 2 (ERK1 und ERK2)^{31,32}. ERK1/2 induziert schließlich den Übergang von 40S ribosomaler S6 Kinase (RSK) in die katalytisch aktive Form. Außerdem kann ERK1/2 in den Zellkern translozieren und dort verschiedene Transkriptionsfaktoren, unter anderem Elk-1 und c-myc³³ und c-Myb³⁴ stimulieren. Auf diese Weise werden Signale für Proliferation und Induktion der Transformation in der BCR-ABL-positiven Zelle vermittelt. Des Weiteren hat der Raf/MEK/ERK-Signalweg durch post-translationale Phosphorylierung regulatorischer Proteine wie Bad, dem *BH-only* Protein Bim, *myeloid cell leukemia sequence 1* (Mcl-1) und Caspase 9 einen starken Einfluss auf die Regulation der Apoptose. Da auch das Adapterprotein *growth receptor bound Protein 10* (Grb10) an der Raf-1-abhängigen Phosphorylierung von Bad beteiligt zu sein scheint³⁵, erfolgt eine genaue Beschreibung in Kapitel 2.1.2.2 „Das Adapterprotein Grb10 und BCR-ABL“.

Ein wichtiger Bestandteil des Raf-1/MAPK/ERK-Signalweges ist das Protein Raf-1, ein Mitglied der Kinasen aus der Raf-Familie, zu der des weiteren A-Raf und BRAF zählen. Zwei Mitgliedern dieser Familie, nämlich Raf-1 und BRAF, wurde eine Bedeutung für die BCR-ABL-abhängige Transformation in *in vitro* Versuchen zugeschrieben. Alle Mitglieder dieser Familie weisen strukturelle Ähnlichkeiten auf. So bestehen sie aus drei konservierten Regionen (*conserved regions*, CR1-3) und stark variierenden, diese Regionen flankierenden Bereichen, die jedoch für jede einzelne Isoform zwischen den Spezies hoch konserviert sind. Hierbei sind die N-terminalen Domänen CR1 und CR2 Bestandteile der regulatorischen Domäne, CR3 stellt die katalytische Kinasedomäne dar (Abb. 2.4). Deletionen der regulatorischen Hälfte des Proteins führen zu konstitutiver Aktivierung der Kinase³⁶.

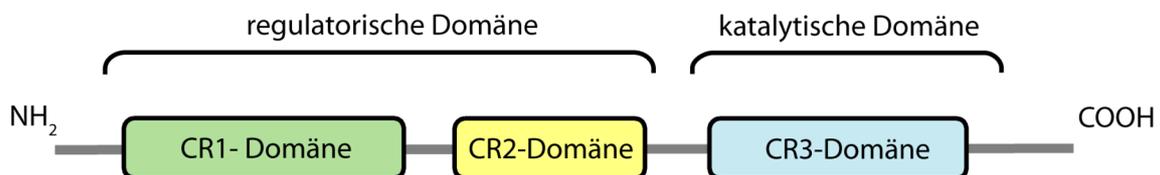


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der Proteine der Raf-Familie.

Die Raf-Isoformen Raf-1, A-Raf und BRAF bestehen alle aus den konservierten Domänen (*conserved regions*) CR1, CR2 und CR3. CR1 beinhaltet eine Ras-Bindungsdomäne und eine Cystein-reiche Subdomäne, die beide für die Bindung an aktiviertes Ras-GTP an der Zellmembran erforderlich sind. CR2 ist reich an Serin- und Threoninresten und hat inhibitorische Funktion auf die katalytische Domäne. CR3 beinhaltet die Protein Kinase Domäne.

Die Mitglieder der Raf-Familie unterscheiden sich deutlich in ihrem Expressionsmuster in murinen Geweben. Das 3,1 kb große Raf-1-Transkript kann ubiquitär nachgewiesen werden, am stärksten hierbei im quergestreiften Muskel, Cerebellum und fetalen Gehirn. Im Gegensatz hierzu weist A-Raf starke Varianzen in den Expressionsstärken auf, die höchsten sind in Epididymis³⁷ und Ovarien festzustellen. BRAF hingegen wird nur in einigen Geweben exprimiert, insbesondere im fetalen und adulten Gehirn. Eine *splice*-Variante von BRAF wird außerdem in hohem Maße in Hoden, Plazenta und fetalen Membranen gebildet³⁸.

Die Unterschiede in der Struktur und den Expressionsmustern der Mitglieder der Raf-Familie spiegeln sich auch in den Phänotypen der entsprechenden *Knockout*-Mäuse (^{-/-}) wider. A-Raf^{-/-}-Mäuse sterben zwischen Tag 7 und 21 postpartum. Die Tiere weisen hauptsächlich neurologische und intestinale Abnormalitäten auf und versterben schließlich an Überdehnung des Darms³⁹. BRAF^{-/-}-Mäuse versterben hingegen bereits im Uterus zwischen

Tag 10,5 und 12,5 an massiven Einblutungen in verschiedene Körperhöhlen. Diese Einblutungen entstehen aufgrund von gerichteter Apoptose des differenzierten Endothelgewebes. Außerdem sind bei BRAF^{-/-}-Mäusen anatomische Abnormalitäten des Nervengewebes zu beobachten, das Wachstum und die Differenzierung des Neuroepitheliums sind gestört⁴⁰. Der Phänotyp von Raf-1^{-/-}-Mäusen äußert sich ebenfalls in einer embryonalen Letalität. Allerdings sind bei Raf-1^{-/-}-Mäusen andere Gewebe betroffen als bei BRAF^{-/-}-Mäusen. In den Inzuchtstämmen C57/B1/6 und 129/OLA versterben die homozygoten Raf-1^{-/-}-Embryonen zwischen Tag 10,5 und 12,5. Insgesamt sind die Embryonen kleiner als ihre Wildtyp-Wurfgeschwister und weisen Defekte der Plazenta, der Haut und der Lunge auf^{41,42}. Außerdem wurde in fetalen Lebern der Raf-1^{-/-}-Mäuse ein geringerer Vaskularisierungsstatus als in den Wildtyp-Tieren festgestellt, die Tiere sind insgesamt blasser als ihre Wildtyp-Wurfgeschwister.

2.1.2.2 Das Adapterprotein Grb10 und BCR-ABL

Ein weiterer, von BCR-ABL stark aktivierter Signalweg ist die PI3-K/AKT-Kaskade. PI3-K, auch Protein Kinase B genannt, besteht aus einem Heterodimer aus einer regulatorischen p85-Untereinheit und einer katalytischen p110-Untereinheit. Die Kinase vermag sowohl Proteine als auch Lipide zu phosphorylieren⁴³. Die p85-Untereinheit bildet über *casitas B-lineage lymphoma* (Cbl) und CRKL einen Komplex mit BCR-ABL⁴⁴ und wird dabei phosphoryliert. CRKL, ein Protein, das Zellmotilität und integrinvermittelte Zelladhäsion reguliert, bindet an die SH3-Domäne von BCR-ABL, wird aber auch selbst von ABL phosphoryliert⁴⁵. Alternativ kann PI3-K auch über Ras, Src und *insulin receptor substrate 1* (IRS-1) aktiviert werden. PI3-K wiederum katalysiert die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol (3,4)-Bisphosphat (PIP₂) zum *second messenger*-Molekül Phosphatidylinositol (3,4,5)-Triphosphat (PIP₃)⁴⁶. Die gegenläufige Reaktion der Dephosphorylierung wird durch die Phosphatase *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) katalysiert⁴⁷. Auch der verringerte Abbau von PIP₃, vermittelt durch die Inhibition der *SH2-containing inositol* Phosphatase (SHIP1), spielt in der Aktivierung von nachfolgenden Signalwegen eine Rolle⁴⁸.



Abb. 2.5: Schematische Darstellung des Adapterproteins Grb10

Pro: prolinreiche Domäne, RA: RAS-Assoziation; PH: Plekstrin-Homologie; PBS: *between PH and SH2*; SH2: Src-Homologie.

Die Bindung von PIP₃ an AKT induziert eine Konformationsänderung von AKT, die mit einer Demaskierung der Aminosäure Thr308 einhergeht. Somit wird dieser Threoninrest für die Pyruvat Dehydrogenase Kinase (PDK) 1 zugänglich. Die PDK1-vermittelte Phosphorylierung von Thr308⁴⁵ ist wichtig für die Aktivierung von AKT. Die folgende Phosphorylierung durch PDK2 an Ser473⁴⁹ verstärkt die Aktivierung zusätzlich. Essentielle Voraussetzung für die Phosphorylierung von AKT ist die Translokation von PDK1 an die Plasmamembran⁵⁰. Aktive AKT-Kinase dissoziiert von der Zellmembran, transloziert in den Zellkern⁵¹ und vermittelt dort über eine Vielzahl verschiedener Moleküle Signale für Proliferation und Antiapoptose. Unter anderem phosphoryliert AKT Transkriptionsfaktoren wie *cAMP-responsive element-binding protein (CREB)*, *forkhead transcription factors*, E2F und NF-κB⁵².

Das Adapterprotein Grb10 wird als Bestandteil dieser PI3-K/AKT-Signalkaskade diskutiert. Die Domänenstruktur ist in Abb. 2.5 dargestellt. Wird Grb10 überexprimiert, so wird spezifisch die Aktivierung der Serin-/Threonin-Kinase AKT induziert⁵³. Auch eine Fusion des Grb10-Adapterproteins mit AKT führt zu einer konstitutiven Aktivierung von AKT. Bisher unveröffentlichte Daten geben Anlass zu der Vermutung, dass Grb10 als Adapterprotein von c-Kit Rezeptor⁵³ für die Translokation von AKT an die Zellmembran von Bedeutung ist. In diesen Mechanismus scheint eine Interaktion von Grb10 mit 14-3-3 involviert zu sein. Die Lokalisierung von AKT an der Membran wiederum ist essentiell für seine Phosphorylierung und somit Aktivierung durch PDK1/2. Die hypothetische Funktion von Grb10 bei der BCR-ABL-abhängigen Aktivierung der PI3-K/AKT-Kaskade ist in Abb. 2.6 dargestellt.

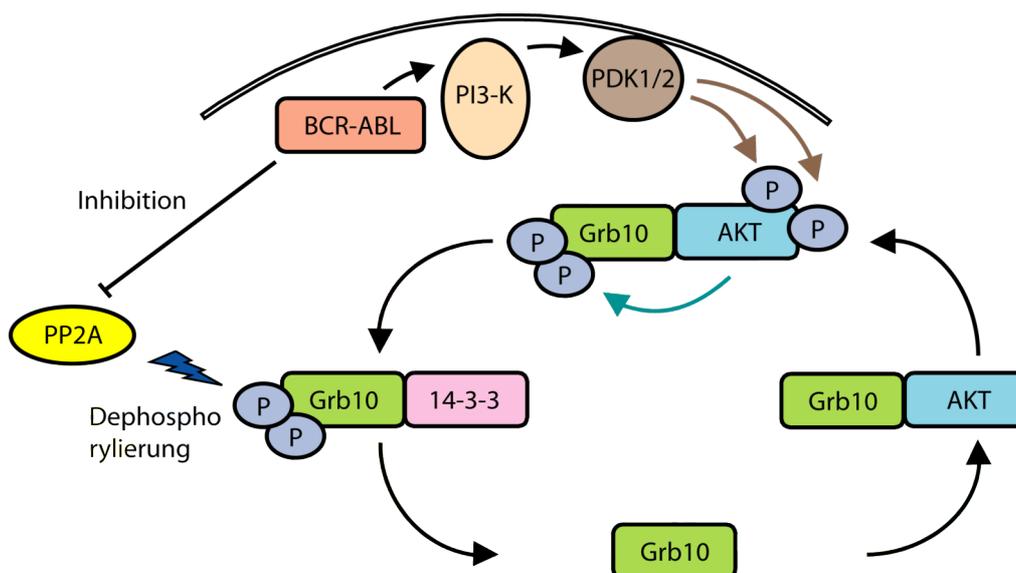


Abb. 2.6: Modell der Grb10-vermittelten Aktivierung von AKT.

Im unphosphorylierten Zustand interagiert das Adapterprotein Grb10 mit AKT und rekrutiert AKT an die Zellmembran. AKT wird phosphoryliert und somit aktiviert. Aktiviertes AKT phosphoryliert wiederum Grb10. Phosphoryliertes Grb10 interagiert mit 14-3-3. Die Interaktion von 14-3-3 mit phosphoryliertem Grb10 ist möglicherweise für den Transport von Grb10 zurück ins Zytoplasma notwendig. Grb10 wird von der Phosphatase PP2A dephosphoryliert und kann nun wieder mit AKT interagieren. BCR-ABL aktiviert die Grb10-abhängige AKT-Phosphorylierung einerseits durch Aktivierung der AKT-Kinase PDK1 durch PI3-K, andererseits durch Inhibition der Phosphatase PP2A (adaptiert nach Urschel *et al.*⁵⁴).

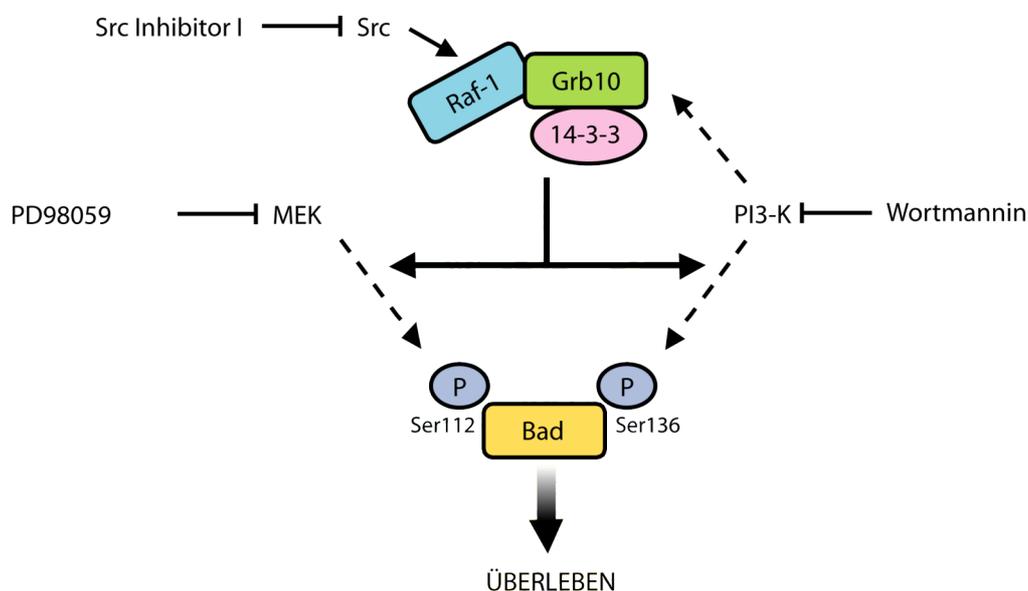


Abb. 2.7: Die Rolle von Grb10 im mitochondrialen Apoptoseweg

Grb10 bildet mit Raf-1 und 14-3-3 einen Komplex, der nach Aktivierung durch PI3-K und Src am Mitochondrium das proapoptische Protein Bad an den Aminosäuren Ser112 und Ser136 phosphoryliert und dadurch inaktiviert (Adaptiert nach Kebache *et al.*³⁵).

Grb10 wird des Weiteren eine Funktion in der mitochondrialen Einleitung der Apoptose zugeschrieben. Dieser mitochondriale Apoptoseweg gliedert sich wie folgt: aktives, unphosphoryliertes Bad induziert Apoptose durch Inhibition der Aktivität von Bcl-2, Bcl-XL und Bcl-W. Hierbei handelt es sich um antiapoptotische Proteine der Bcl-2-Familie. Als Folge dieser Inhibition aggregieren zwei weitere Mitglieder der proapoptotischen Proteine, namentlich Bak und Bax. Daraufhin wird Cytochrom c aus den Mitochondrien freigesetzt, Caspasen aktiviert und schließlich die Apoptose eingeleitet^{55,56}. Dieser mitochondriale Apoptoseweg kann durch eine Vielzahl mitogener und nichtmitogener Kinasen inaktiviert werden. Ausschlaggebend hierfür ist die Phosphorylierung von Bad an den Serinresten Ser112, Ser136 und Ser155. Zu den Kinasen von Bad zählen unter anderem AKT⁵⁷⁻⁶⁰, p70S6⁶¹, Protein Kinase A^{62,63} und p90RSK⁶⁴. Somit können sowohl Kinasen der PI3-K/AKT- als auch der MAPK/ERK-Kaskade Bad inaktivieren. Nantel und Kollegen konnten in mehreren Arbeiten zeigen, dass Grb10 für die Phosphorylierung und die daraus resultierende Inaktivierung von Bad erforderlich ist. Grb10 interagiert mit Raf-1^{35,65}. Der Komplex ist am Mitochondrium lokalisiert⁶⁶ und für die PI3-K/AKT- und MAPK/ERK-abhängige Phosphorylierung von Bad an Ser112 und Ser136 erforderlich (Abb. 2.7). Als biologische Konsequenz weisen Grb10^{-/-} und Raf-1^{-/-} *mouse embryonic fibroblast* Zellen (MEFs) erhöhte Apoptoseraten auf, wenn Bad kotransfiziert wird³⁵.

Ein wichtiger Hinweis dafür, dass Grb10 auch eine entscheidende Komponente in der BCR-ABL-abhängigen Transformation darstellt, ist der Nachweis einer direkten Interaktion zwischen Grb10 und BCR-ABL sowohl in Hefen, als auch in murinen und humanen Zelllinien⁶⁷.

2.1.3 Imatinib mesylate – ein Inhibitor der BCR-ABL-Tyrosinkinase

Seit 2001 ist ein von Novartis (Basel, Schweiz) entwickelter Inhibitor der BCR-ABL-Tyrosinkinase von der amerikanischen „Food and Drug Administration“ in Amerika, seit 2002 auch in Europa zur Therapie BCR-ABL-positiver Leukämien zugelassen: Imatinib mesylate (STI571, Glivec®, Gleevec™).

Es handelt sich hierbei um ein 2-Phenylaminopyrimidin-Derivat (Abb. 2.8), das als spezifischer Inhibitor von vier bekannten Tyrosinkinasen fungiert. Außer der Abl-assoziierten Tyrosinkinasen^{68,69} werden auch ARG⁷⁰, cKIT^{71,72} und die PDGF-Rezeptor-

tyrosinkinase^{69,71,73} mit der gleichen Wirkung gehemmt. Imatinib mesylate bindet BCR-ABL im Bereich der ATP-Bindedomäne und stabilisiert das Onkoprotein in seiner inaktiven Form (Abb. 2.9). In dieser inaktiven Konformation kann es ATP nicht binden, und somit wird die Phosphorylierung von Substraten verhindert^{74,75}.

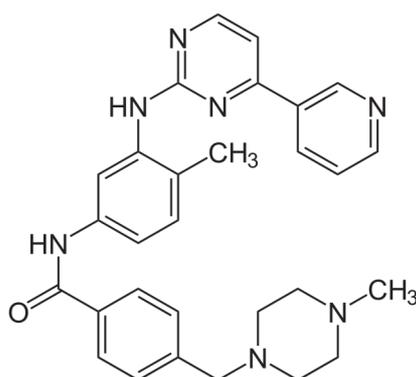


Abb. 2.8: Chemische Formel von Imatinib mesylate

Der Durchbruch für Imatinib als Goldstandard für die CML-Therapie kam mit Publikation der *International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS)*-Studie. Ursprünglich war diese Phase III-Studie als zweiarmige Vergleichsstudie zur CML-Therapie geplant. Die eine Hälfte der Patienten sollte mit dem zu diesem Zeitpunkt neuen BCR-ABL-Inhibitor Imatinib, die andere Hälfte sollte mit der damaligen Standardtherapie, einer Kombination von Interferon α mit Cytarabin, behandelt werden. Doch bereits bei der ersten Zwischenauswertung mit einer mittleren Beobachtungszeit von 18 Monaten wurde deutlich, dass das Ansprechen auf die Imatinib-Behandlung sehr viel höher war als auf die Standardtherapie⁷⁶. Ein gutes zytogenetisches Ansprechen war bei 87,1 % in der Imatinib gegenüber 34,7 % in der Interferon α /Cytarabin-Gruppe zu beobachten, die Werte für eine komplette zytogenetische Remission lagen bei 76,2 % in der Imatinib und 14,5 % in der Interferon α /Cytarabin-Gruppe. Zudem war Imatinib deutlich besser verträglich als die bis dahin gängige Standardtherapie aus Interferon α und Cytarabin. Aus diesem Grund wechselten die meisten Patienten aus dem Interferon α /Cytarabin-Arm in den Imatinib-Arm. Die *IRIS*-Studie hat sich daher mittlerweile von einer anfänglich zweiarmigen Studie praktisch in eine reine Beobachtungsstudie für die Behandlung von CML-Patienten mit Imatinib gewandelt.

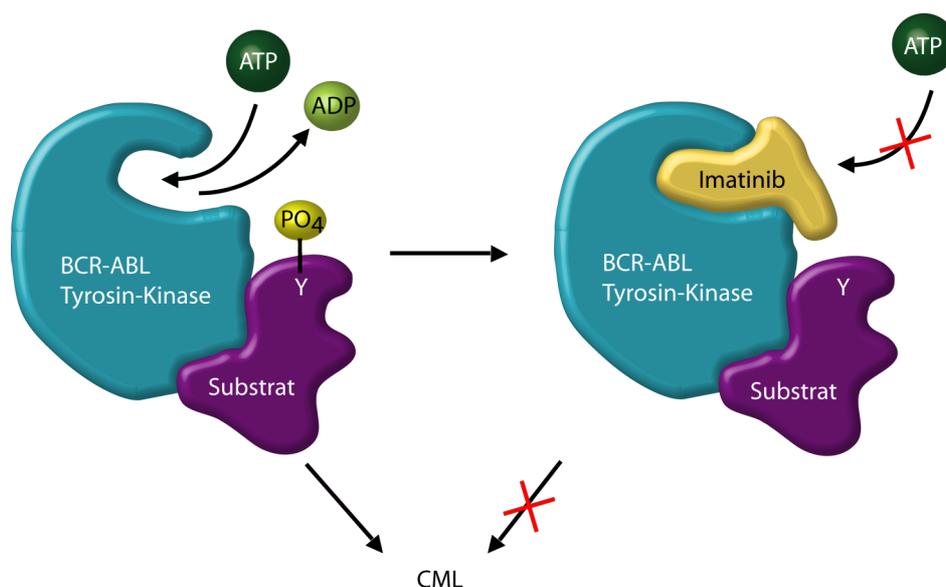


Abb. 2.9: Funktionsweise des BCR-ABL-Inhibitors Imatinib

Der BCR-ABL-Inhibitor Imatinib bindet in der Kinasedomäne von BCR-ABL und fungiert dort als ATP-Kompetitor. Die Kinase wird auf diese Weise in der inaktiven Konformation fixiert, Substrate von BCR-ABL werden nicht mehr phosphoryliert.

Inzwischen ist die therapeutische Anwendung von Imatinib der Gold-Standard für die CML-Therapie und hat mittlerweile auch beachtliche Erfolge bei Patienten mit Philadelphia-Chromosom positiver (Ph^+) ALL erzielt^{77,78}. Bei Patienten mit CML in der Blastenkrise oder Ph^+ -ALL ist die Imatinib-Wirkung jedoch in der Regel nur von kurzer Dauer. Häufig rezidivieren diese Patienten trotz fortgesetzter Einnahme^{77,79-82}. Das BCR-ABL-Transkript ist auch noch bei Patienten nachweisbar, die sich in einem Stadium „kompletter zytogenetischer Remission“ befinden. Eine so genannte molekulare Remission, also das Absinken der BCR-ABL-Transkriptmenge unter die molekulare Nachweisgrenze, ist insbesondere in den ersten Jahren der Erkrankung selten. Dies ist ein Hinweis darauf, dass frühe leukämische Zellen nicht eradiziert werden und die die Leukämie initiierenden Zellen (*leukemia initiating cells*, LIC) möglicherweise geschützt in der Knochenmarksnische überleben. Es besteht die Gefahr, dass sich in diesen verbleibenden leukämischen Zellen über die Zeit Resistenzen gegenüber der Imatinib-Therapie entwickeln. Bei der Imatinib-Therapie handelt es sich somit möglicherweise um eine nicht kurative Behandlung, die Medikation muss daher lebenslang erfolgen. Einer neuen Studie zufolge beträgt die Rate des weitgehend molekularen Ansprechens bei Langzeitpatienten jedoch 86 %⁸³. Dies gibt Anlass zur Annahme, dass die LIC bei einer langfristigen Therapie doch weitestgehend eradiziert werden können.

2.2 RNA-Interferenz

RNA-Interferenz (RNAi) beschreibt einen durch doppelsträngige RNA (dsRNA) ausgelösten, hoch konservierten Mechanismus zur sequenzspezifischen Stilllegung von Genen. Man geht davon aus, dass die RNAi einen Prozess darstellt zum Schutz des Genoms vor invasiven Nukleinsäuren wie Transposons oder Nukleinsäuren, die Erbinformationen von Viren oder anderen Pathogenen kodieren⁸⁴⁻⁸⁸.

Erstmalig konnte die Gruppe um Craig Mello im *C. elegans*-Modell zeigen, dass synthetische, doppelsträngige RNA, die komplementär zu einer mRNA ist, injiziert in die Tiere sequenzspezifisch den Abbau eben dieser mRNA einleiten kann⁸⁹. Mit dieser Entdeckung wurde das Feld der Genomik revolutioniert. Mittlerweile konnte das Phänomen der RNAi bei zahlreichen weiteren Organismen bis hin zur Maus beobachtet werden.

2.2.1 Mechanismus der RNAi

Endogen vorkommende microRNAs (miRNAs) werden von RNA-Polymerase II zu einer langen primären miRNA (pri-miRNA) transkribiert. Die Länge dieser pri-miRNAs kann zwischen 200 Nukleotide bis zu mehreren Tausend Nukleotiden betragen^{90,91}. Anschließend werden die transkribierten pri-miRNAs durch einen Drosha-Mikroprozessor-Komplex prozessiert. Hierbei wird die pri-miRNA in 3 Teile geschnitten, in die 3'- und die 5'-flankierende Sequenz und die eigentliche Stammschleife mit Haarnadelstruktur, die pre-miRNA^{90,92}. Im nächsten Schritt wird diese pre-miRNA mittels des Heterodimers aus Exportin 5 (Exp5) und Ran-GTP aus dem Nukleus ins Zytoplasma transloziert⁹³⁻⁹⁵. Die pre-miRNA wird im Zytoplasma schließlich durch das Protein Dicer enzymatisch gespalten und hierdurch in *short interfering RNAs* (siRNAs) von 21-23 Nukleotiden Länge prozessiert⁹⁶. Das hochkonservierte Enzym Dicer gehört zur RNase III-Familie. Einmal durch Dicer prozessiert, wird einer der beiden Stränge des RNA-Duplex in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) inkorporiert und bindet durch komplementäre Basenpaarung die korrespondierende Target-mRNA⁹⁷. Hierdurch wird die Expression des Target-Gens (*target of interest*, TOI) spezifisch supprimiert, entweder durch Spaltung und Abbau der mRNA oder durch Inhibition der Translation⁹⁸⁻¹⁰⁰ (Abb. 2.10).

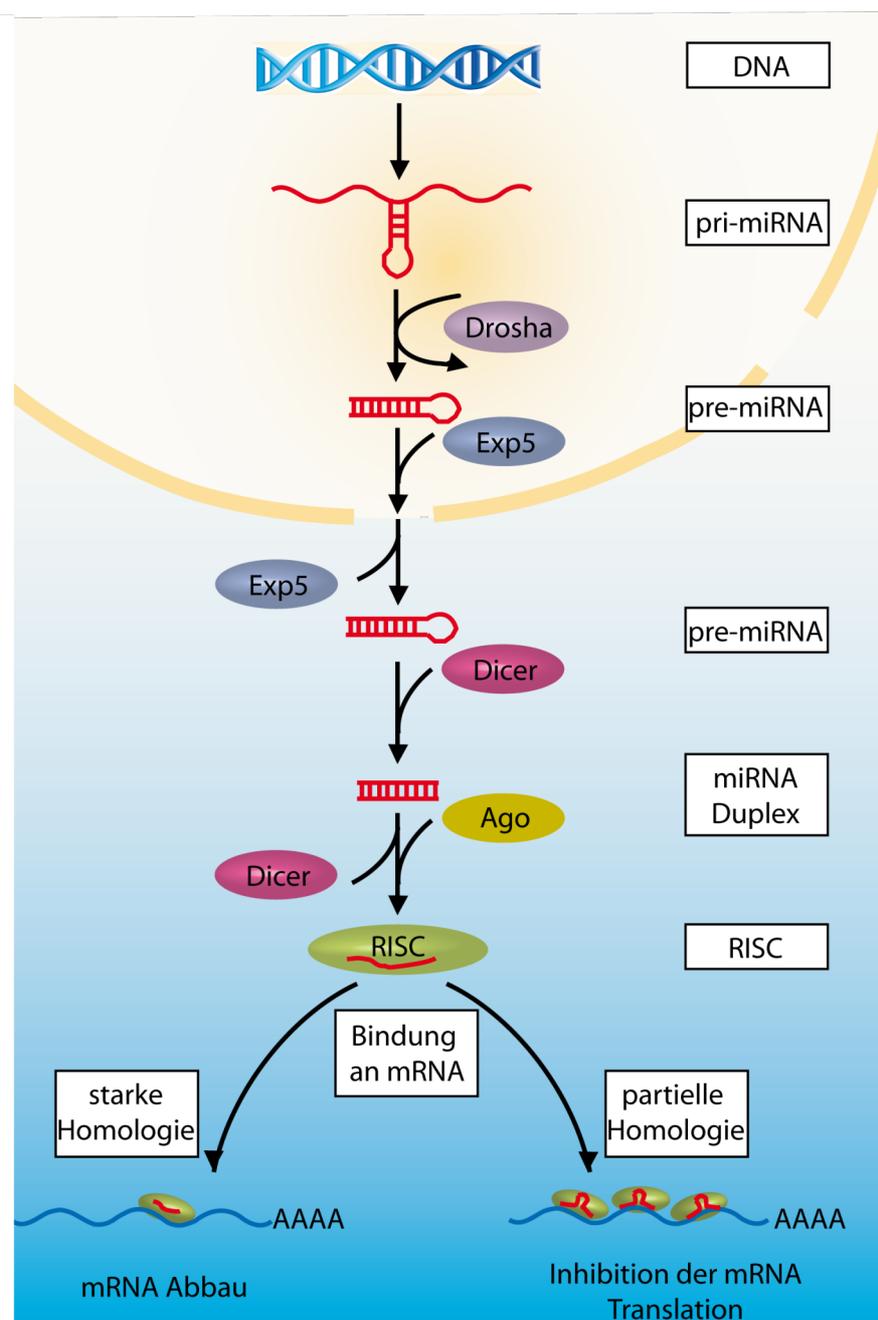


Abb. 2.10: Prozessierung von microRNAs innerhalb der Zelle.

RISC: *RNA-induced Silencing Complex*; Exp5: Exportin 5; Ago: Argonaut (adaptiert nach Cullen *et al.*¹⁰¹).

2.2.2 Anwendung der RNAi

Der ursprünglich zur Abwehr zellfremder, genetischer Informationen entwickelter Mechanismus der RNAi wird bereits seit vielen Jahren in abgewandelten Formen verwendet, um künstlich und gezielt die Expression von Target-Genen zu inhibieren. Um funktionelle siRNAs in der Zielzelle zu generieren, wurden verschiedenste Ansätze entwickelt.

Zum einen kann so genannte nackte siRNA in Zellen eingeschleust werden. Hierbei wird siRNA, shRNA oder dsRNA mittels normaler Transfektionsmethoden wie Lipofektion oder Elektroporation direkt in die Zielzelle eingebracht. Da die siRNA in diesem Fall jedoch nicht genetisch kodiert ist, kann das Zielgen nur kurzfristig bis zu 3 Tage stillgelegt werden¹⁰². Mit der Entwicklung vektorbasierter shRNAs wurde hingegen eine einfache und vielfach anwendbare Methodik zugänglich, siRNA stabil in Zellen zu exprimieren¹⁰³. Für *in vivo* Applikationen wurden schließlich spezielle retrovirale Vektoren für die shRNA-Expression konzipiert^{104,105}. Die durch retroviral kodierte shRNAs vermittelte Geninaktivierung repräsentiert einen schnellen, vielfach anwendbaren und vor allem effizienten Ansatz zur Untersuchung der Funktionen des entsprechenden Gens¹⁰⁶⁻¹⁰⁹.

2.3 Aufgabenstellung

Obwohl CML-Patienten erfolgreich mit dem sehr potenten BCR-ABL-Inhibitor Imatinib behandelt werden können, stellt die Imatinib-Applikation eine nicht kurative und somit lebenslang erforderliche Therapie dar. Eine Erklärung für dieses Phänomen ist, dass einige wenige Zellen, die so genannten leukämischen Stammzellen, durch diese Therapieform nicht eradiziert werden können und ein Absetzen des Medikamentes somit ein Rezidiv zur Folge hätte. Die übergeordnete Fragestellung sollte daher sein, kritische, signalvermittelnde Zielproteine (Targets) zu identifizieren, die für die BCR-ABL-abhängige, onkogene Transformation essentiell sind und somit interessante Zielstrukturen für die Weiterentwicklung der bestehenden Therapieformen darstellen.

In der Vergangenheit wurde hierzu häufig das zu untersuchende Onkogen in *knockout*-Knochenmarkszellen eingebracht, Zellen die für das zu untersuchende Target defizient sind. Die Auswirkung der Target-Depletion für die onkogenvermittelte Transformation lässt sich dann in einem Knochenmarkstransduktion/-transplantations-Modell untersuchen. Jedoch ist

die Verwendbarkeit von *Knockout*-Mäusen beschränkt. Dies liegt zum einen daran, dass viele *Knockout*-Mäuse per se einen Phänotyp embryonaler Letalität aufweisen oder schlichtweg nicht erhaltlich sind, und somit kein Knochenmark aus diesen Tieren gewonnen werden kann. Zum anderen müssen für Transplantationsexperimente die *knockout*-tiere auf den gleichen genetischen Hintergrund wie die Empfängermause zurückgekreuzt werden, um Abstoßungs- und Immunreaktionen zu vermeiden. Die siRNA-vermittelte Suppression des zu untersuchenden Targets stellt eine interessante Alternative zur Verwendung von *Knockout*-Knochenmark dar. Um die Transduktion der Knochenmarkzellen zu erleichtern und eine Target-Suppression in jeder onkogenexprimierenden Zelle gewährleisten zu können, sollte ein shRNA-basiertes Vektorsystem entwickelt werden.

Die Kombination des Onkogens mit der TOI-shRNA (shRNA^{TOI}) auf nur einem einzelnen Plasmid stellte hierbei den entscheidenden Schritt dar, da somit die BCR-ABL-Expression direkt an die der shRNA^{TOI} gekoppelt wäre. Auf diese Weise könnten aufwändige Selektionen oder durchflusszytometrische Zellsortierung für doppelinfizierte Zellen umgangen werden. Die Etablierung des Vektorsystems sollte an den Targets p53, Raf-1 und Grb10 erfolgen. P53 in seiner Funktion als Tumorsuppressor sollte die Transformationsfähigkeit BCR-ABL-exprimierender Zellen hierbei negativ, die Proteine Raf-1 und Grb10 als Bestandteile der wichtigsten BCR-ABL-abhängigen Signalkaskaden positiv beeinflussen.

Zunächst sollten die Sequenzen der shRNA^{TOI} optimiert werden, um möglichst hohe Suppressionseffizienz zu erreichen. Im nächsten Schritt sollte ein Vektorsystem kloniert werden, das für das Onkogen und gleichzeitig für die targetspezifische shRNA kodiert. Das System sollte hinsichtlich seiner Funktionalität überprüft und gegebenenfalls in seinem Aufbau verändert werden, um sowohl die Target-Suppression als auch die Onkogen-Expression zu gewährleisten. Nach erfolgreicher Etablierung des Vektorsystems sollte der Einfluss der Target-Depletion auf die Signaltransduktion und Transformation des BCR-ABL-Onkogens untersucht werden. Sowohl klassische molekularbiologische Methoden als auch das murine Knochenmarktransplantationsmodell der chronisch myeloischen Leukämie sollte hierbei Anwendung finden.

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung eines dualen retroviralen Vektorsystems

Um in einer Zelle gleichzeitig die Überexpression eines Onkogens und die Abreicherung eines potentiellen Targetproteins zu erreichen, kann die Zelle mit zwei verschiedenen Plasmiden doppelt transfiziert werden – eines kodierend für das Onkogen, das andere für eine shRNA^{TOI}. Wird eine reine Population angestrebt, bestehend aus Zellen, die sowohl Onkogen als auch shRNA exprimieren, müssen die Zellen entweder durchflusszytometrisch sortiert werden, wenn sie für ein Fluoreszenzprotein kodieren, oder mittels Antibiotika selektioniert werden, im Falle einer kodierten Antibiotikaresistenz. Die Verwendung von retroviralen Plasmiden ist hierbei von Vorteil, da durch retrovirale Infektion in die Zelle eingebrachte Erbinformation stabil in das Wirtsgenom integriert wird. Da die Expressionstärke der viralen Erbinformation jedoch von der Integrationsstelle im Wirtsgenom abhängt, kann bei Infektion mit zwei unterschiedlichen Plasmiden keine proportionale und gleichmäßige Expression beider Gene gewährleistet werden. Kombiniert man jedoch beide Gene, kodiert auf einem gemeinsamen retroviralen Plasmid, wird die Suppression des Targetproteins direkt an die Überexpression des Onkogens gekoppelt. Ein derartiger kombinatorischer Vektor sollte entwickelt werden.

3.1.1 Raf-1-Suppression vermittelt durch eine konventionelle shRNAs

Das retrovirale Vektorsystem wurde unter der Verwendung von Raf-1 als zu supprimierendes Target etabliert. Es wurden zunächst mehrere Raf-1-spezifische shRNAs generiert und gemäß Herstellerangaben in den Vektor pSuper.retro.puro (im weiteren Verlauf pSuper

genannt) kloniert. Dieser Vektor verfügt über die charakteristischen Bestandteile eines retroviralen Vektors wie die LTR-Bereiche am 5'- und 3'-Ende und die retrovirale Verpackungssequenz Ψ^+ . Außerdem sind eine Puromycin-Resistenzkassette unter der Kontrolle des PGK-Promotors und eine shRNA-Kassette unter der Kontrolle des RNA-Polymerase III (RNA Pol III)-Promotors H1 kodiert. In diese shRNA-Kassette kann mittels *HindIII* und *BglIII* die 60 bp große, targetspezifische Sequenz kloniert werden (Abb. 3.1a).

Auf diese Weise wurden vier verschiedene Raf-1-spezifische shRNAs in den pSuper-Vektor kloniert und NIH/3T3-Zellen retroviral mit den resultierenden Konstrukten infiziert. Die Zellen wurden vor der Western Blot-Analyse einer Puromycinselektion unterzogen, um eine zu 100 % infizierte Population zu erhalten. Als Kontrolle dienten MOCK-infizierte NIH/3T3-Zellen. Wie in Abb. 3.1b dargestellt, zeigten die verschiedenen shRNA^{Raf-1}s sehr unterschiedliche Suppressions-Effizienzen von 0 % (shRNA^{Raf-1(2)}) bis hin zu über 80 % (shRNA^{Raf-1(4)}).

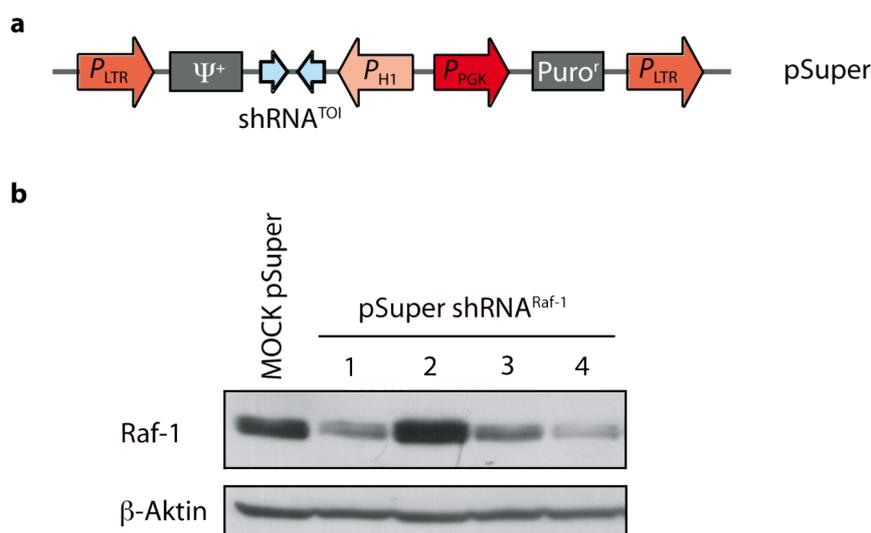


Abb. 3.1: Untersuchung verschiedener Raf-1-spezifischer shRNAs auf ihre Suppressionseffizienz.

a: Schematische Darstellung des pSuper-Vektors. P_{LTR} : LTR-Promotor; Ψ^+ : retrovirale Verpackungssequenz; P_{H1} : H1-Promotor; P_{PGK} : PGK-Promotor; $Puro^r$: Puromycin-Resistenzkassette. **b:** NIH/3T3-Zellen wurden retroviral mit pSuper bzw. pSuper shRNA^{Raf-1(1-4)} infiziert und im Western Blot auf Raf-1-Suppression untersucht. Lediglich eine der Raf-1-spezifischen shRNA-Sequenzen, Nr. 4, weist eine Effizienz von mehr als 80 % auf.

Um nun die Raf-1-Depletion mit der Expression des BCR-ABL-Onkogens zu kombinieren, wurde ein retroviraler Vektor erzeugt, der sowohl die targetspezifische shRNA für Raf-1(4) als auch das Onkogen BCR-ABL kodiert (pM-BCR-ABL-shRNA^{Raf-1}, Abb. 3.2a). Die Funktionalität dieses Vektors wurde im gleichen Zellsystem untersucht. Da pM-BCR-ABL-shRNA^{Raf-1} keine Antibiotikaresistenz-Kassette kodiert, wurden die Zellen nicht selektioniert. Die Infektionseffizienz lag jedoch nach viermaliger Infektion mit retroviralem Überstand bei über 95 %. pM-BCR-ABL-shRNA^{Raf-1} ermöglichte eine BCR-ABL-Expression mit einer gleichzeitigen Suppression von Raf-1 (Abb. 3.2d).

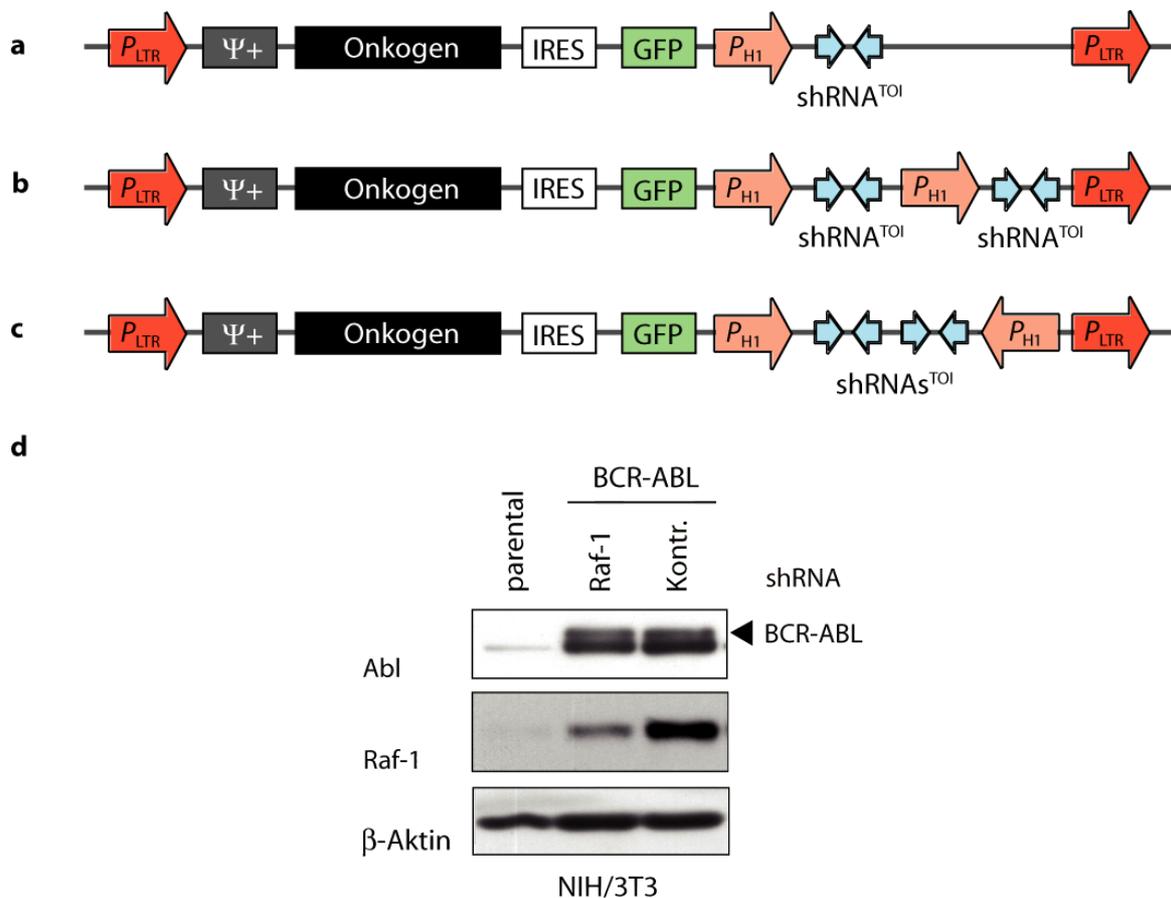


Abb. 3.2: Retrovirale Vektoren zur dualen Expression einer targetspezifischen shRNA und eines Onkogens.

Schematische Darstellung der retroviralen Vektoren, die eine kombinatorische Expression der targetspezifischer shRNA unter H1-Promotor-Kontrolle und des Onkogens unter LTR-Promotor-Kontrolle ermöglichen. P_{LTR} : LTR-Promotor; Ψ^+ : retrovirales Verpackungssignal; IRES: Interne ribosomale Eintrittsstelle; GFP: grün fluoreszierendes Protein; P_{H1} : H1-Promotor. **a:** pM-BCR-ABL-shRNA^{TOI} kodiert für eine shRNA unter H1-Promotor-Kontrolle. **b:** pM-BCR-ABL-shRNA^{TOI}-shRNA^{TOI} kodiert für zwei shRNA Kassetten jeweils mit eigenem H1-Promotor in 5'-3'-Orientierung und **c:** in verschiedenen Orientierungen. **d:** pM-BCR-ABL-shRNA^{Raf-1} ist funktionell und induziert eine BCR-ABL-Expression mit gleichzeitiger Raf-1-Suppression in NIH/3T3-Zellen. Die Suppressionseffizienz liegt jedoch bei unter 90 %.

Raf-1 ist ein Bestandteil des MAPK/ERK-Signalweges. Diese Signalkaskade aktiviert über mehrerer Zwischenstufen Signale für Proliferation, Transformation und Antiapoptose. Bei jedem Schritt dieser Signalweiterleitung wird das Signal verstärkt, weshalb dieser Mechanismus als kanonische Aktivierung bezeichnet wird. Da Raf-1 sehr weit oben in dieser Kaskade einzuordnen ist, können selbst geringe verbleibende Mengen Raf-1-Protein zu einer Aktivierung der Überlebenssignale führen. Aus diesem Grund war es wichtig, die Raf-1-Niveaus so gering wie möglich zu halten. Um die Suppressionseffizienz weiter zu verbessern, wurde in pM-BCR-ABL-shRNA^{Raf-1} eine weitere shRNA^{Raf-1}-Kassette einschließlich ihres H1-Promotors in verschiedenen Orientierungen kloniert (Abb. 3.2b und c). Die Effektivität konnte hierdurch jedoch nicht verbessert werden (nicht dargestellt). Möglicherweise sind die unzureichenden Suppressionseffizienzen auf den schwachen H1-Promotor zurückzuführen, über den die shRNA-Expression gesteuert wird.

3.1.2 Raf-1-Suppression vermittelt durch eine miR30-basierte shRNA

2002 wurde eine neue Generation von shRNAs, die miR30-basierten shRNAs, entwickelt. Zur Herstellung miR30-basierter shRNAs wird die Stammschleife der endogen vorkommenden microRNA30 (miR30) durch eine targetspezifische Stammschleife ersetzt^{108,110}. Diese neu generierte targetspezifische miR (miR^{TOI}) supprimiert nicht mehr die ursprünglichen miR30-Zielgene sondern ausschließlich das gewünschte Target (Abb. 3.3).

Strukturell weist die miR^{TOI} eine zentrale Gemeinsamkeit mit der konventionellen shRNA^{TOI} auf. Beide beinhalten eine targetspezifische Haarnadelstruktur, bestehend aus einem *sense*- und einem *antisense*-Strang, verbunden durch eine Schleife, den so genannten *loop*. Bei der miR^{TOI} wird diese Stammschleife im Gegensatz zur shRNA^{TOI} am 5'- und 3'-Ende durch lange, sekundärstrukturbildende Sequenzen flankiert (Abb. 3.4). Diese Bereiche erhöhen vor allem die Stabilität der miR^{TOI}. Außerdem kann miR^{TOI} die Expression des Targetproteins nicht nur durch mRNA-Abbau, sondern zusätzlich durch eine Inhibition der Translation unterbinden.

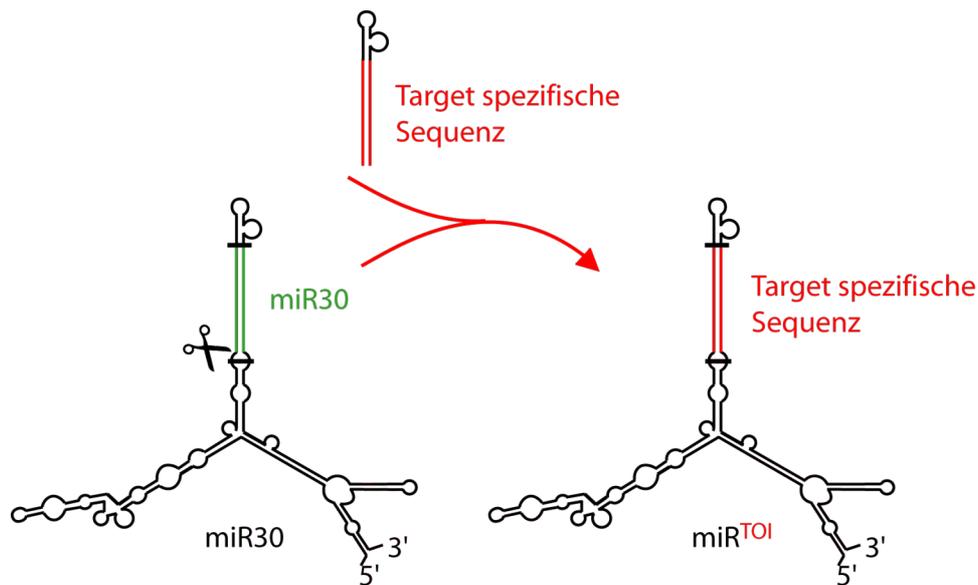


Abb. 3.3: Die Stammeschleife der endogenen miR30 kann durch eine targetspezifische Sequenz ersetzt werden, um eine miR30-basierte shRNA zu generieren.

Im Gegensatz zu konventionellen shRNA^{TOI}s, deren Transkription von den relativ schwachen RNA Pol III-Promotoren wie H1 oder U6 abhängig ist, kann die miR^{TOI} auch von RNA Pol II-Promotoren reguliert werden. Die Suppressioneffizienz der miR^{TOI} ist sogar stärker unter RNA Pol II- als unter RNA Pol III-Kontrolle, wie es anschaulich am Beispiel des Targets p53 gezeigt werden konnte¹⁰⁸. Dies ist ein gravierender Vorteil, da somit auch

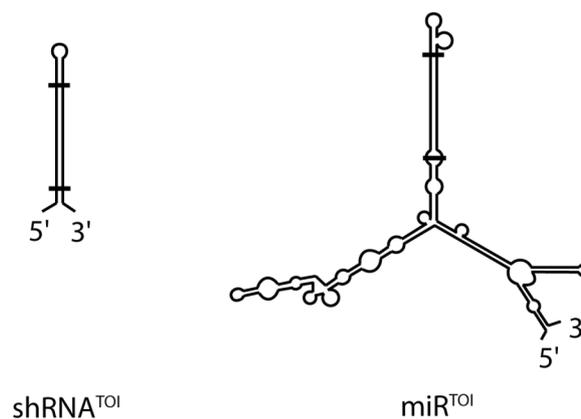


Abb. 3.4: Strukturvergleich zwischen konventioneller shRNA^{TOI} und miR^{TOI}.

shRNAs bestehen aus einer *sense*- und einer *antisense*-Sequenz die komplementär zu der zu supprimierenden mRNA ist. Verbunden werden diese Stränge durch eine Schleife. Die miR^{TOI} hingegen besteht aus einer ähnlichen Haarnadestruktur, jedoch wird diese am 3'- und 5'-Ende durch Sequenzen flankiert, die sowohl die Stabilität als auch die Effizienz positiv beeinflussen.

die sehr starken RNA Pol II-Promotoren wie der LTR für die miR^{TOI}-Transkription verwendet werden können. Bei einem Großteil der verfügbaren retroviralen Vektoren wird die Expression des Zielgens durch diesen LTR-Promotor angesteuert, so auch beim MIG-R1. Für die Verwendung von miR^{TOI} unter der Kontrolle des LTR-Promotors entwickelte die Gruppe um Dickins den retroviralen Vektor pLMP. Dieser Vektor kodiert für GFP und eine Puromycin-Resistenz über einen PGK-Promotor und beinhaltet bereits die flankierenden Sequenzen der miR30. In die *multiple cloning site* (MCS) dieses Vektors kann über *EcoRI* und *XhoI* eine PCR-generierte, targetspezifische Haarnadelschleife integriert werden¹⁰⁸.

Die positiven Eigenschaften der miR^{TOI} sollten helfen, die Effizienz des retroviralen Vektors zur dualen Expression von BCR-ABL und Raf-1-Suppression zu optimieren.

3.1.3 Optimierung der Raf-1-spezifischen miR-Sequenz

Suppressionseffizienzen von siRNAs und shRNAs sind sehr stark von der Zusammensetzung der Sequenz abhängig. Für die Berechnung optimaler Sequenzen für miR30-basierte shRNAs mit möglichst hoher Effektivität und gleichzeitig möglichst geringen unspezifischen Nebenerscheinungen standen zwei verschiedene computerbasierte Algorithmen zur Verfügung: Der vom Hannon Labor als „RNAi Central“ und der von Novartis Institutes of BioMedical Research als „BIOPREDSi“ etablierte Algorithmus.

Von jedem Algorithmus wurden die besten 3 Ergebnisse für Raf-1 gewählt und diese Raf-1-spezifischen Sequenzen mittels einer PCR-basierten Methode in den pLMP-Vektor kloniert. Die Effizienzen wurden in NIH/3T3-Zellen getestet. Hierzu wurden die Zellen retroviral mit den entsprechenden pLMP-Konstrukten infiziert, anschließend einer Puromycinselektion unterzogen und die Raf-1-Expression im Western Blot überprüft. Der „RNAi Central“-Algorithmus wies hierbei nur eine befriedigende Effizienz auf (Raf-1(1-3)) Lediglich eine Sequenz konnte Raf-1 um mehr als 90 % herunterregulieren. Im Gegensatz dazu erzielten alle nach dem „BIOPREDSi“-Algorithmus generierten Sequenzen (Raf-1(4-6)) in diesem Zellsystem Suppressionseffizienzen von mehr als 95 % (Abb. 3.5). Im direkten Vergleich mit konventionellen shRNAs wiesen diese miR30-basierte shRNAs zudem eine bessere Suppressionseffizienz auf und sind somit diesen vorzuziehen (Abb. 3.5).

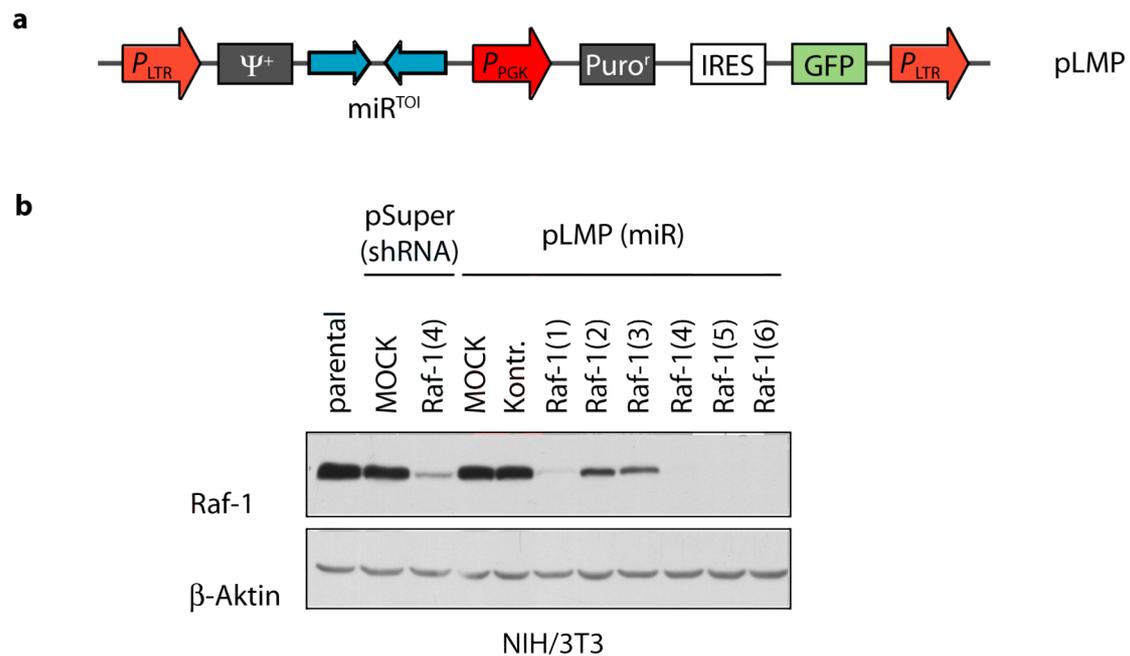


Abb. 3.5: miR30-basierte weisen eine sehr starke und verlässliche Suppressionseffizienz auf und sind effektiver als konventionelle shRNAs.

a: Schematische Darstellung des pLMP-Vektors. P_{LTR} : LTR-Promotor; Ψ^+ : retrovirale Verpackungssequenz; miR^{TOI} : targetspezifische miR30-basierte shRNA; P_{PGK} : PGK-Promotor; $Puro^r$: Puromycin-Resistenzkassette; IRES: Interne ribosomale Eintrittsstelle; GFP: grün fluoreszierendes Protein; **b:** NIH/3T3-Zellen wurden mit angegebenen pSuper- oder pLMP-Konstrukten retroviral infiziert, mit Puromycin selektiert und für einen Western Blot aufgearbeitet.

Zusätzlich wurde das Tumorsuppressorprotein p53 als Positivkontrolle mitgeführt. Es wurde bereits gezeigt, dass in BCR-ABL-positiven hämatopoetischen Zellen ein *knockout* von p53 zu einer erhöhten Insensitivität gegenüber Imatinib führt. Die miR^{p53} wurde freundlicherweise von S.W. Lowe zur Verfügung gestellt¹¹¹. In NIH/3T3-Zellen ist p53 normalerweise destabilisiert und im Western Blot nicht nachweisbar. Um in diesem Zellsystem die Suppressionseffizienz von $pLMPmiR^{p53}$ testen zu können, musste die p53 Stabilisierung durch UV-Bestrahlung induziert werden. Abb. 3.6 zeigt eine Reduktion der p53 Proteinmenge in $pLMPmiR^{p53}$ -transduzierten Zellen von mehr als 95 % im Vergleich zu Kontrollzellen nach UV-Bestrahlung.

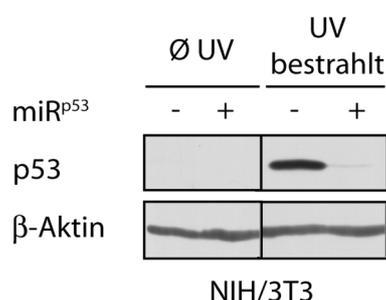


Abb. 3.6: UV-induzierte Stabilisierung von p53 kann durch eine miR^{p53} gehemmt werden.

NIH/3T3-Zellen wurden mit angegebenen pLMP-Konstrukten retroviral infiziert, mit Puromycin selektioniert und für einen Western Blot aufgearbeitet. Da p53 in NIH/3T3 nur schwach exprimiert wird, wurden die Zellen mit UV-Bestrahlung zur p53-Stabilisierung angeregt.

Um die Bedeutung von Raf-1 für die BCR-ABL-abhängige Transformation primärer muriner Knochenmarkzellen zu untersuchen, wurden Knochenmarkzellen von 5-FU-vorbehandelten Balb/C-Mäusen retroviral mit MIY bzw. MIY BCR-ABL und pLMPmiR^{Raf-1} bzw. pLMPmiR^{Kontr.} infiziert und für einen Methylzellulose-Assay verwendet. MIY ist ein MSCV-basierter Vektor, der ähnlich aufgebaut ist wie MIG-RI, jedoch kodiert MIY anstatt für *green fluorescent protein* (GFP) für *yellow fluorescent protein* (YFP). In zytokinfreier Methylzellulose sterben normale Knochenmarkzellen ab, durch ein Onkogen transformierte Zellen bilden jedoch Kolonien aus. Um zu gewährleisten, dass jede BCR-ABL-exprimierende Zelle gleichzeitig die miR^{Raf-1} exprimiert, wurden die Zellen durchflusszytometrisch sortiert (Abb. 3.7) und nur GFP⁺/YFP⁺- Zellen für den Assay verwendet.

Erwartungsgemäß bildeten die mit MIY-Leervektor transduzierten Zellen keine Kolonien aus (nicht dargestellt). Bei BCR-ABL-transduzierten Zellen war eine deutliche Reduktion der Transformationsfähigkeit der pLMPmiR^{Raf-1}-infizierten Zellen gegenüber den pLMPmiR^{Kontr.}-infizierten Zellen zu beobachten. Demnach scheint Raf-1 für die Transformationsfähigkeit BCR-ABL-positiver Knochenmarkzellen von Bedeutung zu sein. Um zu prüfen, ob eine Kombination der Raf-1-Depletion mit einer BCR-ABL-Inhibition die Anzahl der Kolonien weiter verringern kann, wurde dem Medium der BCR-ABL-Inhibitor Imatinib zugesetzt. Imatinib alleine reduzierte bereits die Kolonienzahl, in Kombination mit einer zusätzlichen Raf-1-Suppression durch die targetspezifische miR wurde dieser Effekt sogar potenziert (Abb. 3.8).

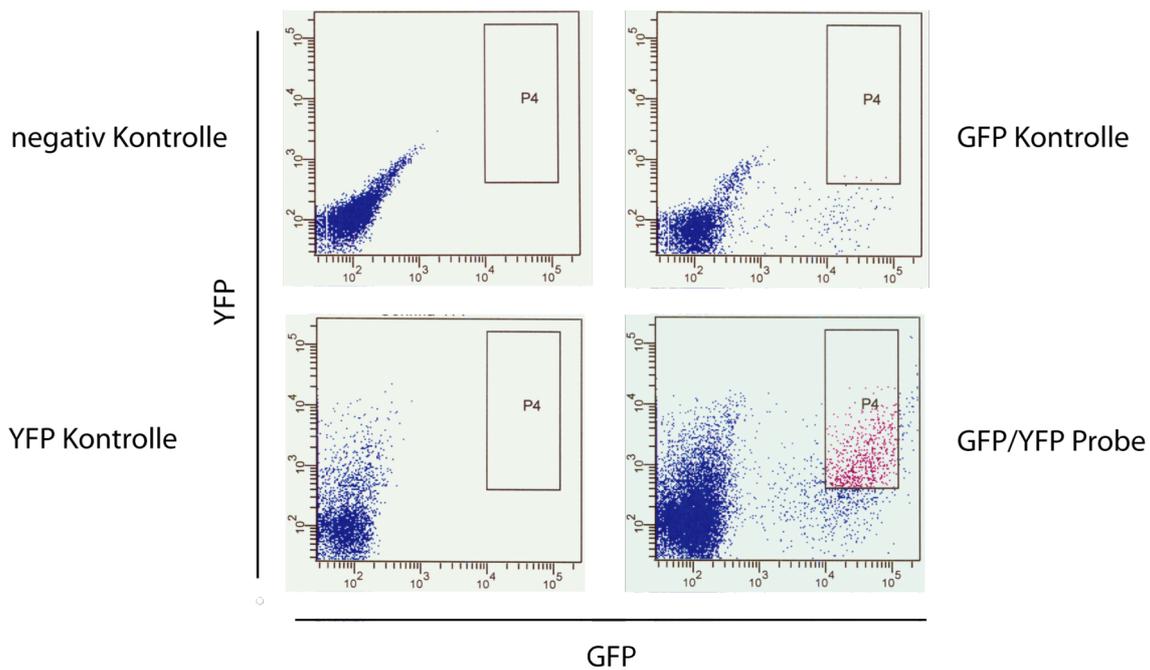


Abb. 3.7: Durchflusszytometrische Sortierung von doppelinfizierten Knochenmarkzellen.

Primäres Knochenmark von 5-FU-vorbehandelten Mäusen wurde retroviral mit MIY oder MIY BCR-ABL und/oder pLMPmiR^{Kontr.} oder pLMPmiR^{Raf-1(1)} infiziert. Die Zellen wurden durchflusszytometrisch sortiert um eine reine Population doppelt positiver Zellen zu gewinnen (Feld P4).

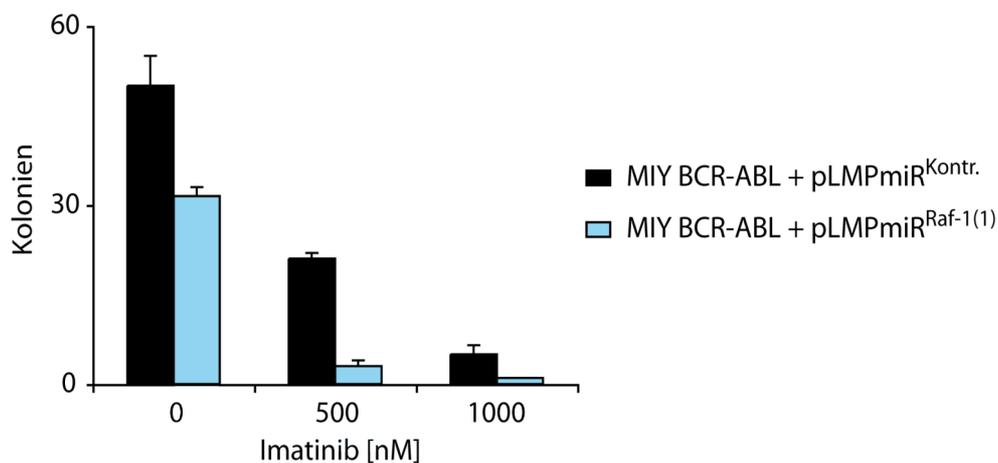


Abb. 3.8: Raf-1 ist erforderlich für die Bildung transformierter Kolonien im Knochenmark-Methylzellulose-Assay.

Knochenmark von 5-FU-vorbehandelten Mäusen wurde retroviral mit MIY oder MIY BCR-ABL und pLMPmiR^{Kontr.} oder pLMPmiR^{Raf-1} infiziert, durchflusszytometrisch auf doppelt infizierte Zellen sortiert und in zytokinfreies Methylzellulose-Medium ausplattiert. Nach 10 Tagen wurden die Kolonien am Binokular ausgezählt und dokumentiert.

Doppelinfectionen mit zwei verschiedenen Vektoren sind zeit- und kostenintensiv. Die infizierten Zellen müssen, falls der Vektor für eine Antibiotikaresistenz kodiert, einer Selektion mit dem entsprechenden Antibiotikum unterzogen oder, falls der Vektor für einen Fluoreszenzfarbstoff kodiert, durchflusszytometrisch sortiert werden. Eine langwierige Selektion ist insbesondere bei primären Zellen nicht möglich, da diese nur begrenzt *in vitro* kultivierbar sind. Bei der Zellsortierung mittels FACS kann der Verlust an Zellen sehr hoch sein und der Prozess des Sortierens stresst die Zellen zusätzlich. Für die Untersuchung onkogener Signalkaskaden ist es jedoch unabdingbar, dass jede einzelne, das Onkogen exprimierende Zelle gleichzeitig das Target-Gen stabil und dauerhaft herunterreguliert. Optimalerweise sollten sowohl das Onkogen als auch die targetspezifische shRNA zusammen auf einem einzigen Plasmid kodiert sein. Die miR30-basierten shRNAs können von RNA Pol II-Promotoren angesteuert werden. Dies ermöglichte die Klonierung eines Vektors, der sowohl für die targetspezifische miR als auch für das Onkogen kodiert (Abb. 3.9, oben). Die miR-Kassette wurde direkt hinter den starken LTR-Promotor kloniert. Es folgt das Onkogen BCR-ABL. Direkt hinter BCR-ABL schließt sich eine *internal ribosomal entry site* (IRES) an. Über diese IRES wird die Expression des Fluoreszenzmarkers GFP gewährleistet. Alle Bestandteile werden von einem gemeinsamen Promotor angesteuert. In der transduzierten Zelle wird das Provirus ins Wirtsgenom integriert und alle Bestandteile in ein einziges RNA-Transkript umgeschrieben. Es erfolgt entweder die Prozessierung der miR aus dem Transkript im Zellkern, oder das gesamte Transkript wird ins Zytoplasma transloziert. Dort erfolgt die Bindung der Ribosome an das Startkodon von BCR-ABL und an die IRES und die Translation von BCR-ABL und GFP wird eingeleitet (Abb. 3.9). Die Menge der miR30-kodierenden RNA ist auf diese Weise direkt an die Onkogen-Expression gekoppelt.

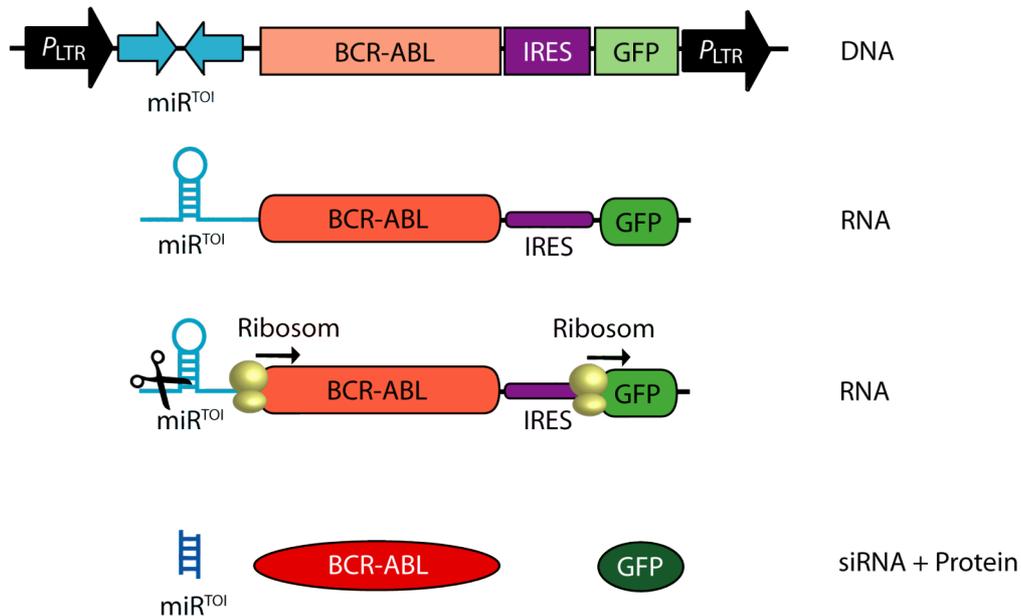


Abb. 3.9: Prozessierung des Provirus zu miR^{TOI}, BCR-ABL-Protein und GFP.

Provirus, hier als DNA dargestellt, wird in der Zielzelle zu einem einzigen mRNA-Transkript umgeschrieben und im Folgenden die miR^{TOI} durch Drosha und Dicer zur reifen siRNA prozessiert oder die Abschnitte, die für BCR-ABL und GFP kodieren nach Bindung der Ribosome im Zytoplasma translatiert.

3.1.4 *In vitro* Untersuchungen zur Rolle von Raf-1 in der BCR-ABL-abhängigen Tumorigenität

Zunächst wurde in einem hämatologischen Zellsystem die Funktionalität des retroviralen Vektors pMmiR^{TOI}-BCR-ABL untersucht. Hierfür wurden Ba/F3-Zellen retroviral mit pMmiR^{Kontr.}-BCR-ABL oder pMmiR^{Raf-1}-BCR-ABL infiziert und die GFP-positive Fraktion durchflusszytometrisch aufgereinigt. In diesen Zellen zeigte sich eine starke und effiziente Unterdrückung der Raf-1-Expression sowohl auf Proteinebene (Abb. 3.10a) als auch auf mRNA-Ebene (Abb. 3.10b). Gleichzeitig konnte in den Zellen auch das BCR-ABL-Onkogen nachgewiesen werden. Es ist hervorzuheben, das BCR-ABL in der Raf-1-Suppressions- und in der Kontrollzelllinie im gleichen Maße exprimiert wurde (Abb. 3.10).

Um die molekularbiologischen Eigenschaften des Vektorsystems in einem relevanten Zellsystem zu untersuchen, wurde die Prä-B-Zelllinie Ba/F3 und die myeloide Zelllinie 32D gewählt. Diese hämatologischen Zelllinien gelten als Modellzelllinien für den Nachweis transformierender Eigenschaften von Onkogenen. Proliferation und Überleben dieser muri-

nen Zelllinien sind abhängig von IL-3. Wird den Zellen das Zytokin entzogen, wird die Apoptose eingeleitet¹¹². Onkogene sind in der Lage, diese Zelllinien zur Faktorunabhängigkeit zu transformieren. Diese Transformation kann durch verschiedene Signaltransduktionsvorgänge bedingt sein, deren Aktivierung promotogene und/oder antiapoptotische Effekte zur Folge hat. BCR-ABL aktiviert bekanntermaßen eine Vielzahl von Signalkaskaden in der leukämischen Zelle und führt somit zur Vermittlung von Signalen für die Transformation, Proliferation und Antiapoptose.

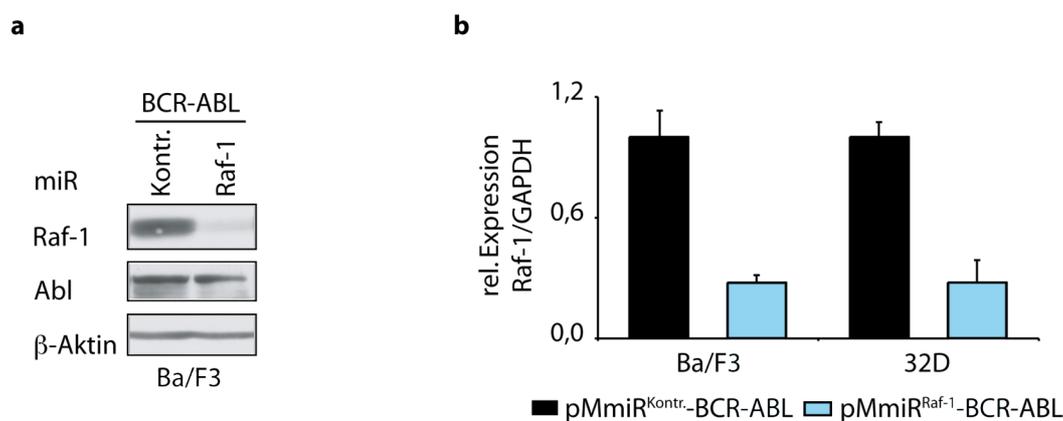


Abb. 3.10: Das retrovirale Konstrukt ermöglicht gleichzeitige Depletion des Targets und Überexpression des BCR-ABL-Onkogens.

Ba/F3- bzw. 32D-Zellen wurden retroviral mit entsprechenden Konstrukten infiziert, durchflusszytometrisch sortiert und **a**: für einen Western Blot und **b**: für eine qRT-PCR aufgearbeitet.

Die am besten charakterisierten Signalwege hierbei sind die PI3-K/AKT-, die STAT5- und die MAPK/ERK-Kaskade. In parentalen Zellen ist Raf-1 hierbei oberhalb von MEK einzuordnen. Um zu überprüfen, ob die Raf-1-Suppression in BCR-ABL-positiven Zellen die BCR-ABL-abhängige Aktivierung der MEK/ERK-Signalkaskade beeinflusst, wurden retroviral mit pMmiR^{Kontr.}-BCR-ABL oder pMmiR^{Raf-1}-BCR-ABL infizierten Ba/F3-Zellen vier Stunden IL-3 und Serum entzogen und der Phosphorylierungsstatus von ERK im Western Blot in 32D-Zellen (Abb. 3.11, links) und Ba/F3-Zellen (Abb. 3.11, rechts) untersucht. Wurden die Zellen in serum- und IL-3-haltigem Medium kultiviert, war ERK in gleichem Maße in parentalen, Raf-1-Suppressions- und Kontrollzellen phosphoryliert. Demnach ist Raf-1 verzichtbar für die IL-3- und serumabhängige ERK-Phosphorylierung. In gehungerten Zellen jedoch wurde ERK insgesamt schwächer phosphoryliert. Raf-1-Depletion führte in diesen gehungerten Zellen, deren Signalkaskaden ausschließlich durch das BCR-

ABL-Onkogen aktiviert wurden, zu einer deutlichen Verringerung der ERK-Phosphorylierung.

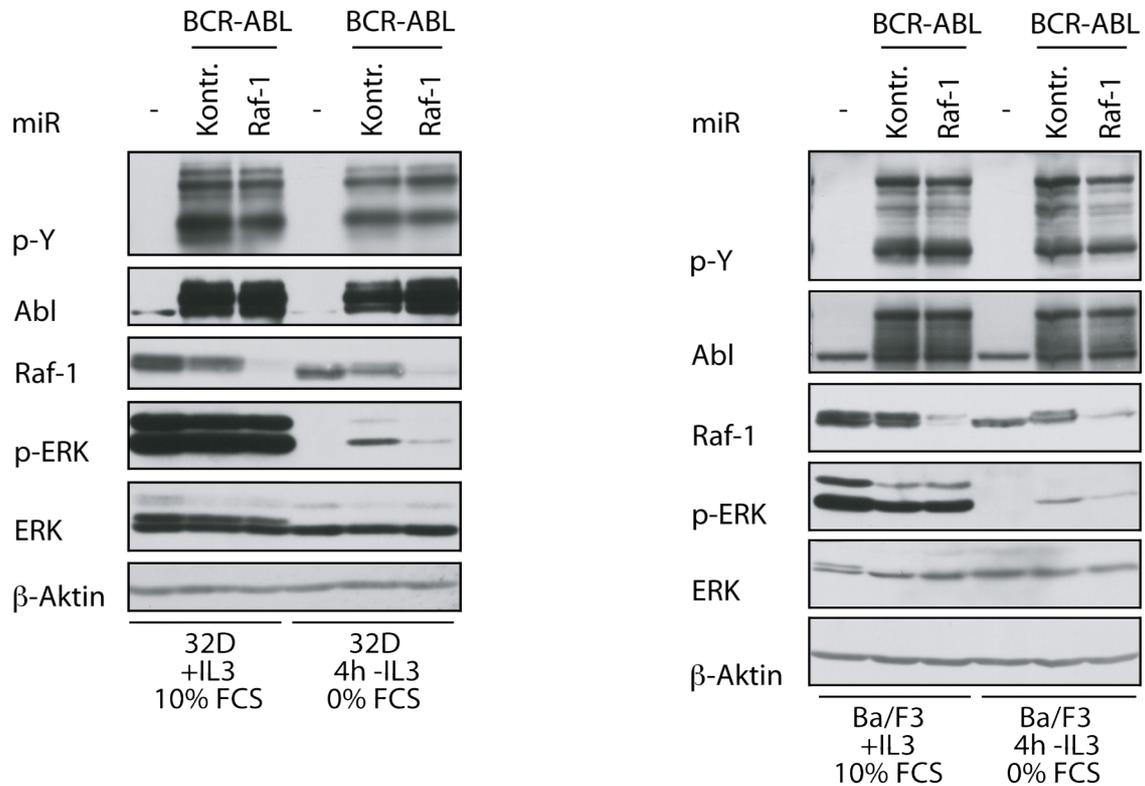


Abb. 3.11: Raf-1-Suppression unterbricht die BCR-ABL abhängige ERK Aktivierung in myeloiden und lymphoiden Zelllinien.

32D- (links) und Ba/F3-Zellen (rechts) wurden retroviral mit pMmiR^{Kontr.}-BCR-ABL- oder pMmiR^{Raf-1}-BCR-ABL-infiziert und entweder mit FCS und IL-3 kultiviert oder für 4 Stunden in serum- und IL-3-freiem Medium gehungert. Raf-1-Suppressionszellen weisen eine deutliche Verringerung der ERK-, insbesondere ERK2-Phosphorylierung auf.

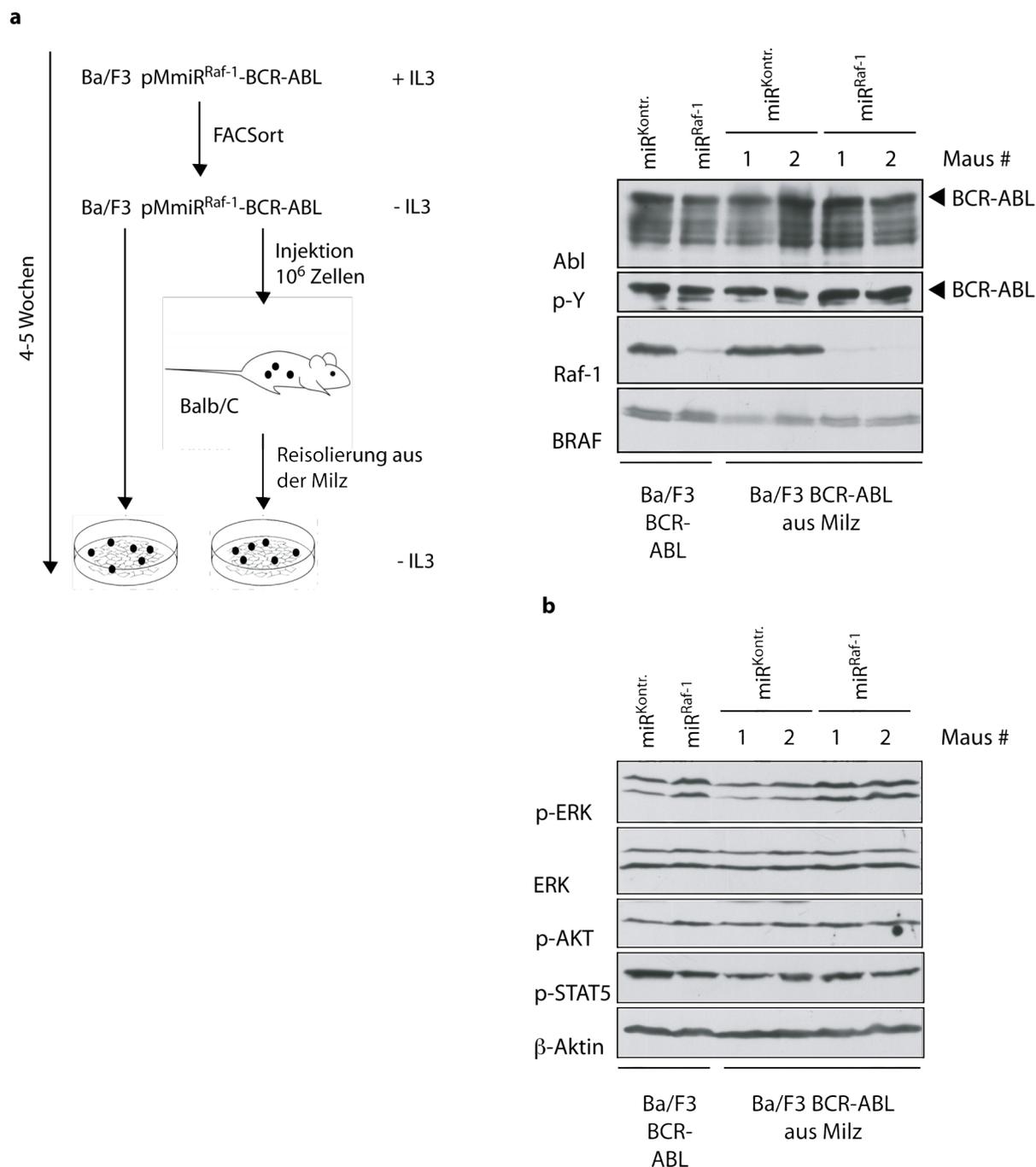


Abb. 3.12: Raf-1-Suppression ist dauerhaft und stabil, auch unter Selektionsdruck.

32D-Zellen wurden mit pMmiR^{Raf-1}-BCR-ABL- bzw. pMmiR^{Kontr.}-BCR-ABL-infizierte und die GFP⁺-Zellen durchflusszytometrisch aufgereinigt. Diese Zellen wurden entweder über einen Zeitraum von mehreren Wochen *in vitro* in IL-3-freiem Medium kultiviert oder zur *in vivo* Untersuchung in syngene Mäuse injiziert. *In vitro* transformierte und die aus Milzen erkrankter Mäuse isolierten Zellen wurden im Western Blot untersucht. **a:** Das retrovirale Konstrukt bleibt über einen Zeitraum von mindestens vier Wochen funktionell. Raf-1 ist dauerhaft herunterreguliert, BCR-ABL dauerhaft überexprimiert. **b:** Raf-1 ist redundant für die ERK-Aktivierung in BCR-ABL-positiven Ba/F3-Zellen. Raf-1-Suppressionszellen weisen mit der Zeit eine Reaktivierung von ERK auf. Andere Signaltransduktionswege wie STAT5 oder AKT werden nicht beeinflusst.

Für die Untersuchung der Relevanz eines TOI in einem Leukämiemodell ist es sehr wichtig, dass das TOI dauerhaft und stabil herunterreguliert ist. Um die Persistenz des retroviralen Vektorsystems zu überprüfen, wurden pMmiR^{Raf-1}-BCR-ABL- und pMmiR^{Kontr.}-BCR-ABL-positive Ba/F3-Zellen für vier bis fünf Wochen einem Selektionsdruck ausgesetzt. Die Zellen wurden entweder in IL-3-freiem Medium kultiviert oder in einem syngenem Mausversuch i. v. injiziert. Nach vier Wochen wurden die Zellen aus den Milzen der Mäuse isoliert und die Raf-1-Depletion untersucht. Nach mehr als vier Wochen lag die miR^{Raf-1}-basierte Suppression von Raf-1 noch bei mehr als 90 %. Gleichzeitig waren die Expressionsniveaus von BCR-ABL zwischen der miR^{Raf-1}- und der miR^{Kontr.}-Gruppe vergleichbar (Abb. 3.12). Interessanterweise war keine Reduktion der ERK-Phosphorylierung in den miR^{Raf-1}-Zellen mehr nachweisbar, auch andere Hauptsignalkaskaden von BCR-ABL wie die PI3-K/AKT- oder die STAT5-Kaskade wurden nicht beeinflusst (Abb. 3.12b). Möglicherweise wurde der Raf-1-Verlust in den miR^{Raf-1}-Zellen durch andere Mitglieder der Raf-Familie kompensiert. Auch für BRAF konnte gezeigt werden, dass es ERK phosphorylieren und dadurch aktivieren kann. Die Expression von BRAF war in miR^{Raf-1}-Zellen jedoch unverändert (Abb. 3.12a).

Das pMmiR^{TOI}-BCR-ABL-System ist funktionell und persistent in hämatologischen Zelllinien. Hierbei handelt es sich jedoch nach wie vor um ein artifizielles Zellsystem. Die Translokation, die zur Entstehung des Philadelphia-Chromosoms und somit zur Expression des Fusionsproteins BCR-ABL führt, ereignet sich in einer frühen hämatopoetischen Vorläufer- oder Stammzelle. Daher wurde das Vektorsystem in einem vergleichbaren System, in primären Zellen aus dem Knochenmark der Maus, getestet. Diese primären Zellen lassen sich nur begrenzte Zeit ex vivo kultivieren, bevor sie die Zellteilung einstellen und in reife Blutzellen ausdifferenzieren. Knochenmarkzellen von 5-FU-vorbehandelten Mäusen wurden retroviral mit pMmiR^{Kontr.}-BCR-ABL oder pMmiR^{Raf-1}-BCR-ABL infiziert. Die GFP-positiven Zellen wurden durchflusszytometrisch sortiert, um nicht transfizierte und somit Raf-1 hoch exprimierende Zellen zu entfernen. Die aufgereinigte Population wurde für einen Western Blot lysiert und die Expression von BCR-ABL und Raf-1 untersucht. Nicht nur in Ba/F3- oder 32D-Zellen sondern auch in primären murinen Knochenmarkzellen war das Vektorsystem funktionell, BCR-ABL wurde überexprimiert und gleichzeitig Raf-1 mit einer Effizienz von mehr als 90 % herunterreguliert (Abb. 3.13).

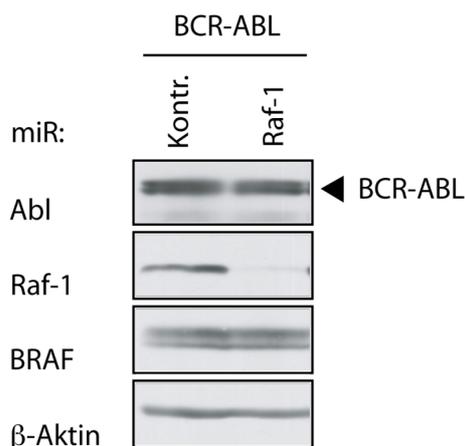


Abb. 3.13: pMmiR^{TOI}-BCR-ABL ist funktionell in murinen primären Knochenmarkzellen.

Knochenmark von 5-FU-vorbehandelten Mäusen wurde retroviral mit pMmiR^{Raf-1}-BCR-ABL bzw. pMmiR^{Kontr.}-BCR-ABL transduziert, die GFP⁺-Zellen durchflusszytometrisch aufgereinigt und für einen Western Blot aufgearbeitet.

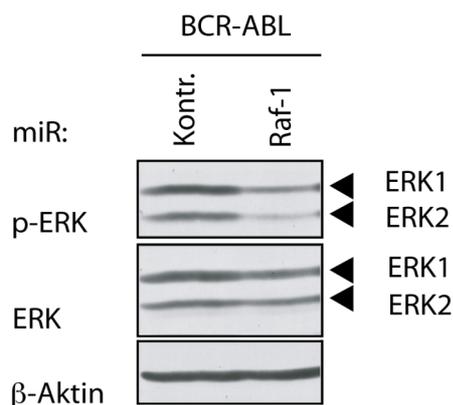


Abb. 3.14: Die BCR-ABL abhängige ERK2-Phosphorylierung ist in primären pMmiR^{Raf-1}-BCR-ABL-transduzierten Knochenmarkzellen reduziert.

5-FU-aktivierte Knochenmarkzellen wurden mit pMmiR^{Raf-1}-BCR-ABL bzw. pMmiR^{Kontr.}-BCR-ABL retroviral infiziert und sechs Stunden in zytokinfreiem Hungermedium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für einen Western Blot aufgearbeitet.

In den primären Knochenmarkzellen wurde auch der Phosphorylierungsstatus von ERK überprüft. Hierfür wurden die infizierten Zellen sechs Stunden in zytokinfreiem Medium mit nur 2 % FCS kultiviert, bevor sie lysiert wurden. Es wurden unsortierte Zellen verwendet, da BCR-ABL-negative Zellen ohnehin in Hungermedium keine ERK-Phosphorylierung aufweisen und somit eine Verunreinigung mit diesen Zellen unproblematisch war. Es zeigte sich, dass auch im primären Material die ERK-, insbesondere die ERK2-Phosphorylierung in

Raf-1-Suppressionszellen im Vergleich zu den Kontrollzellen deutlich verringert war. Somit ist Raf-1 für die BCR-ABL-abhängige MAPK/ERK-Aktivierung in primärem murinen Knochenmark erforderlich.

Ob diese durch Raf-1-Suppression hervorgerufene verringerte Aktivierung der MAPK/ERK-Kaskade auch Auswirkungen auf die Transformationsfähigkeit BCR-ABL-positiver primärer Knochenmarkzellen hat, sollte im nächsten Schritt untersucht werden. Hierzu wurden diese Zellen retroviral mit pMmiR^{Kontr.}-BCR-ABL oder pMmiR^{Raf-1}-BCR-ABL infiziert. Eine durchflusszytometrische Aufreinigung der Zellen war nicht notwendig, da bedingt durch die Vektor-Konzeption in jeder BCR-ABL-transduzierte Zelle eine Raf-1-Suppression gewährleistet ist. Die Zellen wurden nach der Infektion gezählt, die Prozentzahl

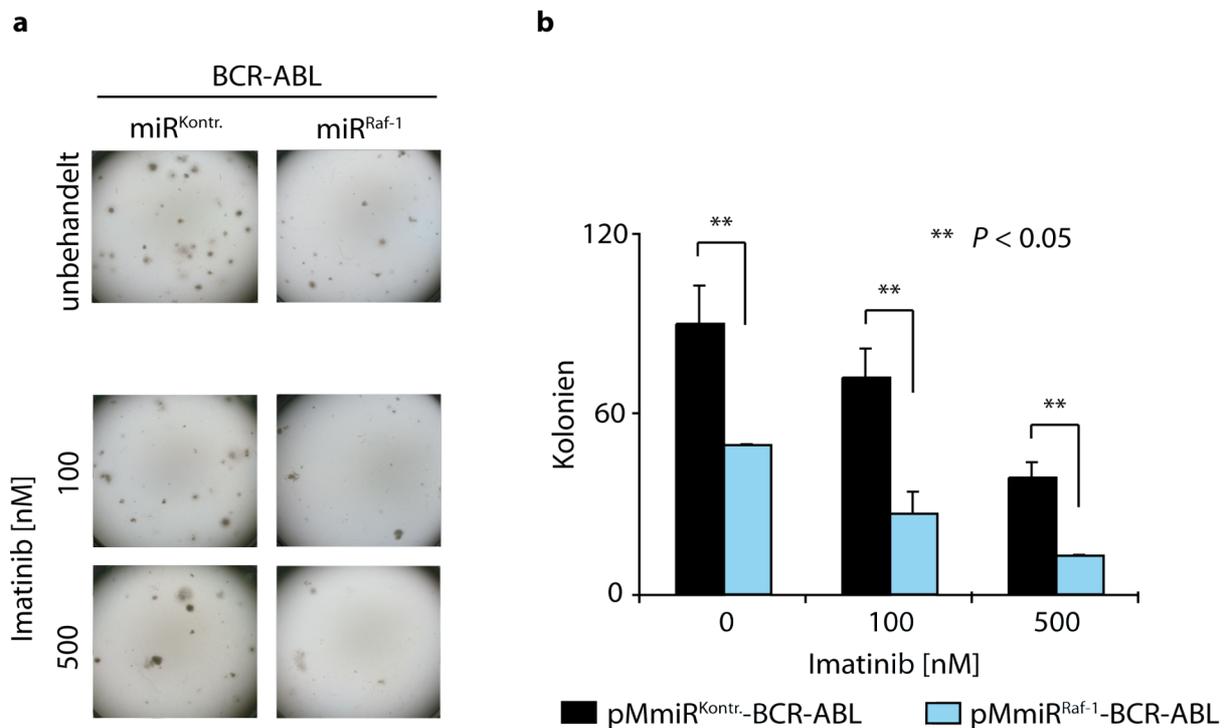


Abb. 3.15: Raf-1 ist erforderlich für die Transformation von BCR-ABL-positiven Knochenmarkzellen im Methylzellulose-Assay.

Knochenmarkzellen von 5-FU-vorbehandelten Mäusen wurde retroviral mit pMmiR^{Raf-1}-BCR-ABL oder pMmiR^{Kontr.}-BCR-ABL infiziert, durchflusszytometrisch auf GFP-Expression überprüft und 500 BCR-ABL-exprimierende Zellen pro Schale in Methylzellulosemedium ausplattiert. Der BCR-ABL-Inhibitor Imatinib wurde zugesetzt um die kombinatorische Wirksamkeit von Raf-1-Suppression mit gleichzeitiger BCR-ABL-Inhibition zu überprüfen. **a:** repräsentative Fotos der Kolonien. **b:** Zusammenfassung der Ergebnisse.

GFP-positiver Zellen durchflusszytometrisch bestimmt und eine definierte Anzahl GFP-positiver Zellen in Methylzellulose ohne Zytokine ausplattiert. Die Fähigkeit, Kolonien zu bilden, war in Abwesenheit von Raf-1 signifikant auf die Hälfte reduziert (Abb. 3.15). Durch Zusatz von Imatinib in das Methylzellulosemedium, konnte die Anzahl der Kolonien weiter reduziert werden.

Auch ein anderes Mitglied der Raf-Familie, BRAF, wurde im Zusammenhang mit der BCR-ABL-abhängigen Aktivierung von ERK beschrieben. Demnach soll BCR-ABL nicht nur Ras-vermittelt Raf-1, sondern zudem über die Signalmolekül Rac und Rap1 BRAF aktivieren. Durch Überexpression des Rap1-Inhibitors SPA-1 wurde die BRAF-Aktivierung reduziert, und in der Folge ERK weniger phosphoryliert¹¹³. Hierbei handelt es sich jedoch um indirekte Versuchsansätze, BRAF wurde niemals direkt herunterreguliert oder inhibiert. Daher wurden BRAF-spezifische miRs in pLMP generiert, getestet (nicht dargestellt) und in den pMmiR^{TOI}-BCR-ABL-Vektor subkloniert. Das resultierende Konstrukt pMmiR^{BRAF}-BCR-ABL erwies sich im Ba/F3-Zellmodell als funktionell sowohl hinsichtlich der BCR-ABL-Expression als auch der BRAF-Suppression (Abb. 3.16).

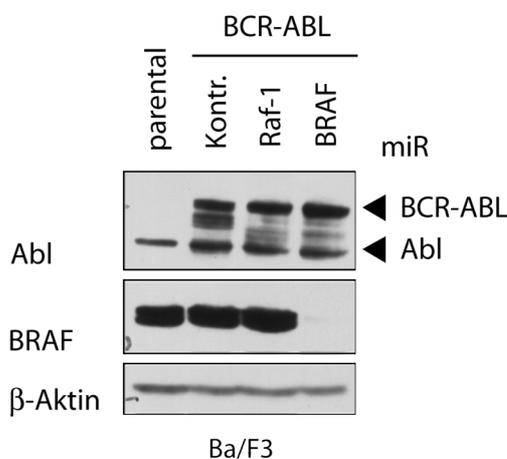


Abb. 3.16: pMmiR^{BRAF}-BCR-ABL ist funktionell in Ba/F3 Zellen

Ba/F3-Zellen wurden mit pMmiR^{BRAF}-BCR-ABL-, pMmiR^{Raf-1}-BCR-ABL- oder pMmiR^{Kontr.}-BCR-ABL-Retroviren infiziert und durchflusszytometrisch aufgereinigt. Die Lysate dieser Zellen wurden im Western Blot analysiert. Sowohl die Expression von BCR-ABL als auch die Suppression von BRAF kann mit dem Konstrukt gewährleistet werden. Als Kontrolle dienten parentale Ba/F3-Zellen, die kein BCR-ABL exprimieren.

Um zu untersuchen, ob nur Raf-1 oder möglicherweise auch BRAF einen Einfluss auf die BCR-ABL-abhängige Transformation im Methylzellulose-Assay hat, wurden in den Assay primäre Knochenmarkzellen 5-FU-vorbehandelter Mäuse, die mit pMmiR^{BRAF}-BCR-

ABL infiziert wurden, eingeschlossen. Interessanterweise zeigte sich, dass BRAF-Suppression keinen Einfluss auf die Anzahl geformter Kolonien in diesem Assay hat (Abb. 3.17). Daher scheint BRAF nicht essenziell für das onkogene Potential von BCR-ABL zu sein. Möglicherweise sind die Beobachtungen von Jin und Kollegen auf Nebeneffekte von SPA-1 und/oder Rac-1 auf andere Signalkaskaden zurückzuführen.

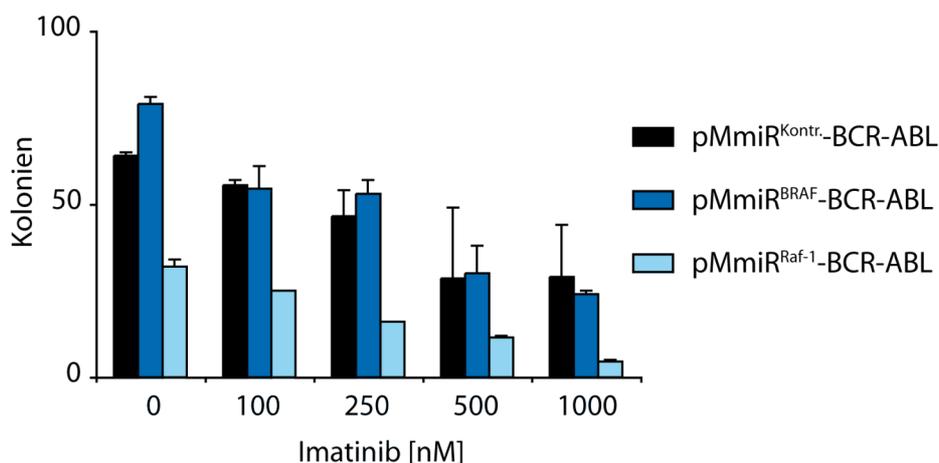


Abb. 3.17: Raf-1 jedoch nicht BRAF ist erforderlich für die Transformation von BCR-ABL-positiven Knochenmarkszellen im Methylzellulose-Assay.

Knochenmarkszellen von 5-FU-vorbehandelten Mäusen wurde retroviral mit pMmiR^{Raf-1}-BCR-ABL, pMmiR^{BRAF}-BCR-ABL oder pMmiR^{Kontr.}-BCR-ABL infiziert, durchflusszytometrisch auf GFP-Expression überprüft und 500 BCR-ABL-exprimierende Zellen pro Schale in Methylzellulosemedium ausplattiert. Der BCR-ABL-Inhibitor Imatinib wurde zugesetzt um die kombinatorische Wirksamkeit von Raf-1-Suppression mit BCR-ABL-Inhibition zu überprüfen.

3.1.5 Die Rolle von Raf-1 im BCR-ABL-Leukämiemodell *in vivo*.

Die Verwendung des murinen Knochenmarkstransplantationsmodells ermöglicht die genaue Untersuchung potenzieller Onkogene *in vivo*. Zu diesem Zweck werden die gesunden Knochenmarkszellen der Empfängermaus durch myeloablative Bestrahlung abgetötet und die Maus durch Injektion genetisch veränderter Knochenmarkszellen rekonstituiert. Der Einfluss des veränderten Gens auf die Hämatopoese kann auf diese Weise detailliert untersucht werden. Es ist sowohl möglich, Spenderknochenmark von somatisch veränderten Mäusen (*knockout* Maus, transgene Maus) zu verwenden, als auch die Spenderzellen durch retrovirale Infektion *ex vivo* zu verändern. Letzteres bezeichnet man als retrovirales Transduktions- und Transplantationsmodell. Mittels retroviralen Gentransfers können sowohl onkogen- als auch siRNA-kodierende Plasmide in die Zelle eingebracht werden, und somit gezielt Proteine

überexprimiert oder supprimiert werden. Der in Abb. 3.18 schematisch dargestellte Ablauf des retroviralen Transduktions- und Transplantationsmodells wurde in mehrere Schritte unterteilt. Die Generierung retroviraler Partikel, welche die genetische Information für die gewünschten genetischen Manipulationen tragen, erfolgte durch Transfektion der Virusproduktionszelllinie Phoenix E mit den entsprechenden Konstrukten. Neben der bereits in Kapitel 3.1.3.1 beschriebenen Funktion als bicistronischer Vektor kodiert MIG-RI auch für die retroviralen LTR-Sequenzen und das die Bildung von Retroviren initiiierende Verpackungssignal. Die Effizienz der Transfektion der Phoenix E-Zellen wurde durch durchflusszytometrische Analyse der GFP-Expression überprüft (Kapitel 6.3.7). Für pMmiR^{TOI}-BCR-ABL lagen die Transfektionseffizienzen zwischen 40 und 60 % (Abb. 3.19a). Bevor die retroviralen Überstände zur Transduktion von murinem Knochenmark verwendet werden konnten, wurde durch Titration die Anzahl der infektiösen, retroviralen Partikel ermittelt (Kapitel 6.3.6.4). Die für Transplantationen verwendeten Titer lagen zwischen 3,2 und $4,2 \times 10^4$ retroviralen Partikeln pro ml (Abb. 3.19).

Die zu transduzierenden Knochenmarkzellen wurden aus 5-Fluorouracil (5-FU)-vorbehandelten Spendermäusen gewonnen (Kapitel 6.6.2) und 24 Stunden in Prästimulationsmedium kultiviert, um die proliferative Aktivität der hämatopoetischen Stammzellen und somit auch ihre Transduzierbarkeit durch retrovirale Partikel zu erhöhen (Kapitel 6.6.3). Die Transduktion der murinen Knochenmarkzellen erfolgte nach dem in Kapitel 6.6.4 beschriebenen Protokoll. Um die Infektionseffizienz durchflusszytometrisch bestimmen zu können, wurden zunächst die Erythrozyten und Zelltrümmer ausgeschlossen. Dazu wurden die in der linearen Darstellung von Größe (*forward scatter*; FS) und Granularität (*sideward scatter*; SS) größer und weniger granuliert abgebildeten Zellen (Abb. 3.19c, blaue Ellipse) markiert. Nur die so ausgewählten mononukleären Zellen gingen in die Analyse der GFP-Expression ein. Der rechte Teil der Abb. 3.19c zeigt die Effizienz der Knochenmarktransduktion mit pMmiR^{Raf-1}-BCR-ABL bzw. pMmiR^{Kontr.}-BCR-ABL. 10,0 bzw. 10,7% der Stamm- und Progenitorzellen waren GFP-positiv und exprimierten somit BCR-ABL und die entsprechende miR^{TOI}. Mithilfe dieses Wertes war es möglich, eine kontrollierte Anzahl transduzierter Zellen zu transplantieren. Die Empfängermause wurden mit einer definierten Anzahl transduzierter Zellen durch Injektion in die laterale Schwanzvene transplantiert (Kapitel 6.6.6). Durch vorherige myeloablative Bestrahlung der Empfängermause wurde

gewährleistet, dass die Rekonstitution nach der Transplantation ausschließlich von den Spenderzellen ausging.

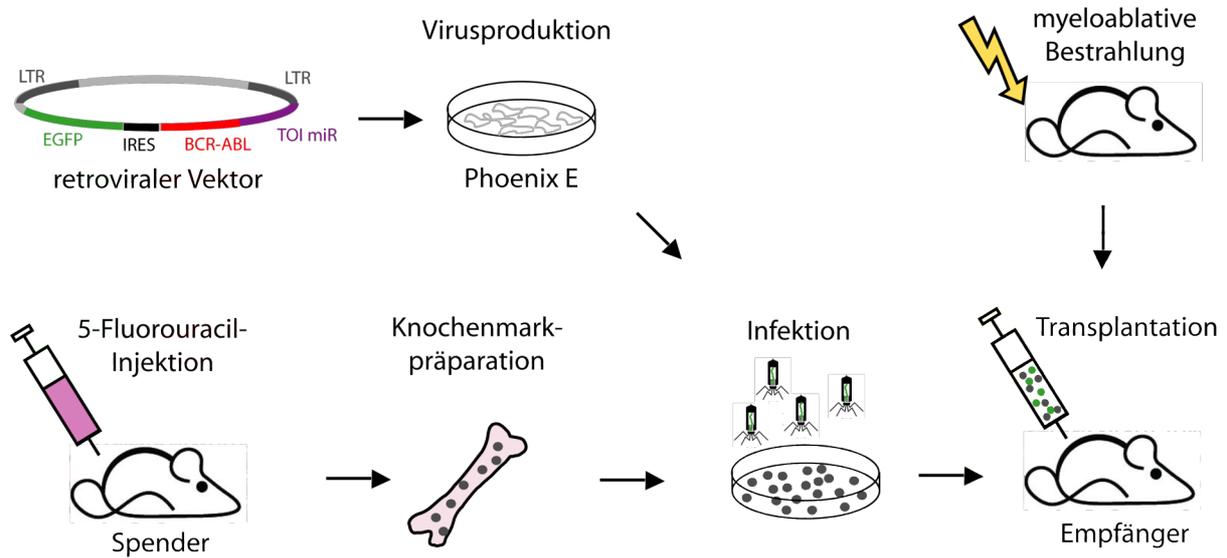


Abb. 3.18: Schematische Darstellung des murinen Knochenmarkstransplantationsmodells.

Zur Herstellung des Retrovirus werden Phoenix E-Zellen mit dem gewünschten retroviralen Plasmid transfiziert und die in den Überstand sezernierten retroviralen Partikel gesammelt. Parallel wird Knochenmark aus Femur und Tibia von 5-FU-vorbehandelten Mäusen geerntet, in Prästimulationsmedium über Nacht inkubiert und anschließend in 4 Runden Spin-Infektion mit entsprechendem retroviralem Überstand infiziert. An Tag 4 nach der Knochenmarkgewinnung werden die transduzierten Knochenmarkszellen in myeloablativ bestrahlte Mäuse durch i. v. Injektion transplantiert.

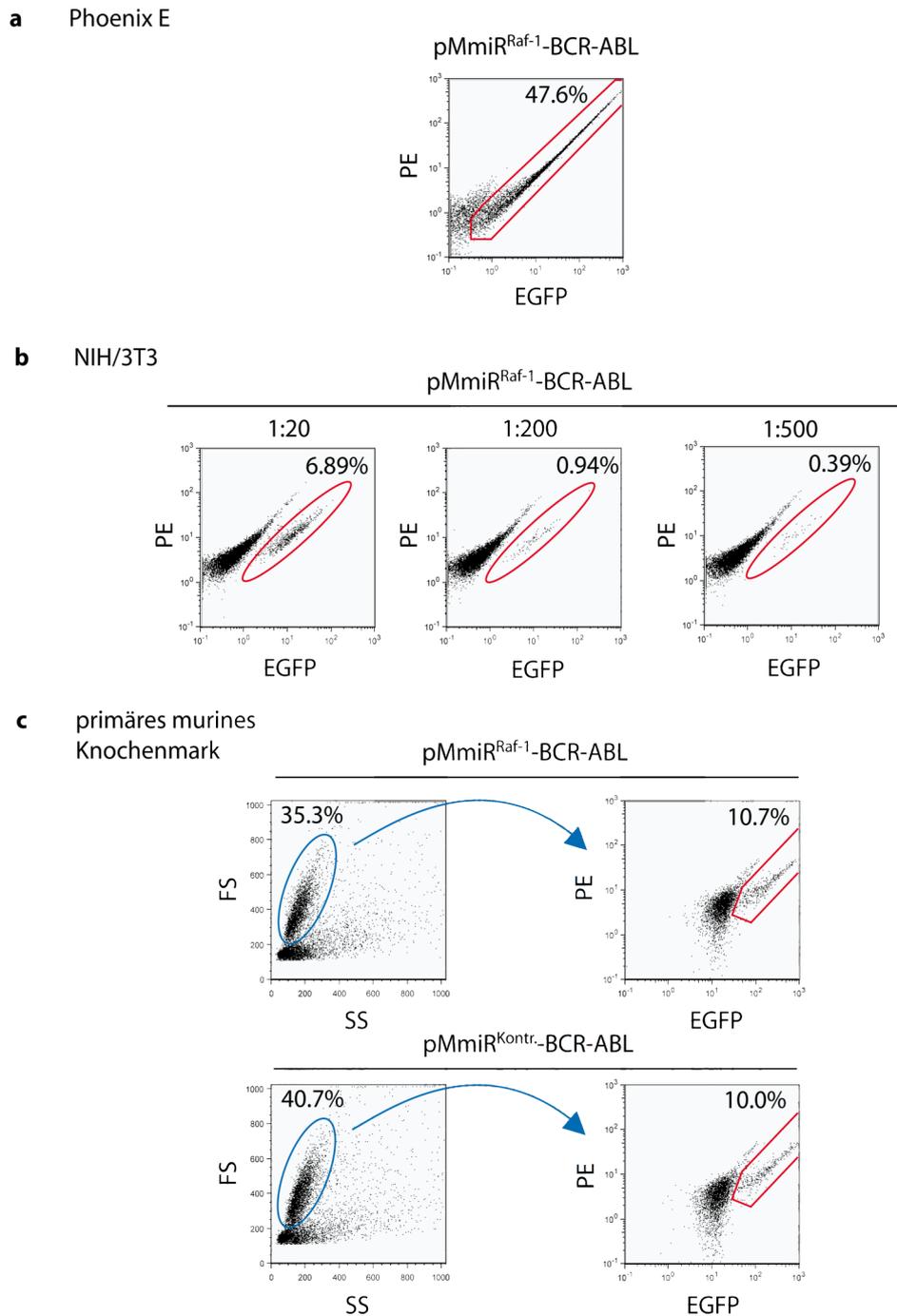


Abb. 3.19: Generierung und Titration eines BCR-ABL und miR^{TOI}-tragenden Retrovirus und retroviraler Transfer von diesem Konstrukt in murines Knochenmark.

Durchflusszytometrische Analyse der GFP-Expression. Die Prozentangaben entsprechen dem Anteil pMmiR^{TOI}-BCR-ABL (GFP)-positiver Zellen (rote Ellipse). **a:** Transfektionseffizienz der Virusproduktionszelllinie Phoenix E. Nicht transfizierte Zellen erscheinen außerhalb der roten Markierung (links). Die Koexpression von GFP in erfolgreich mit pMmiR^{TOI}-BCR-ABL transfizierten Zellen ruft eine Rechtsverschiebung der Zellen hervor. **b:** Titerbestimmung durch Transduktion von NIH/3T3-Zellen in einer Verdünnungsreihe. Retroviraler Überstand wurde in Verdünnungen von 1:20, 1:200 und 1:500 verwendet, um NIH/3T3-Zellen zu infizieren. **c:** Analyse der Effizienz der Knochenmarkstransduktion mit pMmiR^{TOI}-BCR-ABL (rechts). Ausschluss von Erythrozyten und Zellteilen aus der GFP-Analyse (links). Nur die blau markierten Zellen gehen in die GFP-Analyse ein. FS: *forward scatter*, Größe der Zellen; SS: *sideward scatter*, Granularität der Zellen.

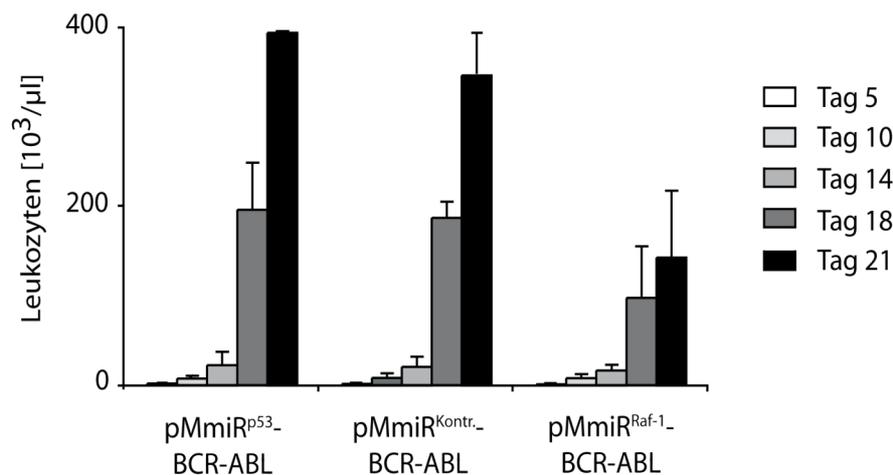


Abb. 3.20: Einfluss der Raf-1-Suppression auf den Verlauf der Leukozytenwerte im peripheren Blut nach Transplantation

Knochenmark wurde mit den angegebenen Konstrukten transduziert. Letal bestrahlte Mäuse wurden mit 5.000 GFP-positiven und 200.000 untransduzierten Knochenmarkszellen transplantiert. Die Leukozytenanzahl im peripheren Blut wurde in regelmäßigen Abständen durch Messung im Blutbildgerät (Kapitel 6.6.7) bestimmt.

Innerhalb weniger Tage entwickelten die Mäuse eine CML-ähnliche myeloproliferative Erkrankung, die mit einer Leukozytose und einem Anteil BCR-ABL-positiver Zellen von mehr als 80 % im peripheren Blut einherging. Im Hinblick auf die Leukozytose waren Unterschiede zwischen den Gruppen zu beobachten. Während Mäuse, denen pMmiR^{Kontr.}-BCR-ABL-infiziertes Knochenmark transplantiert wurde, einen schnellen und rapiden Anstieg der Leukozytenzahl im peripheren Blut aufwiesen, führte die Suppression des Tumorsuppressors p53 zu einer geringfügigen Akzeleration der Erkrankung. Im Gegensatz hierzu war die Leukozytose in der pMmiR^{Raf-1}-BCR-ABL-Gruppe deutlich verzögert (Abb. 3.20).

Bekanntermaßen induziert BCR-ABL im murinen Transduktions- und Transplantationsmodell rasch eine stark ausgeprägte Splenomegalie. Die Milzen der Mäuse sind deutlich vergrößert und können ein Gewicht von bis zu einem Gramm aufweisen. Vergleicht man die Milzgewichte zwischen der miR^{Kontr.}- und der miR^{Raf-1}-Gruppe, so war die Splenomegalie in der miR^{Raf-1}-Gruppe schwächer ausgeprägt (Abb. 3.21).

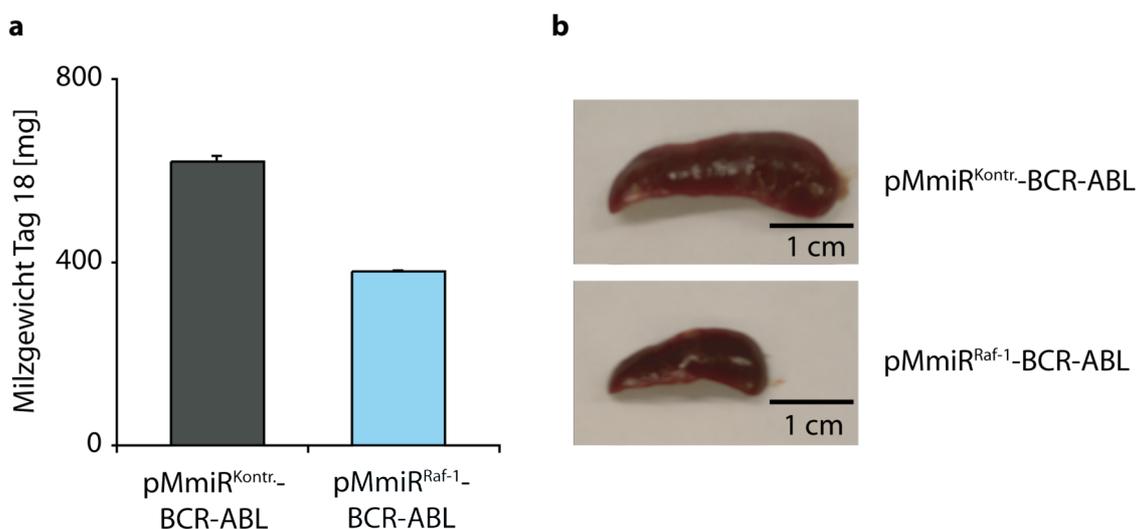


Abb. 3.21: Einfluss der Raf-1-Suppression auf die Entwicklung einer BCR-ABL induzierten Splenomegalie.

Von erkrankten Mäusen, die mit pMmiR^{Raf-1}-BCR-ABL oder pMmiR^{Kontr.}-BCR-ABL transplantiert wurden, wurden an Tag 18 nach Transplantation Milzen entnommen, **a**: Das Gewicht der Milzen wurde bestimmt und **b**: die Größe fotodokumentiert.

Um zu bestätigen, dass die die Leukozytose verursachenden Zellen myeloiden Ursprungs sind, wurden parallel zum Blutbild Ausstriche des peripheren Bluts angefertigt (Kapitel 6.6.7). Die mikroskopische Betrachtung der Pappenheim-gefärbten Ausstriche offenbarte eine deutlich massivere Expansion der neutrophilen Granulozyten bei pMmiR^{Kontr.}-BCR-ABL-transplantierten Mäusen gegenüber den pMmiR^{Raf-1}-BCR-ABL-Tieren (Abb. 3.22). Dennoch waren die Granulozyten auch im Blut der miR^{Raf-1}-Gruppe geringfügig vermehrt.

Die myeloproliferative Erkrankung in den Tieren führte bereits innerhalb weniger Wochen zum Tod. Als wahrscheinliche Todesursache ließen sich bei mehreren Mäusen massive pulmonale Hämorrhagien nachweisen. Diese beobachtet man auch bei durch andere Onkogene verursachten myeloproliferativen Erkrankungen¹¹⁴⁻¹¹⁷. Die Tendenzen, erkennbar aus dem Verlauf der Leukozytose, spiegelten sich auch in den Latenzzeiten der Erkrankungen wider. So wiesen pMmiR^{Kontr.}-BCR-ABL-transplantierte Mäuse eine mediane Überlebenszeit von $23,3 \pm 4,3$ Tage auf. pMmiR^{p53}-BCR-ABL-transplantierte Mäuse verstarben etwas früher. Raf-1-Suppression hingegen verlängerte die Überlebenszeit auf $34,6 \pm 7,0$ Tage (Abb. 3.23). Somit ist Raf-1 essentiell für die BCR-ABL-induzierte Entwicklung einer chronischen myeloischen Leukämie im murinen Knochenmarktransplantationsmodell. Die Tatsache, dass

Raf-1-Suppressionsmäuse zwar mit einer längeren Latenz, aber dennoch erkrankten, ist möglicherweise auf die Reaktivierung von ERK zurückzuführen, wie sie bei längerer Kultivierung in zytokinfreiem Medium vorkommt (bereits gezeigt in Abb. 3.12).

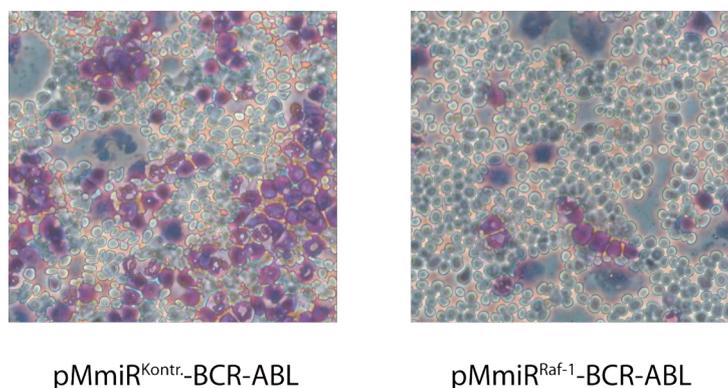


Abb. 3.22: Raf-1 ist erforderlich für die Entwicklung einer BCR-ABL-abhängigen Granulozytose.

pMmiR^{Raf-1}-BCR-ABL- oder pMmiR^{Kontr.}-BCR-ABL-transplantierten Mäusen wurde an Tag 18 nach Transplantation Blut entnommen, ein Blutausstrich angefertigt und nach Pappenheim gefärbt. Die BCR-ABL-abhängige Granulozytose ist in Raf-1-supprimierten Mäusen reduziert.

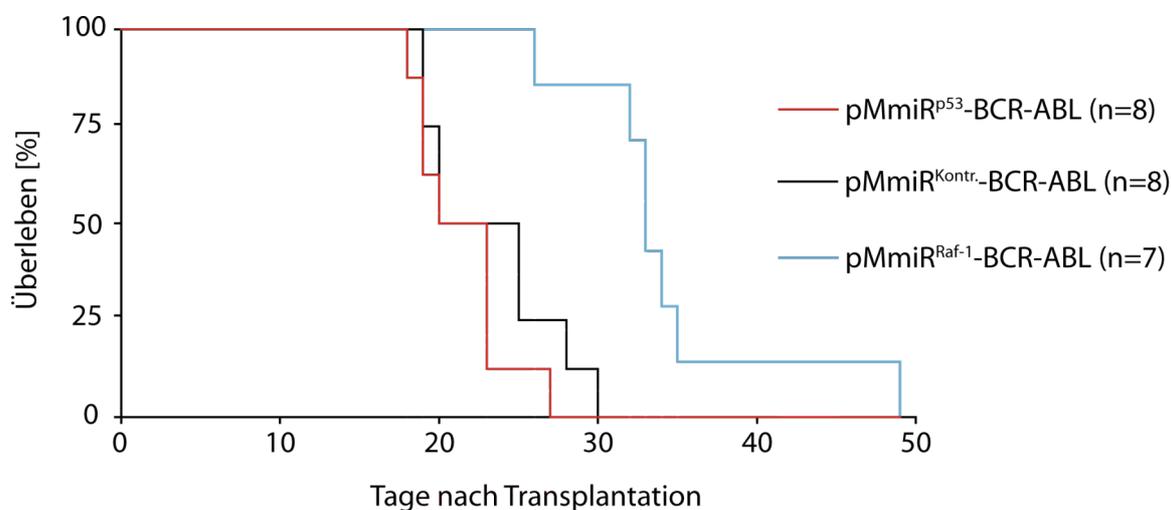


Abb. 3.23: Raf-1-Suppression resultiert in einer Verdoppelung des Gesamtüberlebens von Balb/C-Mäusen im BCR-ABL-Transplantationsmodell.

Knochenmark von 5-FU-vorbehandelten Mäusen wurde retroviral mit den entsprechenden Vektoren infiziert und letal bestrahlten Empfänger-mäusen transplantiert. Die Abbildung zeigt die Kaplan-Meier-Überlebenskurve pMmiR^{Raf-1}-BCR-ABL-, pMmiR^{p53}-BCR-ABL- bzw. pMmiR^{Kontr.}-BCR-ABL-transplantiert Mäuse. Die Mäuse verstarben an der myeloproliferativen oder einer lymphoiden Erkrankung oder wurden aufgrund des schlechten Allgemeinzustands infolge der Erkrankung getötet. Der prozentuale Anteil überlebender Tiere wurde gegen die Zeit aufgetragen. Die Ergebnisse von 2 unabhängigen Versuchen wurden zusammengefasst.

Möglicherweise können die Zellen die Raf-1-Suppression aber auch unterbinden, oder durch den vorhandenen Selektionsdruck wachsen maligne Klone aus, die nur eine schwache Raf-1-Suppression aufweisen und somit überleben können. Um dies zu testen, wurden Splenozyten aus den Milzen erkrankter Mäuse aufgearbeitet und von den Tieren, die mehr als 80 % GFP-positive Splenozyten aufwiesen, eine RNA-Isolierung mit anschließender cDNA-Synthese durchgeführt. Die cDNA wurde für eine qRT-PCR eingesetzt, die mRNA-Mengen von p53 bzw. Raf-1 zu GAPDH in Relation gesetzt und auf 1 normiert. Abb. 3.24 zeigt, dass sowohl die p53- als auch die Raf-1-Suppression in den entsprechenden Mausgruppen stabil waren. Vergleicht man diese Suppressionseffizienzen mit denen von Knochenmarkszellen vor der Injektion (Abb. 3.13), ist kein Unterschied festzustellen. Die Menge der verbliebenen mRNA liegt in beiden Fällen bei ca. 25 %.

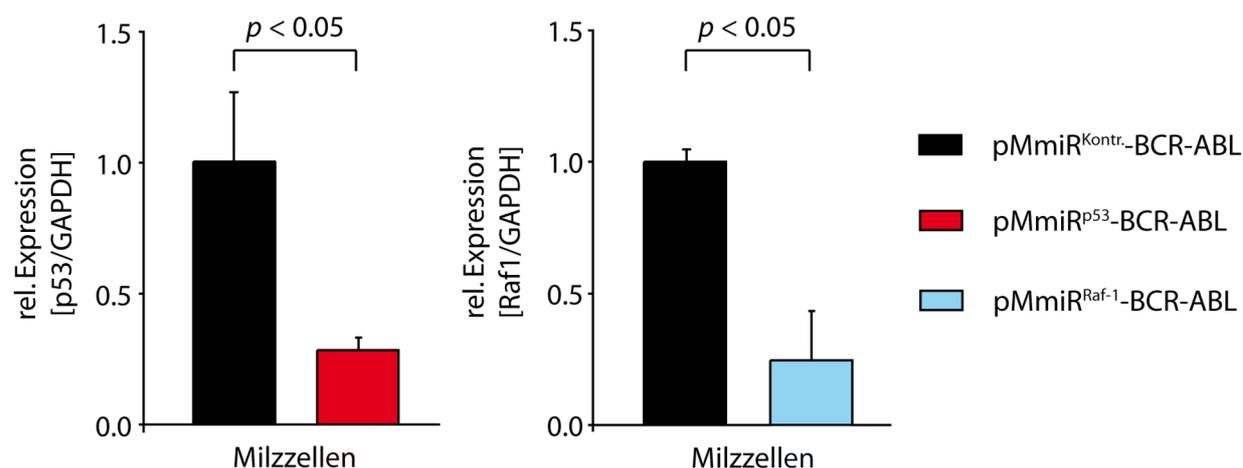


Abb. 3.24: qRT-PCR zur Analyse der p53 und der Raf-1-Suppression in leukämischen Zellen erkrankter Mäuse.

Milzzellen erkrankter Mäuse wurden entnommen und die RNA isoliert. Nach Umschreibung der RNA in cDNA wurde die Menge an p53- (links) bzw. Raf-1- (rechts) Transkript quantitativ in Duplikaten in einer qRT-PCR bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse wurden auf das Kontrollgen GAPDH normiert.

3.2 Das Adapterprotein Grb10 und BCR-ABL

BCR-ABL aktiviert neben der MAPK/ERK-Kaskade auch den PI3-K/AKT-Signalweg um die Proliferation und Transformation der leukämischen Zelle zu stimulieren. Ein Mediator für die Aktivierung von AKT ist das Adapterprotein Grb10⁵³. Es sollte untersucht werden, ob die BCR-ABL-abhängige AKT-Aktivierung auch durch Grb10 vermittelt wird und ob somit die Suppression von Grb10 in BCR-ABL-positiven Zellen deren Transformationsfähigkeit beeinflusst.

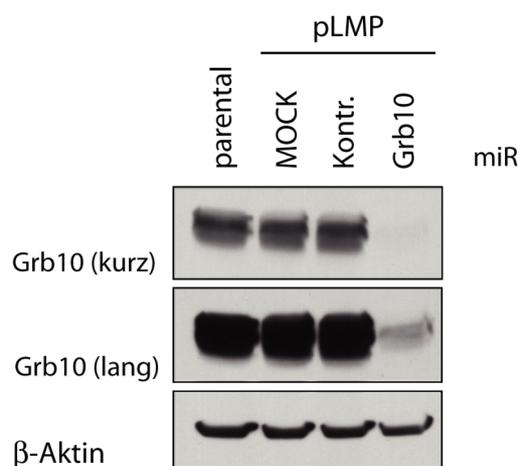


Abb. 3.25: Untersuchung einer Grb10-spezifischen miR auf ihre Suppressionseffizienz.

NIH/3T3-Zellen wurden retroviral mit pLMP MOCK, pLMPmiR^{Kontr.} oder pLMP^{Grb10} infiziert und im Western Blot auf Grb10-Suppression untersucht. Die Suppressionseffizienz der miR^{Grb10} liegt bei über 90 %. Das Protein ist in dieser Probe ausschließlich bei langer Exposition des Filmes überhaupt nachweisbar.

Zunächst wurden zwei Grb10-spezifische Sequenzen im pSM2-Vektor aus der miR-Sammlung von Greg Hannon über Openbiosystems bezogen. In Relation zu anderen Targets erwiesen sich Klone aus der Library als weniger zuverlässig, als Sequenzen, die mittels BIOPREDSi generiert wurden. Im Vergleich zum pLMP-Vektor beinhaltet der pSM2-Vektor einen zusätzlichen H1-Promotor, über den die miR^{TOI} angesteuert wird, ihm fehlt andererseits die GFP-Kassette. Es konnte gezeigt werden, dass der pLMP bei direkter Gegenüberstellung dem pSM2 hinsichtlich der Suppressionseffizienzen überlegen ist¹⁰⁸. Daher wurden die miR^{Grb10}-Sequenzen in den pLMP-Vektor kloniert und die weiteren Versuche mit diesem Vektor durchgeführt. Um die Effektivität der miR^{Grb10} im Zellsystem zu testen, wurden NIH/3T3-Zellen retroviral mit pLMPmiR^{MOCK}, pLMPmiR^{Kontr.} oder pLMPmiR^{Grb10} infiziert,

mit Puromycin selektioniert und im Western Blot untersucht. Die Wirkstärke der effektiveren $\text{miR}^{\text{Grb10}}$ ist in Abb. 3.25 dargestellt.

Die $\text{miR}^{\text{Grb10}}$ -Kassette wurde in einen BCR-ABL-kodierenden Vektor kloniert und so $\text{pMmiR}^{\text{Grb10}}\text{-BCR-ABL}$ generiert. Für funktionale Tests wurden verschiedene Zellarten retroviral mit $\text{pMmiR}^{\text{Kontr.}}\text{-BCR-ABL}$ oder $\text{pMmiR}^{\text{Grb10}}\text{-BCR-ABL}$ infiziert und durchflusszytometrisch aufgereinigt. Nur in NIH/3T3-Zellen war Grb10 überhaupt im Western Blot nachweisbar, daher wurden infizierte Ba/F3-, 32D- und primäre, murine Knochenmarkzellen mittels qRT-PCR hinsichtlich ihrer Grb10-Suppression analysiert. Das Konstrukt war in allen getesteten Zelllinien und in den primären Zellen funktionell mit guten bis sehr guten Suppressionseffizienzen (Abb. 3.26).

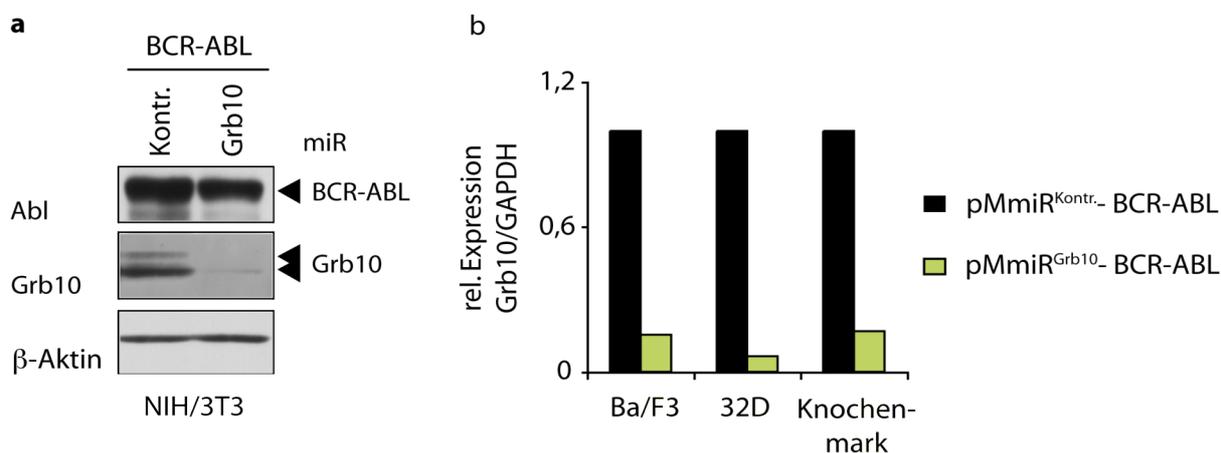


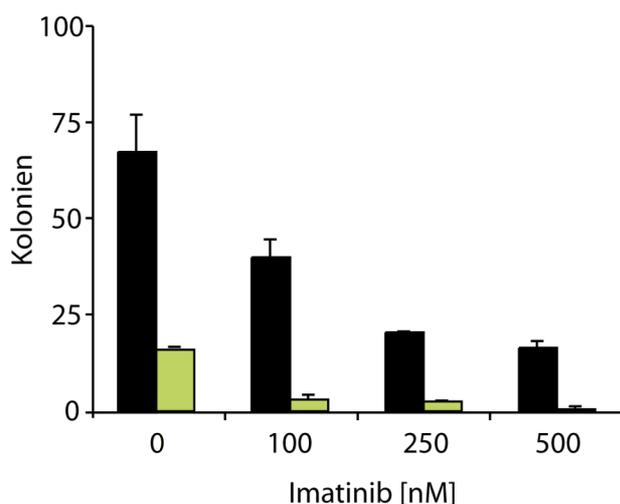
Abb. 3.26: $\text{pMmiR}^{\text{Grb10}}\text{-BCR-ABL}$ ist in NIH/3T3-, Ba/F3-, 32D- und primären murinen Knochenmarkzellen funktionell.

a: NIH/3T3-Zellen wurden retroviral mit $\text{pMmiR}^{\text{Kontr.}}\text{-BCR-ABL}$ oder $\text{pMmiR}^{\text{Grb10}}\text{-BCR-ABL}$ infiziert, durchflusszytometrisch aufgereinigt und für einen Western Blot lysiert. Die Zellen weisen sowohl eine BCR-ABL-Expression auf als auch eine Grb10-Suppression. **b:** Ba/F3-, 32D- und 5-FU-vorbehandelte Knochenmarkzellen der Maus wurden retroviral mit $\text{pMmiR}^{\text{Kontr.}}\text{-BCR-ABL}$ oder $\text{pMmiR}^{\text{Grb10}}\text{-BCR-ABL}$ infiziert. Da in Ba/F3-, 32D- und primären murinen Knochenmarkzellen Grb10 im Western Blot nicht nachweisbar ist, wurde die Grb10-Suppression mittels qRT-PCR nachgewiesen.

Da Grb10 in der Literatur in Zusammenhang mit der Aktivierung von AKT gebracht wird und außerdem gezeigt wurde, dass Grb10 direkt mit BCR-ABL interagiert, sollte untersucht werden, ob Grb10 auch für die BCR-ABL-abhängige AKT-Aktivierung und die damit einhergehenden Transformation muriner Knochenmarkzellen von Bedeutung ist. Hierfür wurden Knochenmarkzellen von 5-FU-vorbehandelten Mäusen retroviral mit $\text{pMmiR}^{\text{Kontr.}}\text{-BCR-ABL}$ oder $\text{pMmiR}^{\text{Grb10}}\text{-BCR-ABL}$ infiziert, die Infektionseffizienz,

korrelierend mit dem Anteil GFP⁺-Zellen, mittels FACS ermittelt und die definierte Anzahl von 500 GFP⁺-Zellen pro Schale in Methylzellulosemedium ohne Zytokinzusatz ausplattiert. Innerhalb von 10 Tagen waren Kolonien makroskopisch sichtbar. Die Grb10-Suppressionszellen wuchsen jedoch im Vergleich zu den Kontrollzellen nur zu weniger, und vor allen Dingen kleineren Kolonien aus. Zusatz von Imatinib zum Methylzellulosemedium in steigender Konzentration reduzierte sowohl die Kolonienzahl, die aus Kontroll- als auch aus Grb10-Suppressionszellen hervorgingen (Abb. 3.27a). Als Kontrolle für korrekte Zellzahlbestimmung diente ein Ansatz, bei dem 500 Zellen insgesamt (GFP⁻ und GFP⁺) pro Schale zytokinhaltiger Methylzellulose ausplattiert wurden. In diesem Medium können sowohl parentale als auch BCR-ABL⁺-Zellen Kolonien ausbilden (Abb. 3.27b). Die Ergebnisse zeigen, dass Grb10 von Bedeutung für die BCR-ABL-abhängige Transformation hämatopoetischer Zellen *in vitro* ist.

a Methylzellulose ohne Zytokine



b Methylzellulose + Zytokine

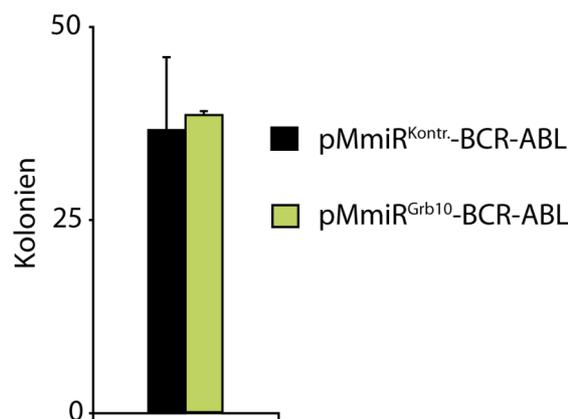


Abb. 3.27: Grb10 ist erforderlich für die Bildung transformierender Kolonien im Knochenmark-Methylzellulose-Assay.

Knochenmark von 5-FU-vorbehandelten Mäusen wurde retroviral mit pMmiR^{Grb10}-BCR-ABL oder pMmiR^{Kontr.}-BCR-ABL infiziert. Die Infektionseffizienz wurde durchflusszytometrisch ermittelt und pro Schale **a**: 500 GFP⁺ und demnach BCR-ABL-exprimierende Zellen in Methylzellulose-Medium ohne Zusatz von Zytokinen ausplattiert. Um die Sensitivität der Grb10-supprimierten Zellen gegenüber dem BCR-ABL-Inhibitor Imatinib zu überprüfen, wurde dem Medium dieser Inhibitor in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt. **b**: Kolonienbildung in zytokinhaltiger Methylzellulose. Dieser Ansatz dient zur Kontrolle, ob insgesamt die gleiche Anzahl an Zellen pro Genotyp ausplattiert wurde.

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob Grb10 auch *in vivo* für die BCR-ABL-vermittelte Transformation und damit einhergehende Leukämogenese erforderlich ist. Dies wurde in einem murinen Transduktions- und Transplantationsmodell der CML untersucht. Hierfür wurden Knochenmarkzellen aus Femur und Tibia 5-FU-vorbehandelter Mäuse isoliert, gemäß Kapitel 6.6.4 retroviral mit pMmiR^{Kontr.}-BCR-ABL oder pMmiR^{Grb10}-BCR-ABL infiziert und letal bestrahlten, syngenen Balb/C-Mäusen transplantiert. Innerhalb von 18 Tagen entwickelten die Tiere der Kontroll-Gruppe eine starke Leukozytose, charakteristisch für eine CML-ähnliche myeloproliferative Erkrankung. Die Leukozytenzahlen in den Tieren der miR^{Grb10}-Gruppe hingegen stiegen nur langsam an, schlussendlich erkrankten jedoch auch diese Mäuse an einer CML, allerdings mit deutlich längerer Latenz (Abb. 3.28).

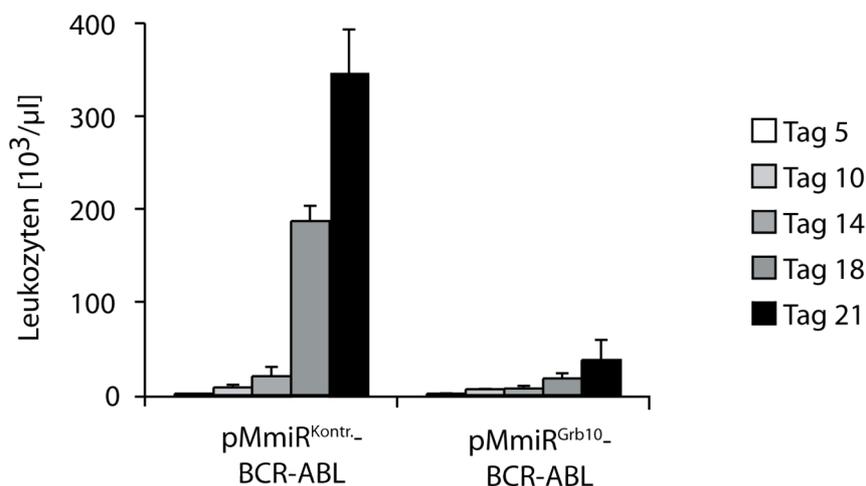


Abb. 3.28: Einfluss von Grb10-Suppression auf die BCR-ABL-induzierte Leukozytose.

Knochenmark wurde mit den angegebenen Konstrukten transduziert. Letal bestrahlte Mäuse wurden mit 5000 GFP-positiven und 200.000 untransduzierten Knochenmarkzellen transplantiert. Die Leukozytenanzahl im peripheren Blut wurde in regelmäßigen Abständen durch Messung im Blutbildgerät (Kapitel 6.6.8) bestimmt.

Von den Mäusen wurden Blutausstriche zu verschiedenen Zeitpunkten angefertigt und nach Pappenheim gefärbt (Kapitel 6.6.8). Abb. 3.29 zeigt repräsentative Ausstriche der beiden Gruppen an Tag 18 nach Transplantation. Eine Granulozytose ist in pMmiR^{Kontr.}-BCR-ABL-transplantierten Mäusen deutlich erkennbar. Im Gegensatz dazu sind die Granulozytenzahlen in Mäusen der miR^{Grb10}-Gruppe deutlich verringert.

Insgesamt führte die Grb10-Suppression in BCR-ABL-positiven Knochenmarkszellen zu einer deutlichen Verlangsamung der CML-ähnlichen Erkrankung im Mausmodell. Kontrollmäuse verstarben mit einer medianen Überlebenszeit von $23,3 \pm 4,3$ Tagen, Mäuse, die mit pMmiR^{Grb10}-BCR-ABL-infiziertem Knochenmark transplantiert wurden, hingegen erst nach einer medianen Zeit von $30,4 \pm 7,0$ Tagen (Abb. 3.30). Zusammengefasst zeigen die Daten, dass Grb10 eine wichtige Rolle für die BCR-ABL-abhängige Leukämogenese sowohl *in vitro* als auch *in vivo* spielt.

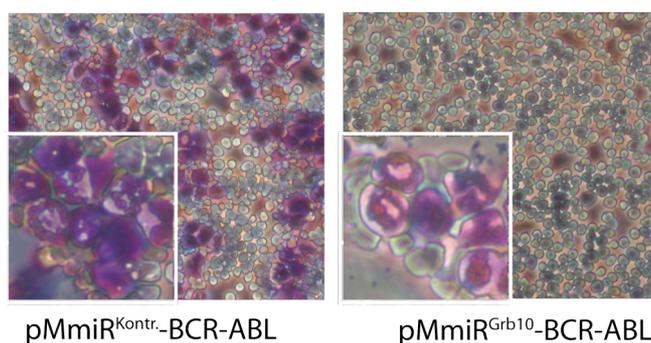


Abb. 3.29: Grb10 ist erforderlich für die Entwicklung einer BCR-ABL-abhängigen Granulozytose

pMmiR^{Grb10}-BCR-ABL- oder pMmiR^{Kontr.}-BCR-ABL-transplantierten Mäusen wurde an Tag 18 nach Transplantation Blut entnommen, ein Blutausschick angefertigt und nach Pappenheim gefärbt. Die BCR-ABL-abhängige Granulozytose ist in Grb10-supprimierten Mäusen reduziert.

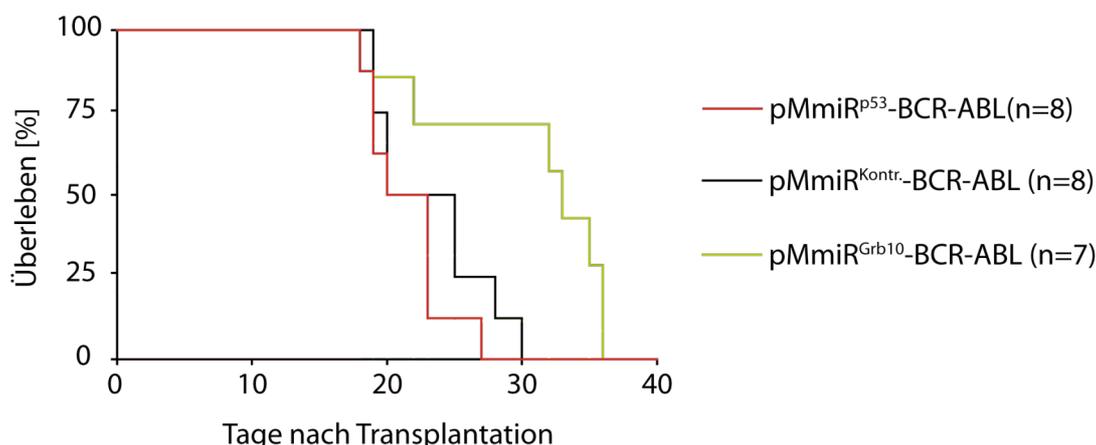


Abb. 3.30: Grb10-Suppression führt zu einer signifikanten Verlängerung des Gesamtüberlebens im BCR-ABL-Transplantationsmodell.

Knochenmark von 5-FU-vorbehandelten Mäusen wurde retroviral mit den entsprechenden Vektoren infiziert und letal bestrahlten Empfängermausen transplantiert. Die Mäuse verstarben an einer myelo- oder einer lymphoproliferativen Erkrankung oder wurden aufgrund des schlechten Allgemeinzustands infolge der Erkrankung getötet. Der prozentuale Anteil überlebender Tiere wurde gegen die Zeit aufgetragen.

3.3 Eine sequenz- und ligationsunabhängige Klonierungsstrategie

Das beschriebene retrovirale Vektorsystem kann zur Untersuchung eines Kofaktors für die BCR-ABL-abhängige Transformation verwendet werden. Gleichzeitig könnten eine Vielzahl verschiedenster Targets gleichzeitig untersucht werden, wenn miR^{TOI}-Bibliotheken in den Vektor kloniert werden könnten. Daher sollte in dieser Arbeit eine Klonierungsstrategie zum vereinfachten Austausch der miR^{TOI} in pMmiR^{TOI}-BCR-ABL entwickelt werden.

Die konventionelle Klonierung von pMmiR^{TOI}-BCR-ABL gliederte sich in mehrere Teilschritte. Zunächst wurde das BCR-ABL-Onkogen in den MIG-Z-Vektor kloniert. Im zweiten Schritt wurde die miR^{TOI} mittels PCR amplifiziert, wobei pLMPmiR^{TOI} als Vorlage diente. Dies war deswegen notwendig, weil der pLMP-Vektor Bereiche kodiert, die für die miR^{TOI} essentiell sind. Das so generierte Insert wurde mit *Bam*HI und *Bg*III verdaut und in den *Bam*HI-geschnittenen pM-BCR-ABL ligiert. Diese Klonierungsstrategie erwies sich als komplikationsreich. Hierfür gibt es mehrere Erklärungen. Zum einen weist BCR-ABL viele GC-reiche Bereiche auf, die zur Bildung von Sekundärstrukturen führen können. Des Weiteren weisen retrovirale Vektoren generell eine hohe Neigung zur Rekombination auf. Es wird angenommen, dass die Rekombination zwischen den beiden LTR-Bereichen stattfindet und somit die dazwischen liegende genetische Information (in diesem Fall die MCS und die Gene für BCR-ABL und GFP) verloren geht. Außerdem ist das Größenverhältnis zwischen Insert und Vektor suboptimal. Der pM-BCR-ABL-Vektor weist eine Größe von mehr als 12000 Basenpaaren auf, während das Insert nur aus etwa 350 Basenpaaren besteht. Die Ligation wird zusätzlich durch die Haarnadelstruktur der miR^{TOI} gestört.

Die kürzlich veröffentlichte Methode der sequenz- und ligationsunabhängigen Klonierung (*sequence and ligation-independent cloning*, SLIC) bot sich für diese Zwecke an¹¹⁸. Bei dieser Methode wird die *in vivo* natürlich vorkommende homologe Rekombination imitiert. Erforderlich für die homologe Rekombination *in vitro* sind ssDNA-Überhänge an Vektor und Insert, die bei dieser Methode künstlich durch eine Exonuklease generiert werden. Der große Vorteil dieser Technik ist ihre Unabhängigkeit von Sequenzen, lediglich der Vektor muss eine Restriktionsschnittstelle aufweisen, die jedoch beliebig ist. Das Insert hingegen wird nicht durch Restriktionsendonukleasen verdaut. Kompatibilitätsprobleme sind somit hinfällig, unerwünschte Restriktionsschnittstellen im Insert müssen nicht mutiert und

stillgelegt werden. Vielmehr wird sogar die Orientierung des Insert im Vektor mit dieser Strategie festgelegt.

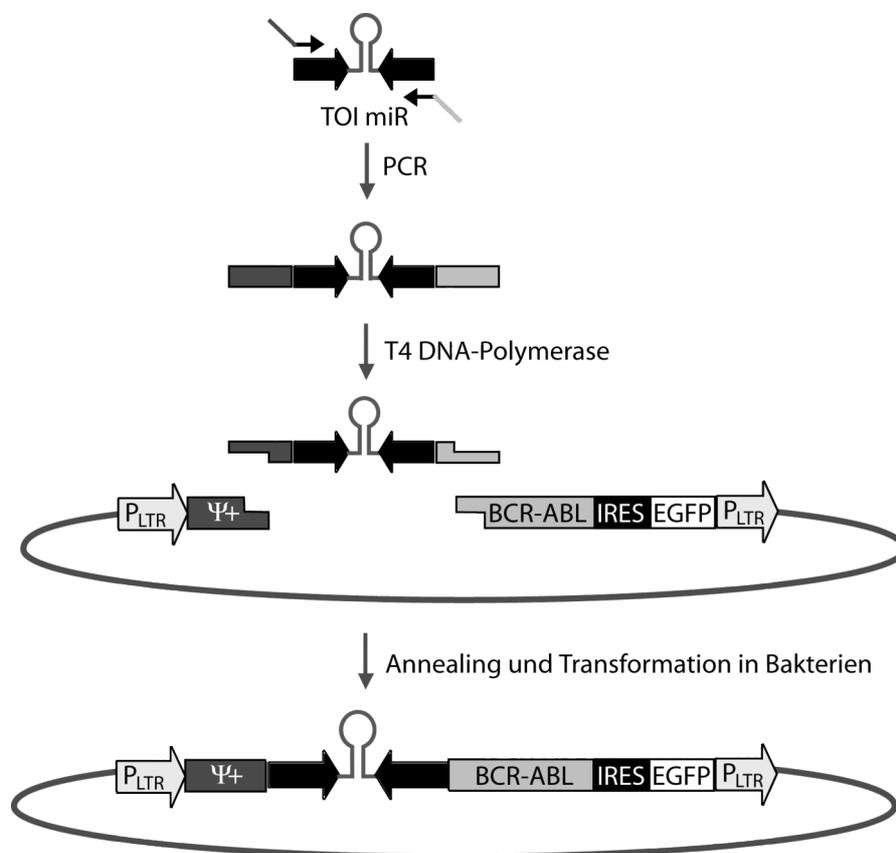


Abb. 3.31: Klonierungsstrategie zur Generierung des Vektors pMmiR^{TOI}-BCR-ABL mittels SLIC.

Mittels chimärer Primer, die zum Teil Vektor-homologe Bereiche tragen, wird ein PCR-Produkt generiert. Sowohl dieses PCR-Produkt als auch der restriktionsverdaute Zielvektor wird mit T4-Polymerase in Anwesenheit eines Desoxyribonukleosidtriphosphates behandelt, so dass die T4-Polymerase nur als Exonuklease, nicht aber als Polymerase aktiv sein kann. Vektor und Insert werden miteinander vermengt, die homologe Rekombination erfolgt in der Bakterienzelle.

Der pM-BCR-ABL-Vektor wurde mit *Bam*HI geschnitten, aufgereinigt und anschließend einer T4-Polymerase-Behandlung unterzogen. In Abwesenheit von dNTPs kann die T4-Polymerase lediglich ihre 3'-5'-Exonukleaseaktivität ausüben, die Polymeraseaktivität ist mangels der dNTPs inhibiert. Damit die DNA nicht vollständig abgebaut wird, wird dem Ansatz Desoxycytidintriphosphat (dCTP) zugegeben, es ist aber auch jedes andere Desoxyribonukleosidtriphosphat verwendbar. Auf diese Weise entstehen Überhänge am 5'-Ende. Das Insert wird mittels PCR generiert. Die Primer unterscheiden sich jedoch in ihrem Aufbau von Primern, die für konventionelle, restriktionsbasierte Klonierungsstrategien verwendet

werden. SLIC-Primer kodieren nicht für eine Restriktionsschnittstelle, sondern weisen vielmehr am 5'-Ende 20 Basen auf, die homolog zu dem Bereich im Vektor sind, der die MCS flankiert. Nach einer anschließenden Behandlung mit T4-Polymerase nach dem gleichen Protokoll wie für den Vektor, kann das Insert mit diesem gemischt und in Bakterien transformiert werden. Innerhalb der Bakterienzelle erfolgt über die vektorhomologen Sequenzen die homologe Rekombination und das Insert wird ligationsunabhängig in den Vektor integriert. Getestet wurde diese Strategie an den vier verschiedene Inserts $\text{miR}^{\text{Kontr.}}$, $\text{miR}^{\text{Grb10}}$, $\text{miR}^{\text{Raf-1}}$ und miR^{BRAF} . Alle gepickten Klone erwiesen sich als positiv. Dies ist ein Hinweis darauf, dass mit dieser Methode Subklonierungen ganzer miR^{TOI} -Bibliotheken ohne große Verluste hinsichtlich der Komplexität möglich wären.

4 Diskussion

4.1 Identifikation potentieller Targetproteine für die CML-Therapie

Die chronische myeloische Leukämie wird standardmäßig mit dem BCR-ABL-Inhibitor Imatinib behandelt. Der Großteil der Patienten spricht hervorragend auf die Therapie mit diesem Medikament an, dennoch ist die Therapie wahrscheinlich nicht kurativ. Daher müssen die Patienten möglicherweise lebenslang therapiert werden. Eine Erklärung hierfür ist, dass durch Imatinib lediglich leukämische Progenitorzellen und ausgereifte Leukämiezellen eradiziert werden, während die leukämische Stammzelle, unter anderem geschützt durch Stromazellen in der Knochenmarknische über Jahre überleben kann^{119,120}. Dieser Verbleib leukämischer Zellen im Knochenmark birgt die Gefahr der Resistenzentwicklung. Es wurden verschiedene Arten der Imatinib-Resistenzentwicklung beschrieben. Die bekannteste Ursache von erworbenen Resistenzen gegen Imatinib ist die Reaktivierung des BCR-ABL-abhängigen Signalwegs, bedingt durch Punktmutationen im Bereich der Kinase-region, wodurch die Bindung von Imatinib in die ATP-Bindungstasche blockiert oder die Bindungsfähigkeit zumindest herabgesetzt wird^{75,121-128}. Außerdem kann eine Amplifikation des BCR-ABL-Gens, einhergehend mit einer Überexpression des BCR-ABL-Onkogens, ebenfalls gelegentlich zu Resistenzen führen¹²⁹. Neben den genannten gibt es weitere Hinweise für die Bedeutung zusätzlicher Mechanismen, die zu einer Resistenz gegenüber Imatinib beitragen könnten, darunter die Aktivierung alternativer Signalwege, die erhöhte Bindung von Imatinib an Plasmaproteine¹³⁰, sowie die membranständige Expression von Transportproteinen, die durch einen gesteigerten Efflux oder verminderten Influx von Imatinib zu einer Verminderung der intrazellulären Imatinibkonzentration führen¹³¹⁻¹³³.

Ein möglicher Ansatz zur kompletten Eradikation des leukämischen Zellklons stellt die kombinatorische Inhibition von BCR-ABL und zusätzlich einem für die Signalvermittlung von BCR-ABL essentiellen Protein dar. Für diverse Inhibitoren, die an verschiedenen Punkten in der Signalweiterleitung der Ras-, MEK/ERK-, PI3-K/AKT-, oder mTOR-Kaskade eingreifen, wurde ein synergistischer oder zumindest additiver Effekt mit Imatinib auf die BCR-ABL-abhängige Transformationsfähigkeit *in vitro* nachgewiesen¹³⁴⁻¹³⁷. Die Validierung dieser Effekte in einem geeigneten *in vivo* Modell ist jedoch notwendig und war in der Vergangenheit nur unter Verwendung von Inhibitoren oder teilweise schwer zugänglicher *Knockout*-Mausmodelle möglich.

Mittels der *Knockout*-Modelle konnte gezeigt werden, dass die Deletion von p53¹¹¹, PTEN¹³⁸ oder p62dok¹³⁹ im Knochenmark die Transformationsfähigkeit BCR-ABL-positiver Zellen verstärkt, während die Deletion von Arf¹⁴⁰, SHIP¹³⁴ oder Gab2³⁰ zu einer Verlängerung der Latenz im murinen CML-Modell führt. Die Deletion von Genen kann jedoch gravierende Auswirkungen auf die Embryonalentwicklung haben. Von *knockout*-stieren, deren Phänotyp zu embryonaler oder früher postnataler Letalität führt, können keine Knochenmarkzellen gewonnen werden. In diesem Fall müssen aus den Embryonen fetale Leberzellen isoliert und anstatt der Knochenmarkzellen für das Transplantationsmodell verwendet werden. Durch Ausweichen auf fetale Leberzellen konnten unter anderem die Bedeutungen von Smo¹⁴¹, Jak2¹⁴² und C/EBP α ¹⁴³ für die BCR-ABL-abhängige Leukämogenese gezeigt werden.

Anstatt ein Protein auf genetischer Ebene auszuschalten, ist es auch möglich, einen Inhibitor für dieses Protein zu überexprimieren. Diese Methodik konnte bereits *in vitro* erfolgreich angewendet werden¹¹³. Um Einblicke in involvierte Signalkaskaden zu erlangen, ist es auch möglich, ein Protein in BCR-ABL-positiven Zellen anstatt zu deletieren, zu überexprimieren. Normalerweise werden Knochenmarkzellen in diesem Fall mit zwei verschiedenen Vektoren doppelt infiziert, ein Vektor kodierend für BCR-ABL und einen Fluoreszenzmarker wie z.B. GFP, der andere Vektor kodierend für das zu untersuchende Mediatorprotein zusammen mit einem anderen Fluoreszenzmarker, z.B. YFP. Die Zellen müssen bei diesem Versuchsaufbau jedoch zwangsläufig durchflusszytometrisch aufgereinigt werden, um eine reine Population doppelt infizierter Zellen zu erhalten. So konnte bereits gezeigt werden dass AHI-1-Expression die Tumorigenität von BCR-ABL *in vivo* erhöht¹⁴⁴. Kürzlich generierten Peng und Kollegen zudem einen retroviralen Vektor, der eine gleichzeitige Expression von

drei Proteinen ausgehend von einem einzigen Vektor gewährleistet. Sie exprimierten BCR-ABL, den Tumorsuppressor PTEN und GFP zusammen in einer Zelle und verwendeten den Vektor auch im Knochenmarktransduktion/-transplantationsmodell für die CML. Dort konnten sie darlegen, dass eine Überexpression von PTEN eine Verlängerung der Krankheitslatenz zur Folge hat¹⁴⁵.

Jede der zuvor aufgezeigten Methoden birgt gewisse Probleme. Die Generierung von *Knockout*-Mäusen ist kostspielig, zeitintensiv und teilweise aufgrund letaler Phänotypen manchmal schlichtweg nicht möglich. Im Falle der Überexpression eines Proteins muss stets bedacht werden, dass damit nicht nur ein Eingriff in die Signaltransduktion der Zelle, sondern zudem gravierende Nebeneffekte hervorgerufen werden können, da eine um Faktor 10-100 verstärkte Expression eines Proteins eine deviente Situation für die Zelle darstellt. Sollten shRNAs verwendet werden, so mussten in der Vergangenheit Zellen mit zwei Vektoren infiziert werden, da die Expression des Onkogens zusammen mit der targetspezifischen shRNA bislang nicht möglich war. Die Zellen mussten zwangsläufig durchflusszytometrisch auf doppelt infizierte Zellen sortiert werden. Handelt es sich bei dem supprimierten Protein um ein für die BCR-ABL-abhängige Transformation essentielles Protein, so dass die doppelt infizierten Zellen einen Überlebensnachteil hätten, würden selbst geringe Kontaminationen mit Zellen, die nur BCR-ABL exprimieren aber nicht das Target supprimieren, bei dem Knochenmarktransduktion/-transplantationsmodell schwerwiegende Folgen haben. Die BCR-ABL-positiven Zellen würden die doppelt infizierten Zellen überwachsen. Diese Vorgehensweise ist somit sehr aufwändig und anfällig und wurde bislang nur für stabile Zelllinien, jedoch nicht für das Knochenmarktransduktion/-transplantationsmodell beschrieben.

Mit einem Vektorsystem zur dualen Expression eines Onkogens und einer daran gekoppelten Expression der targetspezifischen shRNA wären die Probleme der Doppelinfektion und der aufwändigen Generierung von *Knockout*-Stämmen hinfällig, Nebeneffekte durch Inhibitoren wären vermeidbar. Die Zellen, sowohl Zelllinien als auch primäre Zellen, könnten mit einer einzigen retroviralen Infektion mit beiden Genen transduziert werden.

Im Jahre 2002, entdeckte die Gruppe um Cullen, dass durch Austausch der Stamm-schleife der endogen vorkommenden microRNA miR30 durch eine targetspezifische Stamm-schleife eine sehr potente und miR30-basierte shRNA generiert werden kann¹¹⁰. Im Gegensatz zu konventionellen shRNAs, die abhängig von relativ schwachen RNA Pol III-

Promotoren sind, können diese miR30-basierten shRNAs von starken RNA-Pol II-Promotoren angesteuert werden^{110,146-148}. Diese Eigenschaft macht die miR30-basierten shRNAs sehr viel effektiver und potenter als konventionelle shRNAs, insbesondere für *in vivo* Applikationen^{109,147,149}.

In dem in dieser Arbeit etablierten retroviralen Vektorsystem wurde eine solche miR30-basierte shRNA mit der Expression des Onkogens BCR-ABL auf einem einzigen Vektor kombiniert. Sowohl die Onkogen-Expression als auch die targetspezifische miR (miR^{TOI}) wird über den sehr starken LTR-Promotor reguliert. Die Transkription durch die RNA Pol II führt zur Bildung eines gemeinsamen Transkripts, das sich über das Onkogen, die miR^{TOI} und GFP erstreckt (Abb. 3.9). Somit wird die Expression der miR^{TOI} direkt an die des Onkogens gekoppelt. Eine stabile Suppression des Targetproteins kann somit in jeder onkogenexprimierenden Zelle gewährleistet werden. Bisherige polycistronische Vektoren basierten auf konventionellen shRNAs unter H1 oder U6 Promotorkontrolle und einem unabhängig davon exprimierten Transgen^{150,151}. Da in dem hier beschriebenen System sowohl das Onkogen als auch die miR^{TOI} ihren Ursprung in einem einzigen gemeinsamen Transkript haben, ist eine Selektion der transduzierten Zelle, mit dem Resultat, dass nur das Onkogen oder nur die miR^{TOI} gebildet wird, ausgeschlossen. In Untersuchungen zur Funktionalität des Vektors am Beispiel von BCR-ABL als Onkogen und Raf-1 als Zielstruktur für die miR^{TOI} konnte gezeigt werden, dass von diesem Vektor ausgehend sowohl das Onkogen hoch exprimiert als auch das Target um mehr als 90 % supprimiert wird (Abb. 3.10). Die Suppression von Raf-1 war sogar ausreichend, um die Aktivierung des kanonischen MAPK/ERK-Signalweges zu reduzieren (Abb. 3.11). Außerdem war auch nach längerfristiger Kultivierung unter Selektionsdruck keine reaktivierte Expression von Raf-1 festzustellen, weder in Zelllinien (Abb. 3.12) noch in retroviral infizierten primären Knochenmarkzellen der Maus (Abb. 3.24). Diese Charakteristika erlauben die Anwendung dieses Vektorsystems für die Untersuchung onkogener Signalkaskaden. Die Suppression essentieller Proteine solcher onkogenabhängigen Überlebenskaskaden führt normalerweise zu einer starken Negativselektion, durch das Vektordesign ist die Zelle jedoch gezwungen, die miR^{TOI} zu exprimieren.

Mit dem in dieser Arbeit etablierten Vektorsystem kann die Transduktion der miR^{TOI} zusammen mit dem Transgen in nur einem einzigen Schritt erfolgen. Mit der Kombination beider Gene auf einem einzigen Konstrukt werden für den Gentransfer auch Zellen zugäng-

lich, die schlecht transfizierbar sind, wie zum Beispiel embryonale und hämatopoetische Stammzellen oder auch andere primäre Zellen, die nur kurzzeitig *ex vivo* kultivierbar sind.

4.2 Die Bedeutung von Raf-1 für die BCR-ABL-abhängige Leukämogenese

Dass Raf-1 für die Signalvermittlung von BCR-ABL eine wichtige Rolle spielt, konnte in der Vergangenheit bereits gezeigt werden. Die Relevanz von Raf-1 für die Transformationsfähigkeit BCR-ABL-positiver Zellen wurde jedoch bislang nur *in vitro* mittels Transfektion von Raf-1-spezifischen *antisense*-Oligonukleotiden oder dominant negativer Raf-1-Mutanten nachgewiesen¹⁵². Die Situation *in vivo* konnte aber mit dieser Technik nicht überprüft werden. Da außerdem die Raf-1 *Knockout*-Maus einen Phänotyp embryonaler Letalität aufweist⁴², steht kein Raf-1-defizientes Knochenmark für Untersuchungen *in vivo* in Transplantationsexperimenten zur Verfügung. Die Verwendung des in dieser Arbeit etablierten Vektorsystems stellt somit die einzige Möglichkeit dar, *in vivo* die Bedeutung von Raf-1 für die BCR-ABL-vermittelte Transformation zu überprüfen.

Zunächst wurde unter Zuhilfenahme dieses Vektorsystems in 32D- und Ba/F3-Zellen dargestellt, dass das Konstrukt zur dualen Expression von BCR-ABL und der miR^{Raf-1} funktionell ist und in jeder Zelle, die BCR-ABL exprimiert, gleichzeitig Raf-1 stabil mit einer Effizienz von mehr als 90 % herunterreguliert wird (Abb. 3.10 und Abb. 3.11).

Die Suppression von Raf-1 in BCR-ABL-positiven Zellen ging außerdem mit einer Reduktion der ERK-Phosphorylierung korrelierend mit dessen Aktivität einher (Abb. 3.11). Raf-1 ist somit erforderlich für die Aktivierung des promitogenen MAPK/ERK-Signalweges in Abhängigkeit von BCR-ABL. Wie bereits in vielen Studien gezeigt wurde, ist die MAPK/ERK-Kaskade wiederum maßgeblich an der Weiterleitung der BCR-ABL-abhängigen, onkogenen Signale für Proliferation und Antiapoptose beteiligt. Durch die MAPK/ERK-Kaskade wird unter anderem die Transkription von Survivin und Cyclin B1 durch den Transkriptionsfaktor c-myc bzw. c-Myb reguliert^{33,34}. Eine weitere Funktion kommt der MAPK/ERK-Kaskade in der Regulierung der Apoptose zu. So führt eine aktivierte MAPK/ERK-Kaskade unter anderem zur Phosphorylierung und damit einhergehenden Inaktivierung der antiapoptotischen Proteine Bad an Ser112¹⁵³ und Bim an Ser69^{154,155}.

In primären murinen Knochenmarkzellen führte die Suppression des Raf-1-Proteins unter Verwendung des Vektorsystems zu einer Reduktion der Transformationseffizienz im Methylzellulose-Assay (Abb. 3.15). Die Suppression von BRAF, einem weiteren Mitglied der Raf-Familie, in diesem Versuchsansatz hatte jedoch keinen Einfluss auf die Transformationsfähigkeit. Die Zellen bildeten ähnlich viele Kolonien aus wie die Kontrollzellen (Abb. 3.17). Dieses Ergebnis war überraschend, da auch BRAF in der Literatur eine Bedeutung für die BCR-ABL-abhängige Transformation zugeschrieben wird^{113,156}. Bislang wurden jedoch ausschließlich indirekte Versuchsansätze angewendet, BRAF wurde nie direkt herunterreguliert oder deletiert. Vielmehr griffen die Gruppen auf einen Inhibitor von BRAF zurück, SPA-1. SPA-1 gehört zur Gruppe der *GTPase activating proteins* (GAP)¹⁵⁷ und ist ein spezifischer Inhibitor für Rap1. Rap1, ein Mitglied der Ras-GTPase-Familie, wiederum ist ein Aktivator von BRAF, vergleichbar mit der Funktion von Ras für Raf-1. So zeigten Jin und Kollegen die Bedeutung von BRAF für die BCR-ABL-vermittelte Transformation indirekt durch artifizielle Überexpression von SPA-1 in Zelllinien wie Ton.B210 und K562¹¹³. Das hierdurch gehemmte Rap1 ist jedoch nicht ausschließlich ein Aktivator von BRAF¹⁵⁸, sondern gleichzeitig auch von Akt^{159,160}. Die von Jin und Kollegen beobachteten Effekte könnten somit auf die SPA-1-vermittelte Inhibition von Akt und nicht von BRAF zurückzuführen sein. Die Gruppe um Kometani hingegen verwendete BCR-ABL-transduzierte SPA-1 *Knockout*-Zellen in einem Knochenmarktransplantationsmodell und konnte in diesem Modell eine Akzeleration der Erkrankung durch SPA-1-Deletion beobachten¹⁵⁶. In SPA-1^{+/+}-Knochenmarkzellen ist normalerweise die Aktivität von Rap1 und somit BRAF unterdrückt, die Deletion von SPA-1 induziert also eine aberrierende BRAF-Aktivität. Auch weisen SPA-1^{-/-}-Mäuse per se eine erhöhte Neigung zur Entwicklung von Leukämien auf. Daher ist es nicht überraschend, dass die artifizielle Aktivierung von BRAF in BCR-ABL-positiven Zellen durch SPA-1-Deletion zu einer Akzeleration der Erkrankung führt. Rückschlüsse auf die Bedeutung von BRAF für die BCR-ABL-abhängige Leukämogenese dürfen daher nicht aufgrund dieser Beobachtungen gezogen werden.

Die Raf-1-Suppression führte im murinen CML-Modell zu einer signifikanten Verlängerung der Krankheitslatenz, einhergehend mit einer verlangsamten Entwicklung einer Leukozytose und Splenomegalie. Außerdem war die Raf-1-spezifische Suppression und gleichzeitige BCR-ABL-Expression dauerhaft und stabil über mehrere Wochen. Die Ergebnisse der Transformationsversuche *in vitro*, in denen die Suppression von Raf-1 den

inhibitorischen Effekt von Imatinib verstärkt, gibt Hinweise auf einen möglichen neuen Therapienansatz der chronischen myeloischen Leukämie bei dem ein BCR-ABL-Inhibitor mit einem Raf-1-Inhibitor kombiniert werden könnte.

Die Suppression des Tumorsuppressors p53 hingegen führte zu einer leichten Akzeleration der Erkrankung. Diese Beobachtung ist im Einklang mit vorherigen Studien, in denen *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden konnte, dass eine Depletion von p53 zur Tumorigenität des BCR-ABL-Onkogens maßgeblich beiträgt¹¹¹. Der Verlust von p53 in CML-Patienten würde somit zu einer Verschlechterung des Gesundheitszustandes beitragen.

4.3 Das Adapterprotein Grb10 und BCR-ABL

Im Hefe-Zweihybrid-System und in Koimmunopräzipitations-Experimenten konnten Bai und Kollegen bereits erfolgreich demonstrieren, dass Grb10 direkt an die onkogene Tyrosinkinase BCR-ABL bindet⁶⁷. Eine Mutante von BCR-ABL, die unvernünftig ist, Grb10 zu binden, führte in Ba/F3-Zellen zu einer Verzögerung der Transformation. Interessanterweise wird Grb10 in Ba/F3-Zellen aber nur sehr schwach exprimiert. Untersuchungen mittels qRT-PCR zeigten Expressionsmengen knapp über der Nachweisgrenze, während Grb10 in murinen Knochenmarkzellen um Faktor 30 stärker exprimiert wurde (Daten nicht gezeigt). Inwieweit die Beobachtungen von Bai und Kollegen spezifisch für Grb10 sind, bleibt somit ungeklärt. Dennoch gibt die Interaktion von Grb10 mit BCR-ABL Grund zu der Vermutung, dass Grb10 eine Rolle für die onkogene Vermittlung der Signale für Transformation, Proliferation oder Antiapoptose spielen könnte.

Basierend auf den Ergebnissen von Bai und Kollegen sollte in dieser Arbeit die Bedeutung von Grb10 für die BCR-ABL-abhängige Transformation in einem biologisch relevanten System untersucht werden. Hierfür wurden zwei verschiedene Grb10-spezifische miR-Sequenzen aus der Sammlung von G. Hannon und S. Elledge über Openbiosystems bezogen und in den pLMP-Vektor kloniert. Nur eine der beiden Sequenzen wies eine zufrieden stellende Suppressionseffizienz spezifisch für Grb10 auf. Diese miR^{Grb10} wurde zusammen mit BCR-ABL in einen Vektor kloniert und die Funktionalität in verschiedenen Zelllinien und primären murinen Knochenmarkzellen getestet (Abb. 3.26). Auch in Kombination mit dem Onkogen auf einem Transkript wies die miR^{Grb10} eine Suppressionseffizienz von mehr als 90 % auf Proteinebene auf. Demnach bedeutet die kombinatorische Expression keinen

Verlust der miR^{Grb10}-Funktionalität. Die Suppression von Grb10 in BCR-ABL-positiven primären murinen Knochenmarkzellen ging mit einer deutlichen Reduktion der Transformationsfähigkeit im Methylzellulose-Assay einher. Eine Verringerung der Transformationskapazität war auch *in vivo* zu beobachten. Die Transplantation retroviral infizierter, BCR-ABL-positiver Knochenmarkzellen in syngene Balb/C-Mäuse induzierte eine myeloproliferative, CML-ähnliche Erkrankung innerhalb weniger Tage. Interessanterweise führte die Grb10-Suppression zu einer deutlichen Verlängerung der Latenz. Dies spiegelte sich sowohl in der Entwicklung der Leukozytose als auch im Gesamtüberleben wider.

Das Adapterprotein Grb10 wurde 1995 erstmalig kloniert und gehört zusammen mit Grb7¹⁶¹ und Grb14¹⁶² zur Familie der Grb7/10/14-Adapterproteine¹⁶³. Grb10 wurde ursprünglich als Interaktionspartner von *epidermal growth factor receptor* (EGFR) identifiziert¹⁶³, ist jedoch auch befähigt, mit einer Vielzahl verschiedener, anderer Rezeptortyrosinkinasen zu interagieren. Hierzu zählen neben dem Ret-Rezeptor¹⁶⁴ auch der Insulin-Rezeptor (IR)^{165,166}, der *Insulin-like growth factor receptor* (IGF-IR)¹⁶⁷⁻¹⁷⁰ und der *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR)¹⁷¹. Auch können andere Signalmediatoren Grb10 binden, die nicht zu den Rezeptor-Tyrosinkinasen zählen, z. B. ELK¹⁷², Jak2¹⁷³, die onkogene Tyrosinkinase BCR-ABL⁶⁷, MEK, Raf-1⁶⁵, AKT und c-Kit⁵³, die regulatorische Untereinheit von PI3-K p85¹⁷⁴ oder auch die Ubiquitin-Ligase Nedd4¹⁷⁵.

Besonders interessant ist die direkte Interaktion von Grb10 mit AKT^{53,54}. Im Zusammenhang mit der Tatsache, dass konstitutiv an der Membran lokalisiertes Grb10 zu einer verstärkten AKT-Phosphorylierung und dessen Lokalisierung an der Membran führt, deutet es darauf hin, dass Grb10 die Translokation von AKT an die Plasmamembran begünstigt und dadurch dessen Phosphorylierung durch PDK1 und PDK2 verstärkt¹⁷⁶.

Kebache und Kollegen legten wiederum dar, dass Grb10 zusammen mit Raf-1 die Bad-abhängige Apoptose reguliert. Der Komplex bestehend aus Grb10 und Raf-1 kann durch Aktivierung der MAPK/ERK- und der PI3-K/AKT-Kaskade die Phosphorylierung und die damit einhergehende Inaktivierung des proapoptotischen Proteins Bad induzieren³⁵. Diese Funktion von Grb10 und Raf-1 konnte jedoch nur mittels Überexpression von Bad veranschaulicht werden.

Die Rolle von Grb10 in der insulinabhängigen Signalweiterleitung wird kontrovers diskutiert. Zum einen konnte gezeigt werden, dass Grb10 die Bindung von Insulin-Rezeptor-

Substrat 1 (IRS-1) an den Insulin-Rezeptor und somit dessen Aktivierung blockiert¹⁷⁷. IRS-1 wiederum ist ein Aktivator der PI3-K und in der Konsequenz ein Stimulator der PI3-K/AKT-Kaskade. Außerdem resultiert eine Überexpression von hGrb10 in einer Inhibition der Insulin-Rezeptor-vermittelten MAPK/ERK-Aktivierung in IR-überexprimierenden chinesischen Hamster Ovarien-Zellen (CHO)¹⁷⁸. Zum anderen wurde Grb10 jedoch eine stimulierende Funktion bei der insulinabhängigen AKT-Aktivierung zugeschrieben. So zeigten Deng und Kollegen, dass die Überexpression von murinem Grb10 in L6-Zellen oder 3T3-L1-Adipozyten die metabolische und enzymatische Insulinantwort induziert¹⁷⁴. Diese Aktivierung von PI3-K/AKT wird durch direkte Bindung zwischen Grb10 und der p85-Untereinheit von PI3-K hervorgerufen.

Eine mögliche Erklärung für die beobachteten Diskrepanzen in den Effekten, die Grb10 auf die Insulinaktivität hat, wären unterschiedliche Funktionen von Grb10 in der Zelle, abhängig von der exakten Balance zwischen Grb10 und seinem jeweiligen Mediatorprotein. Somit könnte, beeinflusst vom jeweiligen Experimentaufbau und Zellkontext, Grb10 entweder aktivierenden oder supprimierenden Einfluss auf die insulinabhängigen Signalkaskaden ausüben. Möglicherweise trägt auch die Lokalisierung von Grb10 innerhalb der Zelle zu seiner Funktion bei. In COS-1-Zellen konnte gezeigt werden, dass endogenes Grb10 am Mitochondrium lokalisiert ist und dort mit endogenem Raf-1 interagiert. Wird Grb10 in COS-1-Zellen überexprimiert, transloziert es jedoch ins Zytoplasma⁶⁵. Diese Misslokalisierung von Grb10 könnte aberrierende Signale regulieren, die bei physiologischer Lokalisierung nicht beeinflusst sind.

Wenn die Expressionsstärke und/oder die Lokalisation innerhalb der Zelle einen derartig starken Einfluss auf die Funktionsweise eines Proteins ausübt, wie es bei Grb10 der Fall zu sein scheint, so dass verschiedene Signalkaskaden beeinflusst werden, und sogar abhängig vom jeweiligen Zellkontext eine Kaskade entweder aktiviert oder inhibiert werden kann, muss große Sorgfalt bei der Wahl des Systems gewährt werden. Von der Verwendung von Zellsystemen, wie sie in den angegebenen Studien verwendet wurden, bei denen ein oder mehrere Proteine stark überexprimiert werden, sollte bei einem sensiblen Vorhaben abgesehen werden, da es sich hierbei um vergleichsweise artifiziellen Systeme handelt.

Dass Grb10 für die BCR-ABL-abhängige Transformation primärer Knochenmarkszellen erforderlich ist, konnte gezeigt werden. Welche von Grb10 beeinflusste Signalkaskade

schlussendlich für diese Tatsache verantwortlich ist, oder ob es sich um ein Zusammenspiel mehrerer Kaskaden handelt, bleibt zu untersuchen.

4.4 SLIC Klonierung zum vereinfachten Austausch der miR^{TOI}

Die Vektorkonstruktion mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen ist eine gängige molekularbiologische Methode und beinhaltet typischerweise die Ligation eines restriktionsverdauten Donorfragmentes (Insert) in ein reziprok verdautes Empfängerfragment (Vektor)¹⁷⁹, wobei das Insert zumeist mittels PCR generiert wird¹⁸⁰⁻¹⁸². Trotz der großen Vielzahl erhältlicher Restriktionsenzyme sind in jedem Projekt nur einige wenige tatsächlich verwendbar, da ideale Klonierungsstrategien auf der Verwendung nur einmalig vorkommender Konsensussequenzen basieren. Je größer jedoch die Anzahl oder die Größe des/der Inserts ist, desto komplexer muss die Klonierungsstrategie ausfallen, da mit jeder Base, die zusätzlich in den Vektor eingebracht wird, auch die Wahrscheinlichkeit steigt, dass ungewollt eine weitere Konsensussequenz entsteht. In dem Fall, dass nur ein Restriktionsenzym für die Klonierungsstrategie zur Verfügung steht, kann das Insert nicht gerichtet in der korrekten Orientierung eingefügt werden und es müssen mehrere Klone auf korrekte Integration hin überprüft werden.

Die Klonierung eines so großen und komplexen Vektors wie pMmiR^{TOI}-BCR-ABL ist mit einer Vielzahl potentieller Probleme assoziiert und die Klonierung der miR^{TOI} in den BCR-ABL-kodierenden, retroviralen Vektor pM-BCR-ABL gelingt zumeist nicht auf Anhieb. Ein Grund hierfür könnte in der Sequenz des BCR-ABL-Onkogens liegen. BCR-ABL weist Bereiche mit hohem GC-Anteil auf. Die Bindung zwischen Guanin und Cytosin ist thermodynamisch deutlich stabiler als die Bindung zwischen Adenin und Thymin. es kommt zur Bildung von stabilen Sekundärstrukturen, die wiederum die PCR-Reaktion¹⁸³ behindern und möglicherweise auch die Ligation des Inserts in den Vektor. Somit sind Klonierungen von Sequenzabschnitten mit hohem GC-Anteil stark anfällig für Fehler. Eine Reduktion unspezifischer Nebenprodukte und gleichzeitige Erhöhung der Ausbeute an PCR-Produkt konnte durch Modifikation der Reaktionsbedingungen^{184,185} oder Zusatz verschiedener Substanzen zum Reaktionsansatz^{183,186,187} erreicht werden. Zu den gängigsten Zusätzen hierbei zählt Dimethylsulfoxid (DMSO)¹⁸⁸⁻¹⁹⁰.

Neben BCR-ABL weist auch das zweite Insert, die miR^{TOI}, eine ausgeprägte Sekundärstruktur auf, nicht nur aufgrund der Haarnadelschleife des targetspezifischen Bereiches, sondern außerdem wegen der die Haarnadelstruktur flankierenden, palindromischen Nukleotid-Sequenzen. Schließlich ist die miR^{TOI}-Kassette mit einer Größe von etwa 350 Basenpaaren verhältnismäßig klein im Vergleich zur Zielstruktur, dem pM-BCR-ABL-Vektor mit etwa 12.000 Basenpaaren. Ein optimales molares Verhältnis von Insert zu Vektor bei diesen Größenunterschieden zu erreichen, ist dadurch stark erschwert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine sequenz- und ligationsunabhängige Klonierungsstrategie entwickelt, um einen schnellen Austausch der miR^{TOI} zu ermöglichen. Diese Methode erfordert lediglich eine beliebige, im Vektor universell vorkommende Restriktionsschnittstelle, das Insert hingegen muss nicht restriktionsverdaut werden. Vielmehr basiert diese Technik auf einer Imitation der homologen Rekombination *in vitro*. Hierzu wird ein Insert durch PCR unter Verwendung spezieller Primer generiert. Diese Primer bestehen aus einer chimären Sequenz, für den Vorwärtsprimer sind hierbei 20 Basenpaare am 5'-Ende homolog zur Vektorsequenz, die sich an 3' an die Restriktionsschnittstelle anschließt, die verbleibenden 20 Basenpaare des 3'-Abschnittes des Primers sind homolog zum 5' Ende des Inserts. Der Rückwärtsprimer ist auf gleiche Weise aufgebaut, sodass durch die Amplifikation ein PCR-Produkt mit flankierender Homologie zum Vektor an beiden Enden entsteht.

Die homologe Rekombination kann nur stattfinden, wenn an Vektor und Insert 5'-Überhänge vorliegen. Für die Generierung der Überhänge bietet sich eine Polymerase mit 3'-5'-Exonukleaseaktivität an. In dieser Arbeit wurde gemäß dem Protokoll von Li und Kollegen die T4 DNA-Polymerase verwendet¹¹⁸. In Abwesenheit von dNTPs kann dieses Enzym lediglich seine Exonuklease-, nicht jedoch seine Polymeraseaktivität ausüben. Die Reaktion kann durch Zugabe eines Desoxyribonukleosidtriphosphates abgestoppt werden, da damit ein Gleichgewicht zwischen den konkurrierenden Reaktionen entsteht. Anschließend werden Insert und Vektor gemischt, so dass die komplementären einzelsträngigen Bereiche des Vektors und des Inserts miteinander hybridisieren können. Nach der Transformation in Bakterien werden die Einzelstrangbrüche im Plasmid schließlich repariert. Die Methode bietet mehrere Vorteile gegenüber der konventionellen Methode mittels Restriktionseendonukleasen. Aufgrund des Primerdesigns kann das Insert nur in der gewünschten Orientierung in den Zielvektor eingebracht werden. Außerdem kann keine Religation des Vektors erfolgen, da die Klonierung in Abwesenheit des Enzyms Ligase durchgeführt wird.

Mithilfe dieses Protokolls könnten ganze miR^{TOI}-Bibliotheken in den Vektor subkloniert werden und somit eine breite Vielfalt verschiedener Proteine hinsichtlich ihrer Funktion für die BCR-ABL-abhängige Transformation untersucht werden. Dies würde dazu beitragen, die kritischen Mediatoren in der BCR-ABL-Signalgebung zu identifizieren.

4.5 Anwendungsmöglichkeiten des neuartigen Vektorsystems

Prinzipiell kann in dem in dieser Arbeit etablierten Vektorsystem jedes beliebige Target mit einer miR herunterreguliert werden und BCR-ABL durch jedes beliebige andere krankheitsinduzierende Onkogen ersetzt werden. So ließen sich auch Signaltransduktionswege anderer, in Patienten nachgewiesener, leukämieverursachender Onkogene untersuchen. Denkbar wäre zukünftig eine Übertragung des Systems auf Modellsysteme solider Tumore. Der vereinfachte Austausch der miR^{TOI} durch die in dieser Arbeit etablierte SLIC-Klonierungsstrategie könnte die breit gefächerte Untersuchung ganzer miR^{TOI}-Bibliotheken und somit genomweite *unbiased* Screens ermöglichen.

Das System ist jedoch nicht beschränkt auf die Analyse von Onkogenen. Beispielsweise kann mithilfe des Vektors ein Protein herunterreguliert und gleichzeitig eine mutierte Form des Proteins exprimiert werden und somit ein Genaustausch simuliert werden.

Die Technik zur Generierung transgener Mäuse bietet eine weitere Anwendungsmöglichkeit. So könnte eine transgene Maus generiert werden, die jedoch eine *Knock-in*-Maus simuliert, indem das endogene Gen stillgelegt und gleichzeitig das körperfremde Gen exprimiert wird. Hierfür wäre lediglich eine Modifikation des Plasmids nötig, bei der die retroviralen Komponenten durch Komponenten ausgetauscht werden, die für die Rekombination ins Genom erforderlich sind. Auch ist es denkbar, den LTR-Promotor durch einen anderen RNA Pol II-Promotor zu ersetzen. Hierbei wären insbesondere zelltypspezifische oder induzierbare Promotoren interessant. Zelltypspezifische Promotoren würden den Vektor nur im gewünschten Zellsystem ansteuern¹⁹¹. Mittels Tetracyclin-¹⁹²⁻¹⁹⁴ oder Ecdyson-¹⁹⁵ induzierbarer Promotoren könnte die Transgen-Expression mit gleichzeitiger Target-Suppression gezielt an- oder ausgeschaltet werden, bzw. ein Gen-Switch von dem wildtyp zum mutierten Protein induziert werden.

5 Material

5.1 Chemikalien und biogene Substanzen

2-Mercaptoethanol	<i>Merck, Darmstadt</i>
5-Fluorouracil	<i>Medac, Wedel</i>
Acrylamid/Bisacrylamid Gel 30	<i>Carl Roth, Karlsruhe</i>
Agarose	<i>Carl Roth, Karlsruhe</i>
Ammoniumchlorid	<i>Merck, Darmstadt</i>
Ammoniumhydrogencarbonat	<i>Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen</i>
Ammoniumpersulfat (APS)	<i>Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen</i>
Ampicillin	<i>Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen</i>
Aqua ad injectabilia, steril	<i>B. Braun, Melsungen</i>
Bacto™ Agar	<i>BD Biosciences, Heidelberg</i>
Bacto™ Hefeextrakt	<i>BD Biosciences, Heidelberg</i>
Bacto™ Trypton	<i>BD Biosciences, Heidelberg</i>
Bromphenolblau	<i>Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen</i>
BSA, Fraktion V	<i>Carl Roth, Karlsruhe</i>
Complete Mini Protease Inhibitor Tabletten	<i>Roche Diagnostics, Mannheim</i>
Chloroform	<i>Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen</i>
Dimethylsulfoxid (DMSO)	<i>Carl Roth, Karlsruhe</i>
Dinatriumhydrogenphosphat	<i>Carl Roth, Karlsruhe</i>
Dithiothreitol (DTT)	<i>Promega, Heidelberg</i>
dNTP Mix, 10 mM	<i>Fermentas, St. Leon-Rot</i>
Essigsäure	<i>Carl Roth, Karlsruhe</i>

Ethanol	<i>Merck, Darmstadt</i>
Ethidiumbromid	<i>Carl Roth, Karlsruhe</i>
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	<i>Fluka, Deisenhofen</i>
Formaldehyd, 37 %-ig	<i>Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen</i>
Glycerol	<i>Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen</i>
Glycerol-2-phosphat	<i>Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen</i>
Isopropanol	<i>Carl Roth, Karlsruhe</i>
Kaliumchlorid	<i>Fluka, Deisenhofen</i>
Kaliumhydrogencarbonat	<i>Merck, Darmstadt</i>
Magnesiumchlorid	<i>Fluka, Deisenhofen</i>
Methanol	<i>Merck, Darmstadt</i>
Natriumacetat	<i>Merck, Darmstadt</i>
Natriumazid	<i>Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen</i>
Natriumchlorid	<i>Carl Roth, Karlsruhe</i>
Natriumdodecylsulfat (SDS)	<i>Serva Elctrophoresis, Heidelberg</i>
Natriumdihydrogenphosphat	<i>Merck, Darmstadt</i>
Natriumfluorid	<i>Fluka, Deisenhofen</i>
Natriumhydroxid	<i>Merck, Darmstadt</i>
Natriumorthovanadat	<i>Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen</i>
Natriumpyrophosphat	<i>Fluka, Deisenhofen</i>
Phosphat buffered saline (PBS), 10-fach, fest	<i>Biochrom AG, Berlin</i>
Propidiumiodid	<i>Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen</i>
Rotiphorese® Gel 30	<i>Carl Roth, Karlsruhe</i>
Salzsäure	<i>Merck, Darmstadt</i>
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	<i>Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen</i>
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	<i>Carl Roth, Karlsruhe</i>
Trockenmilchpulver	<i>Fluka-Chemie, Deisenhofen</i>
Tween 20	<i>Fluka-Chemie, Deisenhofen</i>

5.2 Medien und Supplemente

2-Mercaptoethanol	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
Amaya® Nucleofector® Kits	<i>Lonza Cologne, Köln</i>
Dimethylsulfoxid	<i>Carl Roth, Karlsruhe</i>
Diphtherietoxin	<i>Calbiochem, La Jolla, CA, USA</i>
Doxycycline	<i>Clontech, Palo Alto, CA, USA</i>
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	<i>PAA Laboratories, Cölbe</i>
Fetales Kälber-Serum Gold	<i>PAA Laboratories, Cölbe</i>
G418 Sulfat	<i>Calbiochem, Darmstadt</i>
Hank's Buffered Salt Solution	<i>PAA Laboratories, Cölbe</i>
Hygromycin B, 50mg/ml in PBS	<i>Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen</i>
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
L-Glutamin, 200 mM	<i>PAA Laboratories, Cölbe</i>
Lipofectamine 2000	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
Methocult® 3234	<i>STEMCELL Technologies, Köln</i>
Methocult® 3434	<i>STEMCELL Technologies, Köln</i>
Natriumhydrogencarbonat-Lösung 7,5 %	<i>Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen</i>
Opti-MEM® I Reduced Serum Media	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
Penicillin/Streptomycin Lösung	<i>PAA Laboratories, Cölbe</i>
Phosphat buffered saline (PBS), 10-fach, steril	<i>PAA Laboratories, Cölbe</i>
Polybrene (Hexadimethrinbromid)	<i>Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen</i>
Puromycin Dihydrochlorid	<i>Calbiochem, Darmstadt</i>
rekombinantes, murines Interleukin-3 (IL-3)	<i>R&D Systems, Wiesbaden</i>
rekombinantes, murines Interleukin-6 (IL-6)	<i>R&D Systems, Wiesbaden</i>
rekombinanter muriner Stammzellfaktor (SCF)	<i>R&D Systems, Wiesbaden</i>
RPMI-1640 Medium	<i>PAA Laboratories, Cölbe</i>
Trypanblau	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
Trypsin-EDTA-Lösung, 10-fach	<i>PAA Laboratories, Cölbe</i>

5.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase	<i>Fermentas, St. Leon-Rot</i>
Restriktionsendonukleasen	<i>Fermentas, St. Leon-Rot</i>
Pfu DNA-Polymerase	<i>Fermentas, St. Leon-Rot</i>
Taq DNA-Polymerase	<i>Fermentas, St. Leon-Rot</i>
T4 DNA-Polymerase	<i>Fermentas, St. Leon-Rot</i>
T4 DNA-Ligase	<i>Fermentas, St. Leon-Rot</i>

5.4 Membranen

PVDF Membran (Immobilon P)	<i>Millipore, Schwalbach</i>
----------------------------	------------------------------

5.5 Antikörper

E, <u>E</u> sel	K, <u>K</u> aninchen	M, <u>M</u> aus	R, <u>R</u> atte	Z, <u>Z</u> iege
α -Abl (8E9)		M		<i>BD-Pharmingen, Heidelberg</i>
α -Bad		K		<i>Cell Signaling, Frankfurt/Main</i>
α -BRAF (H-145)		K		<i>Santa Cruz, Heidelberg</i>
α - β -Aktin (AC-15)		M		<i>Sigma-Aldrich, Deisenhofen</i>
α -Akt1/2		K		<i>Santa Cruz, Heidelberg</i>
α -ERK, p44/p42 MAP Kinase		K		<i>Cell Signaling, Frankfurt/Main</i>
α -FRAP (H-266)		K		<i>Santa Cruz, Heidelberg</i>
α -Grb10 (K-20)		K		<i>Santa Cruz, Heidelberg</i>
α -Grb10 (A-18)		K		<i>Santa Cruz, Heidelberg</i>
α -GSK3 β (27C10)		K		<i>Cell Signaling, Frankfurt/Main</i>
α -I2PP2A (H-120)		K		<i>Santa Cruz, Heidelberg</i>
α -Lyn (H-6)		M		<i>Santa Cruz, Heidelberg</i>
α -Lyn (44)		K		<i>Santa Cruz, Heidelberg</i>
α -p53 (CM5)		M		<i>NovoCastra, Newcastle, UK</i>
α -PLC γ 1 (1249)		K		<i>Santa Cruz, Heidelberg</i>

α -PLC γ 2 (Q-20)	K	<i>Santa Cruz, Heidelberg</i>
α -Phospho-Akt (Ser473)	K	<i>Cell Signaling, Frankfurt/Main</i>
α -Phospho-Bad (Ser112) (7E11)	M	<i>Cell Signaling, Frankfurt/Main</i>
α -Phospho-Bad (Ser136) (185D10)	K	<i>Cell Signaling, Frankfurt/Main</i>
α -Phospho-Bad (Ser155)	K	<i>Cell Signaling, Frankfurt/Main</i>
α -Phospho-ERK (Thr202/Tyr204)	K	<i>Cell Signaling, Frankfurt/Main</i>
α -Phospho-GSK3 β (Ser 21/9)	K	<i>Cell Signaling, Frankfurt/Main</i>
α -Phospho-STAT5 A/B (18E5)	M	<i>Tom Wheeler, Hamilton, Neuseeland (Wheeler et al., 2001)</i>
α -Phospho-Tyrosin (4G10)	M	<i>Upstate Biotechnology, New York,</i>
α -Phospho-Tyrosin (pY20)	M	<i>PharMingen, San Diego, USA</i>
α -PTEN (A2B1)	M	<i>Santa Cruz, Heidelberg</i>
α -Raptor (N-19)	Z	<i>Santa Cruz, Heidelberg</i>
α -Raf-1 (C-12)	K	<i>Santa Cruz, Heidelberg</i>
α -Raf-1 (E-10)	M	<i>Santa Cruz, Heidelberg</i>
α -Rictor	K	<i>Cell Signaling, Frankfurt/Main</i>
α -STAT5 A/B (C-17)	K	<i>Santa Cruz, Heidelberg</i>
α -Maus CD11b (M1/70), Mac1, Integrin α M chain, PE-konjugiert	R	<i>BD-PharMingen, Heidelberg</i>
α -Maus CD45 (30-F11), LCA, Ly-5, PE-Cy5-konjugiert	R	<i>BD-PharMingen, Heidelberg</i>
α -Maus CD45/B220 (RA3-6B2), B220, PE-konjugiert	R	<i>BD-PharMingen, Heidelberg</i>
α -Maus CD90.2 (53-2.1), Thy-1.2, PE-konjugiert	R	<i>BD-PharMingen, Heidelberg</i>
α -Kaninchen IgG, HRP-konjugiert	E	<i>Amersham, Braunschweig</i>
α -Maus IgG, HRP-konjugiert	E	<i>Amersham, Braunschweig</i>

5.6 Verbrauchsmaterialien und molekularbiologische Kitsysteme

Cell Line Nucleofector® Kits	<i>Lonza Cologne, Köln</i>
CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTS)	<i>Promega, Mannheim</i>
CL-XPosure™ Film	<i>Thermo Scientific, Karlsruhe</i>
DC Protein Assay, Proteinbestimmungskit	<i>Bio-Rad, München</i>
NucleoSpin® Plasmid Kit	<i>Machery-Nagel, Düren</i>
NucleoSpin® Extract II Kit	<i>Machery-Nagel, Düren</i>
NucleoBond® Plasmid Maxi Kit	<i>Machery-Nagel, Düren</i>
Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix UDG	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
QIAshredder homogenizer Kit	<i>Qiagen, Hilden</i>
Rapid DNA Ligation Kit	<i>Fermentas, St. Leon-Rot</i>
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Kit	<i>Fermentas, St. Leon-Rot</i>
RNeasy Mini Kit	<i>Qiagen, Hilden</i>
SuperScript™ II Rnase H ⁻ Reverse Transcriptase	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
SuperSignal West Pico, Dura und Femto	<i>Perbio Science, Bonn</i>
Trizol® Reagent	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>

5.7 Molekulargewichtsmarker für DNA und Proteine

PageRuler™ Prestained Protein Ladder	<i>Fermentas, St. Leon-Rot</i>
GeneRuler™ 1kb Plus Ladder	<i>Fermentas, St. Leon-Rot</i>
GeneRuler™ 1kb Plus Ladder	<i>Fermentas, St. Leon-Rot</i>
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	<i>Fermentas, St. Leon-Rot</i>
GeneRuler™ Ladder Mix	<i>Fermentas, St. Leon-Rot</i>

5.8 Standard Geräte

ABI PRISM® 7700	<i>Applied Biosystems, Foster City, USA</i>
Agarosegel Elektrophoresekammer	<i>Biometra, Göttingen</i>

Analysenwaage BP 221S	<i>Satorius, Göttingen</i>
Binokular Stemi 2000-CS	<i>Zeiss, Jena</i>
Binokular-Lampe LL1500 LCD	<i>Zeiss, Jena</i>
CO2-Inkubator SW J 500 TV BB	<i>Nunc, Wiesbaden</i>
Digitalwaage LC 1200 S	<i>Satorius, Göttingen</i>
Durchflusszytometer (EPICS®XL)	<i>Beckman-Coulter, Krefeld</i>
Elisa Reader Sunrise™	<i>Tecan, Crailsheim</i>
Entwickler Optimax	<i>Protec, Oberstenfeld</i>
Incubator-Shaker Innova 4000	<i>New Brunswick Scientific, Edison, USA</i>
Incubator-Schüttler Certomat® BS-1	<i>B. Braun, Melsungen</i>
Kryo-Einfriergerät Mr. Frosti Nalgene	<i>Thermo Scientific, Karlsruhe</i>
Kühlzentrifuge J2-HS, Rotor JA-14	<i>Beckman, Fullerton, USA</i>
Kühlzentrifuge 5417R	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Lichtmikroskop Axiovert 40 CFL	<i>Zeiss, Jena</i>
Magnetrührgerät CB162	<i>Carl Stuart Limited, Dublin, Irland</i>
Mini Protean® Tetra Cell	<i>Bio-Rad, München</i>
Multi-Gel Long Elektrophoresekammer	<i>Biometra, Göttingen</i>
Neubauer-Zählkammer	<i>Reichert, New York, USA</i>
Nucleofector® Elektroporator	<i>Lonza Cologne, Köln</i>
PCR-Thermocycler Primus	<i>MWG-Biotech, Ebersberg</i>
pH-Meter inoLab®	<i>WTW, Weilheim</i>
Refrigerated Incubator-Shaker Innova	<i>New Brunswick Scientific, Edison, USA</i>
Schüttler WT 12	<i>Biometra, Göttingen</i>
Sterile Werkbank, Laminar-Flow 1.8	<i>Holten, Gydevang, Dänemark</i>
Stromgenerator PowerPac HC™, PowerPac 200, PowerPac 25	<i>Bio-Rad, München</i>
Sub-Cell® Model 192	<i>Bio-Rad, München</i>
TE Series Transphor Electrophoresis Unit	<i>Hoefer, Holliston, USA</i>
Tischzentrifuge 5415D	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Thermomixer comfort	<i>Eppendorf, Hamburg</i>

Ultra-Turrax T8	<i>IKA®-Werke, Staufen</i>
UV-Lampe TI 2	<i>Biometra, Göttingen</i>
UV Stratalinker 2400	<i>Stratagene, La Jolla, USA</i>
Vortex Mixer 7-2020	<i>neoLab, Heidelberg</i>
Wasserbad 1083	<i>GFL, Burgwedel</i>
Zentrifuge Megafuge R 1.0	<i>Thermo Scientific, Karlsruhe</i>

5.9 Oligonukleotide

Alle unten aufgelisteten Oligonukleotid-Sequenzen sind in 5'-3' Orientierung angegeben. Alle Oligonukleotide wurden bezogen von der Firma *Eurofins MWG Operon, Ebersberg*.

5.9.1 Oligonukleotide für miR Klonierung

Targetspezifische Sequenzen sind unterstrichen.

hGrb10 miR1

5'TGCTGTTGACAGTGAGCGGACACAGGATCATTAACAGCAATAGTGAAGCCACA
GATGTATTGCTGTTTAATGATCCTGTGGTGCCTACTGCCTCGGA3'

mBRAF miR1

5'TGCTGTTGACAGTGAGCGCAAGGGTGGAGATGAACTATAATAGTGAAGCCACA
GATGTATTATAGTTCATCTCCACCCTTATGCCTACTGCCTCGGA3'

mBRAF miR2

5'TGCTGTTGACAGTGAGCGCCCGGCCAGCTACCTTATTCAATAGTGAAGCCACA
GATGTATTGAATAAGGTAGCTGGCCGGTTGCCTACTGCCTCGGA3'

mp53 miR1

5'TGCTGTTGACAGTGAGCGCCCACTACAAGTACATGTGTAATAGTGAAGCCACA
GATGTATTACACATGTACTTGTAGTGGATGCCTACTGCCTCGGA3'

mPLCy1 miR1

5'TGCTGTTGACAGTGAGCGACACCGTCATGACTTTGTTCTATAGTGAAGCCACAG
ATGTATTAGAACAAGTCATGACGGTGCCTACTGCCTCGGA3'

mPLCy1 miR2

5'TGCTGTTGACAGTGAGCGCCCCGGGCTGAGGGAAAGATCAATAGTGAAGCCACA
GATGTATTGATCTTTCCCTCAGCCCGGATGCCTACTGCCTCGGA3'

mRaf-1 miR1

5'TGCTGTTGACAGTGAGCGCTGGTGGCTGACTGTGTGAAGATAGTGAAGCCACA
GATGTATCTTCACACAGTCAGCCACCAATGCCTACTGCCTCGGA3'

mRaf-1 miR2

5'TGCTGTTGACAGTGAGCGCTGCCGCTCTCTGATTGGAGATAGTGAAGCCACA
GATGTATCTCCAATCAGAGAGGCGGCATTGCCTACTGCCTCGGA3'

mRaf-1 miR3

5'TGCTGTTGACAGTGAGCGCAAGAAAGCCAGGAATACAGGTTAGTGAAGCCAC
AGATGTAACCTGTATTCTGGCTTTCTTATGCCTACTGCCTCGGA3'

mRaf-1 miR4

5'TGCTGTTGACAGTGAGCGACAGGAACACAAAGGTAAGAAATAGTGAAGCCAC
AGATGTATTTCTTACCTTTGTGTTCTGGTGCCTACTGCCTCGGA3'

mRaf-1 miR5

5'TGCTGTTGACAGTGAGCGATCAGGTATAAGTATTGTTTAATAGTGAAGCCACA
GATGTATATAACAATACTTATACTGAGTGCCTACTGCCTCGGA3'

mRaf-1 miR6

5'TGCTGTTGACAGTGAGCGCGACATGAAATCCAACAATATATAGTGAAGCCACA
GATGTATATATTGTTGGATTTTCATGTCTTGCCTACTGCCTCGGA3'

mSET miR1

5'TGCTGTTGACAGTGAGCGCAACAGACATCCTTGCAATTTATAGTGAAGCCACA
GATGTATAAATTGCAAGGATGTCTGTTATGCCTACTGCCTCGGA3'

mSET miR2

5'TGCTGTTGACAGTGAGCGAAAGTTGCTTTGTTACAATAAATAGTGAAGCCACA
GATGTATTTTATTGTAACAAAGCAACTTGTGCCTACTGCCTCGGA3'

5.9.2 Sequenzierprimer

MSCV-MCS-5'

5'CGTTCGACCCCGCCTCGATCC3'

5.9.3 Taqman Primer

BCR-ABL p185 Taq fw

5'TGAGAAAATGGGTCCTGTTCG3'

BCR-ABL p185 Taq rev

5'GAGTTCCATCGAGCTGCTTC3'

mGrb10 Taq A fw

5'TGTCCAACCGACACTGTGA3'

mGrb10 Taq A rev

5'GTCCCATCTTCACTAAAGACTT3'

mGrb10 Taq B fw

5'GACCTGGAAGAAAGCAGCAT3'

mGrb10 Taq B rev

5'CTTCGCTTTGTTTGGCTTGA3'

mp53 Taq A fw

5'GCGTAAACGCTTCGAGATGTT3'

mp53 Taq A rev

5'TTTTTATGGCGGGAAGTAGACTG3'

mp53 Taq B fw

5'AAAGGAAGTCCTTTGCCCTGA3'

mp53 Taq B rev

5'CCTCATTTCAGCTCCCGGAA3'

mRaf-1 Taq A fw

5'TCTGAAGGTGAGAGGCCT3'

mRaf-1 Taq A rev

5'GGCATCGGTGTTCCAATCT3'

mRaf-1 Taq B fw

5'GTGATGCTGTCTACTCGGA3'

mRaf-1 Taq B rev

5'GGTCAACCACCTTTAGGATC3'

5.9.4 Klonierungsprimer

miR30 common fw

5'CAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCG3'

miR30 common rev

5'CTAAAGTAGCCCCTTGAATTCCGAGGCAGTAGGCA3'

BamHI miR fw

5'TGAGGATCCTAGGGATAACAGGGTAATTG3'

MfeI-BglII miR rev

5'TGACAATTGAGATCTAAAAAAGTGATTTAATTTATACC3'

5.9.5 SLIC Klonierungsprimer

LIC miR fw1

5'CTTGGTACCGAGCTCGGATCCTAGGGATAACAGGGTAATTG3'

LIC miR fw2

5'TAGGGATAACAGGGTAATTG3'

LIC miR rev1

5'CCACACTGGACTAGTGGATCTAAAAAAGTGATTTAATTTATACCA3'

LIC miR rev 2

5'AAAAAAGTGATTTAATTTATACCA3'

5.10 DNA-Konstrukte

MIG-R1	J. Miller and W. Pear, Philadelphia, USA ¹⁹⁶
pcDNA 3.1/Zeo(+)	<i>Invitrogen, Leek, Niederlande</i>
pLMP	<i>Thermo Scientific, Karlsruhe</i>
pMmiR ^{mBRAF(1)} -BCR-ABL	diese Arbeit
pMmiR ^{Ctrl} -BCR-ABL	diese Arbeit
pMmiR ^{mGrb10(1)} -BCR-ABL	diese Arbeit
pMmiR ^{mp53} -BCR-ABL	diese Arbeit
pMmiR ^{mRaf-1(1)} -BCR-ABL	diese Arbeit
pMmiR ^{mRaf-1(2)} -BCR-ABL	diese Arbeit
pMmiR ^{mRaf-1(4)} -BCR-ABL	diese Arbeit
pMmiR ^{mSet(1)} -BCR-ABL	diese Arbeit
pMmiR ^{mSet(2)} -BCR-ABL	diese Arbeit
MIG-R1 p185	C. Mugler
MIY p185	diese Arbeit
MIG-Z	S. Gorantla
MIG-Z p185	diese Arbeit
pLMPmiR ^{p53}	S.W. Lowe, Cold Spring Harbor, USA ¹⁰⁸⁾
pLMPmiR ^{hGrb10}	diese Arbeit
pLMPmiR ^{Grb10(1)}	diese Arbeit
pLMPmiR ^{Grb10(2)}	diese Arbeit
pLMPmiR ^{Raf-1(1)}	diese Arbeit
pLMPmiR ^{Raf-1(2)}	diese Arbeit
pLMPmiR ^{Raf-1(3)}	diese Arbeit
pLMPmiR ^{Raf-1(4)}	diese Arbeit
pLMPmiR ^{Raf-1(5)}	diese Arbeit
pLMPmiR ^{Raf-1(6)}	diese Arbeit
pLMPmiR ^{BRAF(1)}	diese Arbeit
pLMPmiR ^{BRAF(2)}	diese Arbeit

pLMPmiR ^{PLC-γ1(1)}	diese Arbeit
pLMPmiR ^{PLC-γ1(2)}	diese Arbeit
pLMPmiR ^{Set(1)}	diese Arbeit
pLMPmiR ^{Set(2)}	diese Arbeit
pLMPmiR ^{Kontr.}	diese Arbeit
pSM2miR ^{Grb10(1)} (Klon V2MM_71217)	<i>Thermo Scientific, Karlsruhe</i>
pSM2miR ^{Grb10(2)} (Klon V2MM_63534)	<i>Thermo Scientific, Karlsruhe</i>

5.11 Bakterienstämme

Escherichia Coli DH5α™:	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
F-F80dlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rK-, mK+), phoA, supE44, l-thi-1, gyrA96, relA1	

5.12 Eukaryotische Zelllinien

32D	murine, IL-3-abhängige Zelllinie, ursprünglich erhalten aus Knochenmark-Langzeitkulturen aus C3H/HeJ-Mäusen
Ba/F3	murine, IL-3-abhängige Pro-B-Zelllinie, gewonnen aus Balb/C-Mäusen
K562	humane, immortalisierte, myeloide Leukämiezelllinie, positiv für das Philadelphia-Chromosom, generiert aus einer 53 jährigen CML-Patientin in der Blastenkrise ¹⁹⁷ .
NIH/3T3	murine, embryonale Fibroblasten-Zelllinie ΦNX-Eco (Phoenix E) retrovirale, ecotrope Verpackungszelllinie (Helfervirus-frei); 293T (humane embryonale Nierenkarzinom)-Zellen, stabil transfiziert mit Moloney GagPol-IRES-Lyt2-Konstrukt unter der transkriptionellen Kontrolle des RSV-Promotors (Selektion mit Hygromycin B) und Moloney ecotropic envelope Gen unter der transkriptionellen Kontrolle des CMV-Promotors (Selektion mit Diphtherietoxin)

Die Zelllinien 32D, Ba/F3 und NIH/3T3 wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Bereich menschliche und tierische Zellkulturen) in Braunschweig bezogen. Die Verpackungszelllinie Phoenix E wurde uns von Gary P. Nolan, Stanford, USA zur Verfügung gestellt.

5.13 Mäuse und tierexperimentelle Materialien

Mausstamm:

Balb/C

Harlan Winkelmann, Borcheln

5.14 Tierexperimentelle Materialien

Caesium 137-Strahlenquelle (33300 GBq)

Buchler GmbH, Braunschweig

DiscarditTM II Spritze, steril

Becton-Dickinson, Heidelberg

FalconTMZellsieb (100 µm)

Becton-Dickinson, Heidelberg

Global Rodent Breeding (25 kGy bestrahlt)

Harlan Teklad, Blackthorn, UK

Infrarotlampe

Petra, Burgau

Käfigsystem IVC

Tecniplast, Hohenpeißenberg Sterican

Injektionskanüle, steril (27G 3/4)

B. Braun, Melsungen

Objektträger (ISO Norm 8037/1)

Menzel Gläser, Braunschweig

S-Monovette®, EDTA

Sarstedt, Nümbrecht

Standarddiät Tierfutter

Altromin, Lage

Sub-Q, sterile PP Spritze, 1ml, 26G 1/2

Becton-Dickinson, Heidelberg

Vet abc Blood Counter

Scil, Viernheim

5.15 Standard Lösungen und Puffer

Ampicillin-Stammlösung:

50 mg/ml in A.d.

Amidoschwarz-Entfärbelösung:

10 % Methanol

10 % Essigsäure in A.d.

Basales Knochenmarkmedium (BBMM):	325 ml IMDM 150 ml FCS 25 ml BSA (10 % in IMDM) 5 ml L-Glutamin-Lösung (200mM) 100 µM 2-Mercaptoethanol 2,5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung
DNA-Probenpuffer (10-fach):	50 % Glycerin 0,5 M EDTA in A.d.
FACS-Puffer:	0,1 % BSA in PBS
Luria-Bertani (LB) Medium (flüssig):	1 % Bacto-Trypton 0,5 % Bacto-Hefeextrakt 1 % NaCl in A.d. mit 1 M NaOH auf pH 7,0 eingestellt autoklaviert
LB-Medium (fest):	1,5 % Bacto-Agar in LB-Medium (flüssig)
Lysis-Puffer:	10 mM Tris/HCl (pH 7,5) 130 mM NaCl , 5 mM EDTA 0,5 % Triton X-100 20 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ (pH 7,5) 10 mM Natriumpyrophosphat (pH 7) 1 mM Natriumorthovanadat 20 mM Natriumfluorid 1 mM Glycerol-2-Phosphat 1 Protease-Inhibitor Cocktail Tablette ad 10 ml A.d.

Prästimulationsmedium:	BBMM 10 ng/ml mIL-3 12 ng/ml mIL-6 50 ng/ml mSCF
RBC (Red Blood Cell)-Puffer:	150 mM NH ₄ Cl 1 mM KHCO ₃ 0,1 mM Na ₂ EDTA, pH7.3 in A.d.
Sammelgelpuffer für SDS-Gele (4-fach):	0,5 M Tris (pH 6,8) 0,4 % SDS in A.d.
SDS-Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % SDS in A.d.
SDS-Probenpuffer (2-fach):	1 M Tris/HCl (pH 6,8) 200 mM DTT 4 % SDS 0,2 % Bromphenolblau 20 % Glycin in A.d.
TAE-Puffer (10-fach):	0,4 M Tris 1,1 % Essigsäure 2 % 0,5 M EDTA (pH 8) in A.d.
Transferpuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % SDS in A.d. 20 % Methanol in A.d.
Trenngelpuffer für SDS-Gele (4-fach):	1,5 M Tris (pH 8,8) 0,4 % SDS in A.d.

6 Methoden

6.1 Molekularbiologische Arbeitstechniken

6.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) ist es möglich, *in vitro* Nukleotidsequenzen enzymatisch zu vervielfältigen¹⁸². Die PCR beruht auf der Eigenschaft von DNA-Polymerasen, einen DNA-Strang durch semikonservative Replikation zu verdoppeln. Möglich ist die PCR nur aufgrund der thermostabilen Eigenschaften der eingesetzten Polymerasen.

Zu Beginn jedes Amplifikationszyklus wird die doppelsträngige Matrizen-DNA (Template) durch Erhitzen auf 95°C denaturiert, so dass beim anschließenden Abkühlen auf die Anlagerungstemperatur Startermoleküle spezifisch an die Zielregion hybridisieren können (annealing). Als Startermoleküle werden synthetische DNA-Oligonukleotide (Primer) verwendet, welche die zu amplifizierende Region begrenzen. In der dritten Phase der Reaktion bindet eine hitzestabile DNA-Polymerase am Übergang zwischen doppelsträngiger und einzelsträngiger DNA und synthetisiert unter Einbau von Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) an das 3'-OH-Ende des Primers den neuen DNA-Doppelstrang (extension). Durch zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte wird die Matrize exponentiell amplifiziert. Im Gegensatz zur Taq DNA-Polymerase besitzt die Pfu DNA-Polymerase neben der 5'-3'-DNA-Polymeraseaktivität eine 3'-5'-Exonuklease-Prüffunktion (proofreading)¹⁹⁸ und weist daher zwölfmal höhere Genauigkeit als die Taq DNA-Polymerase auf. Durchgeführt wird die PCR in einem Thermozykler, dessen automati-

sche Steuerung ein individuell programmierbares, zyklisches Temperaturprogramm regelt. Neben der Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente können Mutationen an doppelsträngiger DNA vorgenommen werden, die in Punktmutation, Deletion oder Insertion einzelner oder mehrerer Aminosäuren resultieren. Außerdem ist es möglich, durch PCR-Mutagenese neue Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen oder rekombinationsfähige Sequenzen für die sequenz- und ligationsunabhängige Klonierung in die Matrizen-DNA einzuführen.

6.1.2 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Basensequenzen in DNA-Strängen und spalten an diesen Stellen doppelsträngige DNA spezifisch auf¹⁹⁹. Dabei entstehen abhängig vom verwendeten Enzym komplementäre, überhängende Enden (sticky ends) oder stumpfe Enden (blunt ends). Bei der Wahl der Puffer- und Inkubationsbedingungen wurden die Angaben des Herstellers berücksichtigt. Bevor die restriktionsverdaute DNA weiterverwendet werden kann, wird das Restriktionsenzym gemäß Herstellerangaben hitzeinaktiviert, um eine übermäßige und gegebenenfalls unspezifische Spaltung der DNA zu vermeiden.

6.1.3 Dephosphorylierung

Bei der Linearisierung von Plasmiden mit nur einem Restriktionsenzym liegt die Vektor-DNA nach dem Verdau mit kompatiblen 5'- und 3'-Enden vor. Diese werden von der Ligase bevorzugt religiert ohne ein DNA-Fragment einzufügen. Die Abspaltung der 5'-Phosphatgruppe mit alkalischer Phosphatase verhindert dies und verbessert so die Effizienz der Klonierung erheblich. Eine kovalente Verknüpfung ist dann nur mit dem Insert möglich, das eine intakte 5'-Phosphatgruppe besitzt.

Das diese Reaktion katalysierende Enzym benötigt ähnliche Pufferbedingung wie Restriktionsendonukleasen, daher kann es nach vollendeter Restriktionsspaltung dem Ansatz zugesetzt werden. Die Inkubationszeit beträgt 30 min bei 37° C. Anschließend wird die Phosphatase durch Erhitzen des Ansatzes auf 65°C für 10 min inaktiviert.

6.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird zur Identifikation, Trennung und Reinigung von DNA-Fragmenten verwendet. Beim Anlegen einer Spannung wandert DNA im Agarosegel aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen zur Anode. Die DNA-Banden werden durch das interkalierende und fluoreszierende Ethidiumbromid unter UV-Licht in einem Photodokumentationsgerät sichtbar gemacht. Für präparative und analytische Zwecke werden 1 bis 2 % ige Agarosegele verwendet. Mit Hilfe eines DNA-Standards lässt sich die Molekülgröße von DNA-Fragmenten durch Vergleich der Laufstrecken abschätzen. Zur Herstellung des Agarosegels wird die entsprechende Menge Agarose (w/v) in TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Nachdem die Lösung auf ca. 50°C abgekühlt ist, werden 2 µl Ethidiumbromid in einem horizontalen Gelbett mit Lochkamm verteilt und mit der flüssigen Agarose-Lösung aufgeossen. Blasenbildung sollte vermieden werden. Nach Erstarren wird das Gel mit TAE-Puffer überschichtet, der Kamm entfernt. Die Proben werden mit einem Fünftel ihres Volumens an Auftragspuffer für Agarosegele versetzt, das Gel beladen und die Elektrophorese bei 100 Volt durchgeführt. Bei dem Lauf durch das Gel interkaliert das Ethidiumbromid in die DNA und somit lassen sich die DNA-Banden bei Bestrahlung mit UV-Licht (366 nm) visualisieren.

TAE-Puffer (1 x): 40 mM Tris; 1 mM EDTA; 20 mM Essigsäure; pH 8.0

DNA-Probenpuffer (6x): 30 % Glycerin (v/v), 50 mM EDTA in A.d.

6.1.5 Gelextraktion

Zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten werden diese nach elektrophoretischer Auftrennung mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Um Beschädigung der DNA in Form von Strangbrüchen und Dimerbildungen zu vermeiden, wird zur Visualisierung eine UV-Quelle mit geringer Wellenlänge verwendet und die Expositionszeit möglichst gering gehalten. Für die Extraktion der DNA aus dem Agarosegel wird das „NucleoSpin® Extract II Kit“ gemäß Vorgaben des Herstellers verwendet, zur Elution jedoch Aq. dest. verwendet. Die Aufreinigung dient dazu, Verunreinigungen wie Agarosereste, Enzyme, Nukleotide und Salze zu entfernen. Die DNA wird bei -20°C gelagert.

NucleoSpin® Extract II Kit

6.1.6 Ligation

Zur Herstellung eines rekombinanten DNA-Moleküls wird der linearisierte Vektor mit dem zu klonierenden DNA-Stück (Insert-DNA) verknüpft¹⁹⁹. Katalysiert wird die ATP-abhängige Reaktion durch die T4-Ligase, die 3'-OH-Enden mit 5'-Phosphat-Enden verbindet. Idealerweise sollte ein molares Verhältnis zwischen Vektor und Insert-DNA von 1:3 vorliegen. Die DNA-Konzentrationen werden mittels NanoDrop gemessen und die in die Ligation einzusetzenden Mengen an Vektor- und Insert-DNA entsprechend angeglichen. Die Ligation erfolgt entsprechend den Herstellerangaben mit dem „Rapid Ligation Kit“ von Fermentas. Als Kontrolle fungiert ein Ligationsansatz, bei dem die Insert-DNA durch Wasser ersetzt wird. Der Ligationsansatz kann anschließend in kompetente Bakterien transformiert werden.

Rapid Ligation Kit

6.1.7 Sequenz- und ligationsunabhängige Klonierung

Bei der sequenz- und ligationsunabhängigen Klonierung (SLIC, *sequence and ligation independent cloning*) wird die *in vivo* vorkommende, homologe Rekombination imitiert¹¹⁸. Hierzu werden Vektor-DNA und durch PCR erzeugte Insert-DNA mit einer Exonuklease mit 3'-5'-Exonukleaseaktivität behandelt, die einzelsträngige Überhänge am 5'-Ende generiert. Diese Überhänge sind ähnlich wie bei Restriktionsendonuklease-generierten Überhängen zwischen Insert-DNA und Vektor-DNA kompatibel und können sich aneinander anlagern. Durch Rekombination werden schließlich Insert-DNA und Vektor-DNA miteinander verbunden. Diese Methode ermöglicht die Übertragung der Gateway-Klonierung auf jeden beliebigen Vektor. Zudem können in einer einzigen Reaktion mehrerer Fragmente gleichzeitig und in einer festgelegten Reihenfolge und Orientierung in einen Vektor eingebracht werden. Die Primer weisen eine chimäre Sequenz auf: der 3'-Bereich entspricht der Insert-Sequenz, der 5'-Bereich der Vektor-Sequenz, die der MCS benachbart ist. Durch Amplifikation mittels PCR entsteht ein Insert, das flankierende Sequenzen homolog zur Vektorsequenz aufweist. Sowohl Insert-DNA als auch restriktionsverdauter Vektor-DNA werden mit 1 µl T4-Polymerase inkubiert und die Exonukleasereaktion durch Zugabe von 1 mM dGTP beendet. Vektor- und Insert-DNA werden nun in equimolarem Verhältnis gemischt und direkt in kompetente DH5α Bakterien transformiert.

6.1.8 Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen und Geweben

Die Aufreinigung von RNA aus eukaryotischen Zellen und murinen Geweben erfolgt nach der Vorschrift des „RNeasy® Plus Mini Kit“. Zum Homogenisieren werden „QIAshredder“ oder ein Ultra-Turrax verwendet. Alternativ wird die RNA unter Verwendung des „TRIZOL® Reagent“ gewonnen. Diese RNA Isolierung basiert auf der von Chomczynski und Sacchi beschriebenen Methode²⁰⁰. Die isolierte RNA kann bei -80°C gelagert werden.

6.1.9 Reverse Transkription zur Generierung von cDNA

Die Eigenschaft des Enzyms Reverse Transkriptase, mRNA als Matrize für die Synthese eines komplementären cDNA-Strangs zu benutzen, wird bei der Umschreibung der mRNA in cDNA, der so genannten reversen Transkription, genutzt. Hierfür wird der „SuperScript™ II RNase H-Reverse Transcriptase“ Kit mit Oligo(dT)-Primern nach Angaben des Herstellers verwendet. Die 15 bis 20 bp langen Oligo(dT)-Primer hybridisieren im Bereich des Poly(A)-Schwanzes am 3'-Ende der mRNA, so dass sämtliche mRNA, unabhängig von der Sequenz, als Matrize dienen kann. Jeweils gleiche Mengen mRNA, gemessen mit dem NanoDrop-Gerät, wurden für die cDNA-Synthese verwendet, um in einer anschließenden PCR-Reaktion auf semiquantitativem Niveau arbeiten zu können.

6.1.10 Quantitative RT-PCR

Die quantitative RT-PCR (qRT-PCR) beruht auf dem Prinzip einer herkömmlichen PCR, ermöglicht aber eine Quantifizierung. Hierfür wird zu dem Reaktionsansatz ein DNA-Farbstoff (SYBRGreen) zugegeben. Nach Einlagerung des Fluoreszenzfarbstoffes in doppelsträngige DNA nimmt die Fluoreszenz zu und ist somit proportional zur Menge an PCR-Produkt. Die Fluoreszenz wird am Ende jedes Elongationsschrittes gemessen. Die qRT-PCR wurde nach Herstellerangaben des „Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG“ durchgeführt und auf einem ABI PRISM® 7700 analysiert. Um Fehler durch eventuelle Kontamination der cDNA-Probe mit genomischer DNA zu vermeiden, werden die Primer so gewählt, dass sie über eine Exon-Intron-Grenze hinausgehen und ein 50-150 bp langes Produkt generieren. Zur Quantifizierung wurden die Daten auf das Kontrollgen GAPDH normiert.

6.2 Arbeiten mit Bakterien

6.2.1 Kultivierung von Bakterien

Flüssig-Bakterienkulturen werden bei 37°C und 250 Upm in LB-Medium über Nacht inkubiert, Bakterienkolonien, ebenfalls bei 37°C über Nacht auf LB-Agarplatten. Durch Zusatz von Antibiotika können nur Zellen wachsen, die ein resistenzvermittelndes Plasmid enthalten, nicht transformierte Bakterien hingegen werden abgetötet.

LB-Medium: 1 % Bacto-Trypton; 1 % NaCl; 0,5 % Bacto-Hefeextrakt in A.d.;
autoklaviert; pH 7,0

LB-Agarplatten: 1,5 % Bactoagar in LB-Medium; autoklaviert

Antibiotika: 50 mg/ml Ampicillin bzw. 10 mg/ml Kanamycin

6.2.2 Transformation

Als Transformation bezeichnet man die Übertragung von Fremd-DNA (z.B. rekombinanten Vektoren) auf Bakterien- oder Hefezellen. Gramnegative Bakterien wie *E. coli* sind unter normalen Umständen nicht in der Lage, DNA von außen mit ausreichender Effizienz aufzunehmen. Darum wird die Zellwand von *E. coli* durch Behandeln mit unphysiologisch hohen Konzentrationen an zweiwertigen Metallkationen wie Ca^{2+} oder Rb^{2+} destabilisiert. Die Aufnahme wird somit gesteigert. Der Wirkungsgrad einer Transformation wird normalerweise durch einen Hitzeschock oder durch einen kurzen hohen Stromstoß erhöht.

Für die Transformation durch Hitzeschock wird die DNA-Lösung (max. 10 µl) zu 100 µl auf Eis aufgetauten kalziumkompetenten Bakterien (DH5α) pipettiert, 20 min auf Eis inkubiert und für 45 sec auf 42°C erhitzt. Anschließend wird für weitere 2 min auf Eis inkubiert¹⁹⁹ und die Bakteriensuspension auf LB-Platten ausplattiert. Wird ein Plasmid transformiert, das eine Kanamycin-Resistenz kodiert, so müssen die Bakterien nach dem Hitzeschock für 60 Min bei 37°C in antibiotikafreiem LB-Medium inkubiert werden, da die Resistenz nicht sofort nach der Transformation eintritt. In diesem Fall wird der Ansatz bei Raumtemperatur zentrifugiert, das Pellet in 100 µl Medium resuspendiert und auf Selektionsmedium ausplattiert. Von Einzelkolonien werden nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C Flüssigkulturen für Mini- und Maxipräparationen angeimpft.

6.2.3 Plasmid-Präparation

Plasmide sind ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle, die in Bakterien und Hefezellen unabhängig von der chromosomalen DNA vermehrt werden. Die hier verwendeten Methoden zur Isolation von Plasmid-DNA beruhen auf den unterschiedlichen Eigenschaften der Plasmid-DNA und der chromosomalen DNA bei ihrer Denaturierung mit Natriumhydroxid und anschließender schneller Renaturierung. Beim raschen Absenken des pH-Wertes nach alkalischer Denaturierung renaturiert Plasmid-DNA und bleibt löslich, wohingegen chromosomale DNA an Zellwandbruchstücken und Proteinen haftet und mit diesen zentrifugiert werden kann.

6.2.3.1 Plasmid-Präparation (Mini-Ansatz)

Mit dem „NucleoSpin® Plasmid Kit“ von Machery-Nagel lassen sich innerhalb kurzer Zeit kleine Mengen (bis zu 40 µg bei 10 ml Übernacht-Kultur) Plasmid-DNA in hoher Reinheit aus Bakterien isolieren.

Die Durchführung erfolgt in Anlehnung an das mitgelieferte Protokoll. Es werden bei *high-copy*-Plasmiden 5 ml, bei *low-copy*-Plasmiden 10 ml antibiotikahaltiges LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Bakterienzellen werden anschließend 10 Min bei 4°C und 4000 Upm pelletiert und die DNA nach Anleitung des Herstellers nach dem Prinzip der alkalischen Lyse gewonnen.

6.2.3.2 Plasmid-Präparation (Maxi-Ansatz)

Die Plasmid-Maxipräparation erfolgt nach dem gleichen System wie die Plasmid-Minipräparation, lediglich in größerem Maßstab. Mit dem „NucleoBond® Plasmid Maxi Kit“ von Machery-Nagel lassen sich bis zu 1500 µg Plasmid-DNA isolieren. Mit einer 4 ml Vorkultur der Bakterien werden 300 ml LB-Medium angeimpft. Die Bakterien aus dieser Übernacht-Kultur (37°C) werden durch 15-minütige Zentrifugation bei 5000 Upm pelletiert und das Bakterien-Pellet gemäß Herstellerangaben lysiert und aufgearbeitet.

6.2.4 Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden von *GATC Biotech*, Konstanz durchgeführt.

6.3 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

6.3.1 Kultivierung von Zellen

Alle Zelllinien werden im Brutschrank bei 37°C, 90 % relative Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Gehalt kultiviert.

6.3.1.1 Kultivierung von Suspensionszelllinien

Die Suspensionszellen Ba/F3, 32D und K562 werden in RPMI-Medium kultiviert. Ba/F3- und 32D-Zellen benötigen als Wachstumsfaktor murines IL-3 (0,2 ng/ml). Die Suspensionszellen werden 3- bis 4-mal wöchentlich im Verhältnis 1:10 verdünnt und zur weiteren Kultivierung wird frisches Medium zugeführt.

RPMI-Medium: RPMI 1640, 2 mM Glutamin, 1 % antibiotische Lösung, 10 % FCS

6.3.1.2 Kultivierung adhärenter Zelllinien

Phoenix E und NIH/3T3 werden in DMEM-Medium kultiviert. Adhärenente Zellen können durch enzymatischen Abbau mittels einer Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst werden. Phoenix-Zellen werden täglich im Verhältnis 1:1, NIH/3T3 2-3 mal wöchentlich im Verhältnis 1:10 verdünnt und replattiert. Dazu wird das Medium entfernt, die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA versetzt. Nach 2- bis 100-minütiger Inkubation im Brutschrank werden die Zellen mit frischem Medium abgespült und in 50 ml Reagenzgefäßen zentrifugiert (1500 Upm, 3 Min). Das Zellpellet wird nun in frischem Medium resuspendiert und auf neue Kulturgefäße verteilt.

DMEM-Medium: DMEM, 2 mM Glutamin, 1 % antibiotische Lösung, 10 % FCS

1x PBS: 10 % 10x PBS in A. d.

1x Trypsin/EDTA: 10 % Trypsin EDTA in 1x PBS

6.3.2 Kryokonservierung von Zellen

Zellen können zur dauerhaften Lagerung tiefgefroren und bei Bedarf wieder aufgetaut und weiterkultiviert werden. Dazu werden $1-10 \times 10^6$ Zellen in 1 ml Medium in einem Kryoröhrchen mit dem gleichen Volumen Einfriermedium vermischt und sofort bei -80°C in einem Kryo-Einfriergerät eingefroren. Für dauerhafte Lagerung werden die Zellen nach 12-24 h in flüssigen Stickstoff überführt.

Einfriermedium 2-fach: 20 % FCS; 80 % DMSO

6.3.3 Auftauen von Zellen

Nach der Entnahme des Kryoröhrchens aus dem flüssigen Stickstoff wird dieses sofort bei 37°C angetaut und die Zellen schnellstmöglich in 10 ml Kulturmedium überführt. Durch Zentrifugation wird das enthaltene DMSO entfernt. Für die Kultivierung werden die Zellen anschließend in Kulturmedium resuspendiert und in ein entsprechendes Zellkulturgefäß überführt.

6.3.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl werden die Zellen mit Trypanblau angefärbt und die lebenden und demnach Trypanblau-negativen Zellen ausgezählt. Hierfür werden gleiche Volumina der Zellsuspension und einer 0,5 %-igen Trypanblaulösung gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop werden vier Großquadrate ausgezählt, wobei nur viable Zellen berücksichtigt werden. Die Zellzahl pro ml Zellsuspension wird ermittelt, indem man die durchschnittliche Zellzahl pro Großquadrat mit dem Verdünnungsfaktor 2 und dem Faktor 10^4 multipliziert.

6.3.5 Transiente Transfektion

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen genetischen Materials in eukaryotische Zellen. Sie wird eingesetzt, um Plasmide, Antisense-Oligonukleotide oder siRNA einzuschleusen. Die Fremd-DNA kann auf verschiedene Weisen in die Zielzelle eingebracht

werden: durch virale Transfektion, Lipofektion oder durch Elektroporation. Die Anwendung der Lipofektion ist weitestgehend auf adhärenzte Zelllinien beschränkt. Nukleofektion eignet sich sowohl für adhärenzte Linien als auch für Suspensionszellen wie K562, 32D und Ba/F3. Der Gen-Transfer durch retrovirale Infektion schließlich eignet sich für die meisten Zellarten einschließlich primärer Knochenmarkzellen; einzig ruhende, sich nicht teilende Zellen sind nicht durch Retroviren transfizierbar.

6.3.5.1 Lipofektion

Die Transfektion von Phoenix E-Zellen mit Lipofectamine™ 2000 erfolgt gemäß Herstellerangaben. Soll Virus generiert werden, werden 2 Millionen Phoenix E-Zellen pro 6 cm Zellkulturschale ausplattiert. 24 Stunden später wird das Medium durch 2 ml frisches DMEM-Medium ersetzt. Parallel werden 0,5 ml Opti-MEM®I mit 20 µl Lipofectamine™ 2000 und 0,5 ml Opti-MEM®I mit 10 µg zu transfizierender DNA oder siRNA versetzt. Nach 5-minütiger Inkubation werden die Ansätze vermischt und für weitere 40 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird der Transfektionsansatz vorsichtig auf die Zellkulturplatte aufgetropft. Die Expression der kodierten Proteine setzt etwa 16-24 h nach der Transfektion ein.

Lipofectamine™ 2000

Opti-MEM®I Serum reduziertes Medium

6.3.5.2 Nukleofektion

Die Methode der Nukleofektion von Amaxa kombiniert die Elektroporation mit optimierten, zelltypspezifischen Puffern, um eine hohe Transfektions- und Überlebensrate zu gewährleisten. Für verschiedene Zelltypen stehen verschiedene Reagenzien und Nukleofektionsprogramme zur Verfügung. Um Zellen mittels Nukleofektion nicht-viral mit einem gewünschten Plasmid zu transfizieren, werden die Zellen ($1-2 \times 10^6$) in 100 µl der entsprechenden Nukleofektionslösung (Amaxa, Köln, Deutschland) resuspendiert und mit 2-5 µg Plasmid-DNA gemischt. Dieser Ansatz wird in eine Elektroporationsküvette (2 mm Spaltbreite) transferiert, in das Nukleofektor-Gerät (Amaxa, Köln, Deutschland) eingesetzt und das entsprechende Nukleofektionsprogramm gestartet. Die Zellen werden anschließend

mit 500 µl vorgewärmtem Medium aus der Küvette herausgespült und entsprechend den Herstellerangaben im jeweiligen Inkubationsgefäß in vorgewärmtem Medium ausgesät. Die Inkubation erfolgt für mindestens 24 h bei 37°C.

Nucleofector®-Gerät

K562-Zellen:	Cell Line Nucleofector® Kit V, Programm T-16
32D- und Ba/F3-Zellen:	Cell Line Nucleofector® Kit V, Programm X-01
NIH/3T3-Zellen:	Cell Line Nucleofector® Kit R, Programm U-30

6.3.6 Gewinnung von Retrovirus und retrovirale Transduktion

Das retrovirale Gentransfersystem umfasst zwei Komponenten, den retroviralen Vektor und die Verpackungszelllinie. Der retrovirale Vektor ist ein Plasmid, das nicht für retrovirale Proteine kodiert, sondern nur über das Verpackungssignal Psi und die retroviralen 5'- und 3'-LTR verfügt, die eine Insertionsstelle für das zu übertragende Gen und gegebenenfalls einen Selektionsmarker flankieren. Die Verpackungszelllinie stellt die retroviralen Proteine (pol, gag, env) zur Verfügung, die für die Verpackung der Vektor-RNA und somit für die Erzeugung retroviraler Partikel notwendig sind. Die Verpackungszelllinie exprimiert zwar die retroviralen Strukturproteine, bei diesem Helfergenom ist jedoch das Verpackungssignal Ψ deletiert, so dass die virale RNA, die in der Verpackungszelllinie von dem Helfergenom abgelesen wird, nicht in Virionen verpackt wird. Je nach Art der vom Helfergenom exprimierten, retroviralen Hüllproteine wird zwischen ecotropen (infizieren nur Mäuse/Ratten) bzw. amphotropen (weites Wirtsspektrum, auch Mensch) Verpackungszelllinien unterschieden.

Nach Transfektion der Verpackungszelllinie mit dem retroviralen Vektor werden von diesem Transkripte hergestellt, die sowohl translatiert als auch als genomische RNA in neue Virionen verpackt werden, welche von der Verpackungszelllinie abgegeben werden. Mit Hilfe dieser Virionen, die in der Regel Replikationsdefekte aufweisen, können Zielzellen infiziert werden, in deren Genom sich das von der übertragenen retroviralen RNA umgeschriebene Provirus stabil integriert. Dort werden das zu übertragende Gen sowie gegebenenfalls der Selektionsmarker exprimiert.

6.3.6.1 Herstellung von Retroviren

Die Phoenix-Zellen basieren auf der menschlichen, embryonalen Nieren-Zelllinie 293T. Generiert wurden sie von Nolan durch Einführung zweier Plasmide, eines kodiert für Kapsidproteine (gag) und die reverse Transkriptase (pol), das andere für Hüllproteine (env). Abhängig davon, ob die zu infizierende Zelle murinen oder humanen Ursprungs ist, muss die entsprechende ecotrophe oder amphotrophe Phoenix-Linie gewählt werden. Die Trennung der viralen Gene auf verschiedenen Plasmiden über nicht Moloney-basierende Promotoren dient dem Zweck, die Bildung replikationskompetenter Retroviren zu verhindern. Phoenix-Zellen zeichnen sie sich durch eine hohe Transfektionseffizienz unter Verwendung der Calcium-Phosphat Methode oder der Lipofektions-Methode aus. Retrovirale Vektoren kodieren für ein Verpackungssignal Ψ . Transfiziert man nun Phoenix-Zellen mit einem retroviralen Vektor, so wird die DNA in genomische RNA umgeschrieben und in die virale Hülle verpackt. Die Phoenix-Zellen setzen dann die fertigen Virus-Partikel in das Kulturmedium frei.

Zur Herstellung der Retroviren werden einen Tag vor der Transfektion pro Ansatz 2×10^6 Phoenix E-Zellen in 3 ml DMEM-Medium pro 6 cm Zellkultur-Schale ausgesät. Nach 24 Stunden wird der retrovirale Vektor mittels Lipofektion in die Zellen eingebracht (Kapitel 6.3.5.1.). Weitere 24 Stunden später wird das Medium durch frisches DMEM-Medium ersetzt und in 12 Stunden-Intervallen bis zu 3 mal der retrovirusenthaltende Zellüberstand abgenommen, filtriert (0,45 μm) und bis zur Weiterverwendung bei 4°C gelagert.

6.3.6.2 Retrovirale Infektion

Um Suspensionszellen retroviral zu infizieren, wird die Spin-Infektions-Methode angewandt. Hierfür werden 50000 Ba/F3- oder 32D-Zellen in 500 μl RPMI-Medium mit IL-3 in 24-Schalen-Platten ausgesät und 2 ml retrovirusenthaltendes Medium zugegeben. Um die Bindung der Viren an die Zellmembran zu erleichtern, wird das Polykation Polybrene in einer Konzentration von 4 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt und die Platte für 90 Min bei 32 °C und 24000 Upm zentrifugiert. Die Viruspartikel, gebunden an Phoenix E-Zellfragmente, und die zu infizierenden Zellen werden hierdurch am Boden der Platte zusammengeführt und somit die Infektionseffizienz gesteigert. Im 12 Stunden-Turnus bis zu dreimal wird der virale

Überstand entfernt und durch 2 ml frischen Virusüberstand und 500 µl frisches RPMI-Medium mit IL-3 ersetzt.

6.3.6.3 Selektion der Virusverpackungszelllinie

Phoenix E-Zellen sind mit den für die Virusproduktion essentiellen Genen gag, pol und env transient transfiziert. Um zu gewährleisten, dass jede Zelle funktionsfähige Retroviren generieren kann, müssen die Zellen vor der Transfektion mit dem zu verpackenden Plasmid für die Expression der Virusgene selektioniert werden. Gag und pol sind auf einem Plasmid zusammen mit einer Hygromycin-Resistenz kodiert, für env kann mit Diphtherie-Toxin selektioniert werden. Hierfür werden die Phoenix E-Zellen über einen Zeitraum von mindestens 7 Tagen mit 300 µg/ml Hygromycin B- und 1 µg/ml Diphtherietoxin-Zusatz kultiviert.

6.3.6.4 Titration der viralen Überstände

Zur Überprüfung des retroviralen Titers werden NIH/3T3-Zellen mit dem Überstand der transfizierten Phoenix E-Zellen infiziert. Am Vortag der Infektion werden $2,5 \times 10^4$ NIH/3T3-Zellen pro Schale einer 6-Schalen-Zellkulturplatte in DMEM-Medium ausplattiert. Nach der durchschnittlichen Verdopplungszeit der Fibroblasten von ca. 14 h erfolgt die Titerbestimmung in einer Verdünnungsreihe. Hierzu werden die zu titrierenden retroviralen Überstände in einer Verdünnung von 1:20, 1:200 und 1:500 in 2 ml frischem Medium auf die Zellen gegeben. Zur Verbesserung der Transduktionseffizienz wird das kationische Polymer Polybrene (Endkonzentration: 4 µg/ml) dem Medium zugesetzt. Nach 24 Stunden im Inkubator erfolgt ein Mediumwechsel und nach weiteren 24 bis 48 Stunden werden die Zellen mittels Trypsin aus den Schalen abgelöst und die Prozentzahl infizierter Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Berechnung der Einzeltiter (infektiöse retrovirale Partikel pro ml) erfolgt durch Multiplikation von 5×10^4 (Zellzahl bei Infektion) mit dem Verdünnungsfaktor (20, 200 oder 500) und dem prozentualen Anteil GFP-positiver Zellen der jeweiligen Verdünnungsstufe. Der Virustiter (CFU/ml, *colony forming units/ml*, infektiöse retrovirale Partikel/ml) entspricht dem Mittelwert der drei unabhängig ermittelten Einzeltiter.

6.3.7 Durchflusszytometrische Messung (FACS-Analyse)

Die Transfektionseffizienz kann durchflusszytometrisch bestimmt werden, wenn der zur Transfektion verwendete Vektor für ein fluorochromes Protein kodiert. Bicistronische Vektoren können neben dem zu untersuchenden Gen ein zweites Gen beinhalten, das z.B. für ein Fluorochrom kodiert. Der verwendete MIG-RI-Vektor beispielsweise kodiert für das grün fluoreszierende Protein GFP, der MIY-Vektor für gelb fluoreszierende Protein (YFP). In beiden Vektoren wird das Fluorochrom über eine interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES), die sich in 3' stromabwärts von dem zu untersuchenden Gen befindet, angesteuert. Somit werden beide Gene zu einer gemeinsamen mRNA transkribiert. Von diesem Transkript erfolgt die parallele Translation der beiden Gene zu einzelnen Proteinen, wobei die IRES die Translation des zweiten Gens vermittelt. Somit exprimieren alle erfolgreich transfizierten Zellen zusätzlich GFP und können darüber im Durchflusszytometer (FACScan) detektiert werden. Das Prinzip der Durchflusszytometrie besteht darin, dass die Elektronen der Fluorochrome, angeregt durch einen Argon-Laser, auf ein höheres Energieniveau gehoben werden und unter Abgabe von Energie in Form von Licht spezifischer Wellenlänge auf ihr Ursprungsniveau zurückfallen. Die Zellen fließen einzeln in einem Trägerstrom durch ein Rohr, wobei das emittierte Licht von einem Detektor erfasst wird. Die Fluoreszenzintensität korreliert dabei mit der Menge des Fluorochroms. Somit können auch Rückschlüsse auf die Expressionsstärke des zu untersuchenden Gens gezogen werden. Zusätzlich werden über die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße (im *forward scatter*, FS) und die Granularität der Zelle (im *sideward scatter*; SS) gewonnen. Um den Anteil der GFP-positiven Zellen nach Lipofektion, Elektroporation oder retroviraler Transduktion zu bestimmen, werden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro ml in PBS aufgenommen, durch ein Zellsieb (40 μm) pipettiert und im Durchflusszytometer gemessen. Der Anteil GFP-positiver Zellen wird nach der Messung als Punktwolkendiagramm oder Histogramm dargestellt.

6.3.8 Selektion mit G418 und Puromycin

Sowohl durch transiente als auch durch retrovirale Transfektion können nur in den seltensten Fällen Transfektionseffizienzen von über 90 % erreicht werden. Für viele Versuchsansätze wird jedoch eine reine Population transfizierter Zellen benötigt. Trägt das transfizierte Plasmid einen Fluoreszenzmarker, so können die Zellen durch durchflusszytometrische

Methoden sortiert werden. Kodiert das Plasmid für eine Antibiotikaresistenz, werden durch Zugabe des Antibiotikums zum Kulturmedium die nicht transfizierten Zellen getötet und die transfizierten Zellen auf diese Weise selektioniert. Die optimale Konzentration eines jeden Antibiotikums muss für jede Zelllinie mittels Verdünnungsreihen ermittelt werden. Hier wurde Puromycin für 32D-, Ba/F3- und NIH/3T3-Zellen in einer Konzentration von 2 µg/ml eingesetzt, die Selektion von K562-Zellen mit G418 wurde mit 400 µg/ml durchgeführt.

6.3.9 Herstellung von Einzelklonen

Infiziert man Zellen mit Retroviren, so erhält man eine Mischkultur, einen so genannten Massenklon. Die einzelnen Zellen dieser Kultur exprimieren das transduzierte Gen unterschiedlich stark, abhängig davon, wie häufig das retrovirale Konstrukt ins Zell-Genom integriert ist und auch an welcher Stelle. Die Lokalisierung ist von großer Wichtigkeit, da die Integration in Regionen starker oder schwacher Transkription erfolgen kann. Je nachdem, ob eine starke oder eine schwache Expression des transduzierten Genes erforderlich ist, müssen stark oder schwach exprimierende Einzelklone generiert werden. Hierfür wird die Zellzahl des Massenklangs bestimmt und eine Konzentration von 0,5 Zellen/200 µl Kulturmedium hergestellt. Je 200 µl der Suspension werden pro Schale auf 96-Schalen-Platten ausplattiert.

6.4 Proteinbiochemische Methoden

6.4.1 Herstellung von Zelllysaten

Nach Zentrifugation der zu lysierenden Zellen wird das Kulturmedium vollständig abgenommen und die Zellen direkt der Lyse zugeführt oder für spätere Verwendung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Das Pellet wird in frisch hergestelltem, eiskaltem Lysispuffer resuspendiert, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (14.000 Upm, 20 min, 4°C) wird der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und eine Proteinbestimmung durchgeführt (Kapitel 6.4.2). Im Anschluss werden die Proben mit SDS-Probenpuffer versetzt und zur Denaturierung der Proteine die Lösung 5 min bei 95°C gekocht. Nach kurzer Zentrifuga-

tion kann das Proteingemisch durch SDS-Gelelektrophorese (Kapitel 6.4.3) aufgetrennt werden.

Lysis-Puffer:	10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 130 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5 % Triton X-100; 20 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , pH 7,5; 10 mM Natriumpyrophosphat, pH 7; 1 mM Natriumorthovanadat; 20 mM Natriumfluorid; 1 mM Glycerol-2-Phosphat; 1 Proteaseinhibitor Cocktail Tablette/10 ml A.d
SDS-Probenpuffer (2x):	1 M Tris/HCl, pH 6,8; 200 mM DTT; 4 % SDS; 0,2 % Bromphenolblau; 20 % Glycin in A.d.

6.4.2 Proteinbestimmung

Die Gesamtproteinmenge der Zellysate wird mit der Methode nach Lowry²⁰¹ mit Hilfe des *DC Protein Assay* Proteinbestimmungskits nach Herstellerangaben bestimmt. Für den Einsatz in die Reaktion wird das Lysat 1:5 mit frischem Lysispuffer verdünnt.

Diese Methode beruht darauf, dass die Proteine zunächst mit einem alkalischen Cu²⁺-Reagenz eine dem Biuret-Komplex ähnliche Verbindung eingehen. In einem nachfolgenden Reaktionsschritt erfolgt die Reduktion des Folin-Ciocalteu's-Phenol-Reagenzes (Folin-Reagenz) durch die mit dem Cu²⁺ komplexierten Proteine. Der Kupfer-Protein-Komplex bewirkt die Reduktion von Molybdat bzw. Wolframat von der Wertigkeitstufe VI zur Wertigkeitstufe IV. Die Reduktion des Folin-Reagenzes erfolgt nachdem vermutlich Cu²⁺ im Kupfer-Protein-Komplex zu Cu⁺ reduziert wird. Die aromatischen Aminosäurereste Tyrosin und Tryptophan reduzieren darüber hinaus das Folin-Reagenz direkt ohne vorherige Komplexierung mit dem alkalischen Cu²⁺-Reagenz. Die Reduktion führt zu einem Farbumschlag des Folin-Reagenz von gelb nach blau. Die resultierende Blaufärbung wird zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration benutzt.

DC Protein Assay Proteinbestimmungskit

6.4.3 SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht es, Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Das Gel setzt sich aus einem Trenn- und einem Sammelgel zusammen. Der Auftrennungsbereich der Proteine kann durch Variation der Trenngel-Porengröße, also durch variierende Polyacrylamid-Konzentration

(5-15 %), festgelegt werden. Dem Gel wird Natriumdodecylsulfat (SDS) zugesetzt, das sehr fest an Proteine bindet und sie in eine stabähnliche Form entfaltet (denaturiert).

Sofort nach dem Gießen wird das Trenngel mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu gewährleisten. Nach der Polymerisation bei Raumtemperatur wird das Isopropanol abgegossen und die Reste mit einem saugfähigen Tuch entfernt. Anschließend wird das Gel mit einem Sammelgel überschichtet und sofort ein Kamm eingesetzt. Das Gel wird senkrecht in die entsprechende Elektrophorese-Apparatur eingespannt. Das Pufferreservoir für die Kathode und die Anode wird mit 1 x Laufpuffer gefüllt. Die vorbereiteten hitzedenaturierten Proteine (aus den Kapiteln 2.2.4.1 und 2.2.4.2) werden in die Probentassen gefüllt und durch Anlegen einer Spannung (25-140 Volt) aufgetrennt. Ein Molekulargewichtsmarker, der aus farbstoffmarkierten Proteinen definierten Molekulargewichts besteht, wird zum Molekulargewichtvergleich auf einer Spur des Gels aufgetragen. Nach dem Lauf wird das Gel aus der Kammer entnommen und die Proteine werden auf eine PVDF-Membran transferiert (Kapitel 6.4.4).

Trenngel:	5-15 % Polyacrylamid-Lösung; 375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1 % SDS; 0,3 % APS; 0,1 % TEMED
Sammelgel:	5 % Polyacrylamid-Lösung; 12,5 mM Tris/HCl, pH 6,8; 0,1 % SDS; 0,3 % APS; 0,1 % TEMED
SDS-Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS in A.d.

6.4.4 Transfer von Proteinen auf PVDF Membranen (Western Blot)

Unter Western Blot versteht man den Transfer von zuvor gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine proteinbindende Membran. In dieser Arbeit wurde das *wet blot*-Verfahren angewendet. Hierfür wird eine in Methanol equilibrierte PVDF-Membran luftblasenfrei auf das SDS-Gel gelegt und zwischen zwei Schichten aus Zellulosefilterkarton (*Whatmann*-Papier) in der Vorrichtung eingespannt. Diese wird entsprechend der Polung der Apparatur (Membran zur Anode, Gel zur Kathode weisend) in die mit Transferpuffer gefüllte Transferkammer eingesetzt. Der Transfer erfolgt unter ständiger Kühlung bei konstanter Stromstärke von 1 A. Die Dauer des Transfers ist abhängig von der molaren Masse der zu transferierenden Proteine (etwa 1 min pro kDa).

Transferpuffer:	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS; 20 % Methanol in A.d.
------------------------	---

6.4.5 Immunhistochemischer Nachweis transferierter Proteinen

Bei der Immunfärbung werden Proteine mit einem spezifischen Antikörper markiert, der wiederum mittels eines Chemolumineszenz-Systems nachgewiesen werden kann. Die Membran wird in PBST-Puffer gewaschen und anschließend 30 min bei 37°C in Blockierlösung inkubiert. Das Blockieren dient der Minimierung unspezifischer Signale bei dem immunchemischen Nachweis durch Absättigung überschüssiger Proteinbindungsstellen auf der Membran. Der Primärantikörper, der spezifisch gegen ein Epitop des zu untersuchenden Proteins gerichtet ist, wird entsprechend den Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Antikörper-Antigen-Reaktion erfolgt über Nacht bei 4°C. Danach wird die Membran dreimal für je 10 min in PBST-Puffer gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend wird die Membran bei RT mit einem gegen den F_c-Teil des Primärantikörpers gerichteten, Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper für eine Stunde inkubiert.

Nach erneutem Waschen wird die Membran mit Chemolumineszenz-Substrat-Lösung (*SuperSignal West*) inkubiert. Das Substrat wird durch die Peroxidase zu einer lumineszierenden Substanz umgesetzt. Das so erzeugte Signal kann einen Hyperfilm belichten, der das Ergebnis dokumentiert.

PBS-Tween-(PBST)-Puffer: 0,1 % Tween 20 in PBS
Blockierlösung: 10 % Trockenmilchpulver (entfettet) in PBS-Tween-Puffer;
5 % BSA in PBS-Tween-Puffer

SuperSignal West

6.5 Biologische Untersuchungen

6.5.1 Messung der proliferativen Aktivität

Die Messung der proliferativen Aktivität wird mit dem „CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay“ entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Eigenschaft viabler, proliferierender, metabolisch aktiver Zellen, die Substanz MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazoliumsalz) zu Formazan reduzieren zu können. Hierbei kommt es zu einem bei 490 nm messbaren Farbumschlag von gelb zu braun.

Für jede Probe und jeden Messzeitpunkt werden Dreifachwerte angefertigt. Hierzu werden 3000 Ba/F3- oder 32D-Zellen pro Loch in Flachboden-96-Loch-Platten ausgesät und im Inkubator bei normalen Zellkulturbedingungen gelagert. Der Leerwert wird in Kavitäten bestimmt, die nur mit Medium ohne Zellen beschickt sind. Um die proliferative Aktivität der Zellen zu messen, werden zum jeweiligen Messzeitpunkt 20 µl MTS pro Loch zugegeben und die Platten für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Absorption bei 490 nm wird anschließend mit dem Elisareader ausgelesen.

CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay

6.5.2 Methylzellulose-Assay primärer Knochenmarkzellen

Die Transformationskapazität BCR-ABL-transduzierter primärer Knochenmarkzellen der Maus kann mit Hilfe des CFU-Ansatzes bestimmt werden. Hierfür wird die Zellzahl retroviral infizierter, muriner, kernhaltiger Knochenmarkzellen genau bestimmt und eine Zellsuspension entsprechend 10000 GFP-positiver Zellen/ml in Hank's BSS hergestellt. Diese Zellen werden in einer Konzentration von 500 GFP-positiven Zellen/ml in Methylzellulosemedium in 6-Loch-Platten ausgesät und 7 bis 10 Tage bei 37°C im Brutschank inkubiert.

Transformierende Zellen besitzen die Fähigkeit, in Medium ohne Zytokin-Zusatz zu wachsen, während normale Progenitorzellen abhängig sind von zugesetzten Zytokinen. Im semisoliden Methylzellulose-Medium können sich diese Zellen jedoch nicht verteilen, somit entstehen Zellhaufen, die nach entsprechender Inkubationszeit mit einem inversen Mikroskop ausgezählt werden können. Die Zahl der Kolonien und der Progenitorzellen bzw. der Leukämie-initiiierenden Zellen in der Knochenmarkseinsaat stehen zueinander in direkter Beziehung. Weiterhin können dem Medium spezifische Inhibitoren zur Untersuchung ihrer Wirksamkeit auf onkogene Transformation zugesetzt werden.

Methocult® 3234

Methocult® 3434

6.6 Grundlegende tierexperimentelle Techniken

6.6.1 Haltung der Tiere

Die Haltung der Tiere erfolgt in speziellen, einzelbelüfteten Käfigen zur Haltung von Mäusen (IVC System, Tecniplast). 4 bis 6 Mäuse werden dabei in einem Mäusekäfig gehalten. Autoklaviertes Mäusefutter der Firma Altromin und autoklaviertes Trinkwasser erhalten die Tiere ad libitum bei zwei Flaschenwechsel wöchentlich. Spezielles Holzgranulat dient als Einstreu bei 0,5 - 2 Wechsel pro Woche. Die Räume sind speziell als Tierhaltungsräume konzipiert und personenlimitierte Zutrittskontrolle, Pflege durch ausgebildete Versuchstierpfleger, Klimatisierung, Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden mit Dämmerungsphase sind gewährleistet. Das Hygienemanagement erfolgt gemäß den Empfehlungen der FELASA.

6.6.2 Präparation von primären Knochenmarkzellen aus Spender-Mäusen

Zur Anreicherung der hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark von Balb/C-Mäusen wird diesen 5-FU verabreicht²⁰². 5-FU ist ein Uracil-Analogon und dient als Zytostatikum. Bei Zellteilungen wird es statt Cytidin und Thymidin in die DNA eingebaut, die entstehende DNA ist nicht funktionsfähig und die Zellen sterben ab. Nur sich schnell teilende Zellen sterben ab, während unreife Vorläuferzellen unbeeinflusst bleiben und ihr prozentualer Anteil im Knochenmark zunimmt.

Spendermäusen wird 5-FU in einer Dosis von 150 mg/kg Körpergewicht intravenös in die laterale Schwanzvene injiziert. Nach 4 Tagen werden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und Femur und Tibia beider Beine chirurgisch entnommen. Das Knochenmark wird durch Spülen der Knochen mit DMEM-Medium unter Verwendung einer Injektionskanüle (27 G $\frac{3}{4}$) gewonnen, durch ein Zellsieb der Porenweite 100 μ m pipettiert, und durch zweimalige Zentrifugation bei 1200 Upm für 8 Min pellettiert. Anschließend kann das Knochenmark der hypotonen Erythrozytenlyse (Kapitel 6.6.9) zugeführt werden oder für spätere Verwendung kryokonserviert werden (Kapitel 6.3.2).

Basales Knochenmarkmedium (BBMM): 325 ml IMDM; 150 ml FCS; 25 ml BSA (10 % in IMDM);
5 ml L-Glutamin-Lösung (200mM); 100 μ M 2-Mercaptoethanol;
2,5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung

6.6.3 Prästimulation muriner Knochenmarkzellen

Bevor primäre Knochenmarkzellen retroviral infiziert werden können (Kapitel 6.6.4), müssen die Zellen prästimuliert und somit ihre Teilung angeregt werden. Das Erreichen der Zellzyklusphase ist essentiell, um das retrovirale Konstrukt stabil in das Genom der Zellen zu integrieren, ferner hilft es bei einer raschen Regeneration der Hämatopoese bei der anschließenden Transplantation in die Empfängertiere. Knochenmarkzellen werden hierfür ca. 16 Stunden bei 37 °C in Prästimulationsmedium kultiviert, bevor die retrovirale Infektion durchgeführt wird.

Prästimulationsmedium: BBMM; 10 ng/ml mIL-3; 12 ng/ml mIL-6; 50 ng/ml mSCF

6.6.4 Retrovirale Transduktion primärer Knochenmarkszellen

Die retrovirale Infektion von primären Knochenmarkzellen erfolgt nach der gleichen Spin-Infektion-Methode wie in Kapitel 6.3.6 beschrieben. Abweichend hiervon werden die Knochenmarkzellen von einer Maus auf zwei 24-Schalen-Platten verteilt und es wird Prästimulationsmedium verwendet.

6.6.5 Bestrahlung von Empfängermäusen

Die 6 bis 8 Wochen alten, weiblichen Balb/C-Empfängermäuse werden vor der Knochenmarktransplantation mit einer Dosis von 800 rad (8 Gy) letal bestrahlt. Durch diese myeloablative Bestrahlung ist gewährleistet, dass die Hämatopoese und hämatopoetische Erkrankung nach der Transplantation ausschließlich von den Spenderzellen ausgeht.

6.6.6 Knochenmarktransplantation

Nach der Bestrahlung der Tiere erfolgt die Transplantation der retroviral infizierten Knochenmarkzellen durch intravenöse Injektion in die Schwanzvene vorgewärmter Empfängermäuse. Das zu injizierende Suspensionsvolumen sollte 200 µl nicht überschreiten.

6.6.7 Blutentnahme aus der Schwanzvene

In regelmäßigem Abstand wird allen Mäusen im Versuch Blut entnommen, um das Anwachsen der transplantierten Zellen in diesen Tieren zu überprüfen und immunphänotypische Analysen durchzuführen. Zudem wird der Gehalt an Leukozyten und Erythrozyten, HB, Hämatokrit und Blutplättchen bestimmt. Blutausstriche werden angefertigt, um eine morphologische Charakterisierung und Differenzierung der Leukozyten sicherzustellen. Zur Blutentnahme werden die Mäuse mit einer Rotlichtlampe erwärmt, in einer speziellen Vorrichtung fixiert und die dorsale Schwanzvene oder eine der beiden Lateralvenen mit einer Sub-Q PP Spritze punktiert. Mittels einer S-Monovette® wird das Blut aufgefangen.

6.6.8 Überwachung transplantiertter Mäuse

Um die Entwicklung einer hämatologischen Erkrankung zu erkennen und den Verlauf einer solchen zu überwachen, wird ab dem Zeitpunkt der Rekonstitution in regelmäßigen Abständen peripheres Blut aus der Schwanzvene entnommen (Kapitel 6.6.7) und analysiert. Ein Blutbild wird aus 20 µl peripheren Blutes mittels des VetABC-Blood-Counters erstellt. Ein Tropfen peripheres Blut wird verwendet, um einen Blutausstrich anzufertigen. Hierbei wird das Blut auf die untere Hälfte eines Glasobjektträgers getropft und mit der Kante eines zweiten Trägers ausgestrichen. Lichtmikroskopische Untersuchungen werden nach Pappenheimfärbung durchgeführt. Die Blutausstriche wurden freundlicherweise vom „Hämatologischen Routinelabor“ gefärbt. Für eine durchflusszytometrische Immunphänotypisierung (Kapitel 6.6.11) des peripheren Blutes werden 100-200 µl Blut abgenommen und die Erythrozyten durch hypotone Lyse entfernt (Kapitel 6.6.9).

6.6.9 Hypotone Erythrozytenlyse

Das frisch entnommene, periphere Blut wird im zehnfachen Volumen RBC-Puffer aufgenommen und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch den hypotonen Puffer schwellen die Erythrozyten an und platzen. Nach Zentrifugation (1200 Upm, 8 min) wird der Überstand verworfen und das Sediment, das die Leukozyten enthält, mit PBS gewaschen.

RBC (Red Blood Cell)-Puffer: 150 mM NHCl; 1 mM KHCO₃; 0,1 mM NaEDTA, pH 8 in A.d.

6.6.10 Aufbereitung von Organen transplantierte Mäuse

Nach Versterben der Mäuse infolge einer hämatologischen Erkrankung werden diese auf pathologische Veränderungen der Organe untersucht. Nach Eröffnen von Abdomen und Thorax erfolgen eine Splenektomie und das Entfernen von Femur und Tibia. Falls weitere Organe (Thymus, Lymphknoten, etc.) pathologisch vergrößert sind oder sich Tumoren gebildet haben, werden auch diese entnommen. Alle Gewebe und Organe werden gewogen und vermessen und bis zur weiteren Verarbeitung in Hank's BSS aufbewahrt. Die Knochenmarkzellen werden gewonnen, wie in Kapitel 6.6.2 beschrieben. Von allen Organen wird ein Teil mit einem Skalpell zerkleinert, mazeriert und zur Gewinnung von Einzelzellsuspensionen durch ein 45 µm Zellsieb gespült. Ein Teil der so gewonnenen Zellen wird durchflusszytometrisch immunphänotypisiert (Kapitel 6.6.11), während die verbleibenden Zellen für spätere Analytik viabel kryokonserviert (Kapitel 6.3.2) oder als Zellpellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden. Vom gewonnenen Knochenmark werden Ausstriche hergestellt. Hierfür wird etwas Knochenmark auf einen Objektträger gegeben und mit einem zweiten Objektträger mit einer leichten Quetsch-Drehbewegung ausgestrichen. Die Proben wurden freundlicherweise vom „Hämatologischen Routinelabor“ nach Pappenheim gefärbt.

Hank's Balanced Salt Solution

6.6.11 Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung muriner Zellen

Bei der Immunphänotypisierung werden zellspezifische Oberflächenantigene mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert und in einem Durchflusszytometer analysiert. Da die Antikörper spezifische Antigene erkennen, ist die Fluoreszenzintensität ein Maß für die Antigendichte auf der jeweiligen Zelle. Durch Kombination mehrerer, mit verschiedenen Farbstoffen gekoppelter Antikörper können auch Subpopulationen unterschieden werden. Zur Immunphänotypisierung werden die aufgearbeiteten Zellen in Fc-Block™-Lösung aufgenommen (Konzentration 1×10^7 Zellen pro ml Fc-Block™) und je 200 µl in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte verteilt. Die Zugabe von Fc-Block™ dient der Maskierung unspezifischer Bindungsstellen. Für jede Färbung werden die entsprechenden Antikörper dazugegeben, standardmäßig in einer Verdünnung von 1:200. Der Ansatz inkubiert unter Ausschluss von Licht eine Stunde bei 4°C. Anschließend wird die Platte bei 4°C und 1450 Upm für 5 min

zentrifugiert und die Zellen zweimal mit 200 µl FACS-Puffer gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Die Zellen werden in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen. Je nach Anwendung werden vor der Analyse im Durchflusszytometer jedem Ansatz 1 µg/ml Propidiumiodid, ein Farbstoff, der in DNA interkalieren kann, zugesetzt, um den Ausschluss toter Zellen in der Auswertung zu ermöglichen. Die Auswertung erfolgt unter Verwendung der FlowJo Software.

FACS-Puffer: 0,1 % BSA in PBS

7 Literaturverzeichnis

1. Hochhaus A, Müller MC und Hehlmann R. Diagnostik und Therapie der chronischen myeloischen Leukämie. *Der Onkologe* **8**, 693-707 (2002).
2. Nowell PC und Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* **142**(1960).
3. Marley SB und Gordon MY. Chronic myeloid leukaemia: stem cell derived but progenitor cell driven. *Clin Sci (Lond)* **109**, 13-25 (2005).
4. Prakash O und Yunis JJ. High resolution chromosomes of the t(9;22) positive leukemias. *Cancer Genet Cytogenet* **11**, 361-7 (1984).
5. Melo JV. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* **88**, 2375-84 (1996).
6. Kantarjian H, Melo JV, Tura S, Giralt S und Talpaz M. Chronic Myelogenous Leukemia: Disease Biology and Current and Future Therapeutic Strategies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 90-109 (2000).
7. Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* **243**, 290-3 (1973).

8. de Klein A, van Kessel AG, Grosveld G, Bartram CR, Hagemeijer A, Bootsma D, Spurr NK, Heisterkamp N, Groffen J und Stephenson JR. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* **300**, 765-7 (1982).
9. Pane F, Frigeri F, Sindona M, Luciano L, Ferrara F, Cimino R, Meloni G, Saglio G, Salvatore F und Rotoli B. Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood* **88**, 2410-4 (1996).
10. Carella AM. Chronic myeloid leukaemia : biology and treatment. Dunitz, London [u.a.] (2001).
11. Laurent E, Talpaz M, Kantarjian H und Kurzrock R. The BCR gene and philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. *Cancer Res* **61**, 2343-55 (2001).
12. McWhirter JR und Wang JY. An actin-binding function contributes to transformation by the Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *EMBO J* **12**, 1533-46 (1993).
13. Campbell ML, Li W und Arlinghaus RB. P210 BCR-ABL is complexed to P160 BCR and ph-P53 proteins in K562 cells. *Oncogene* **5**, 773-6 (1990).
14. Lin F, Monaco G, Sun T, Liu J, Lin H, Stephens C, Belmont J und Arlinghaus RB. BCR gene expression blocks Bcr-Abl induced pathogenicity in a mouse model. *Oncogene* **20**, 1873-81 (2001).
15. Tauchi T, Miyazawa K, Feng GS, Broxmeyer HE und Toyama K. A coiled-coil tetramerization domain of BCR-ABL is essential for the interactions of SH2-containing signal transduction molecules. *J Biol Chem* **272**, 1389-94 (1997).
16. Force T, Krause DS und Van Etten RA. Molecular mechanisms of cardiotoxicity of tyrosine kinase inhibition. *Nat Rev Cancer* **7**, 332-44 (2007).

17. Sawyers CL, McLaughlin J und Witte ON. Genetic requirement for Ras in the transformation of fibroblasts and hematopoietic cells by the Bcr-Abl oncogene. *J Exp Med* **181**, 307-13 (1995).
18. Skorski T, Bellacosa A, Nieborowska-Skorska M, Majewski M, Martinez R, Choi JK, Trotta R, Wlodarski P, Perrotti D, Chan TO, Wasik MA, Tschlis PN und Calabretta B. Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *EMBO J* **16**, 6151-61 (1997).
19. Varticovski L, Daley GQ, Jackson P, Baltimore D und Cantley LC. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in cells expressing abl oncogene variants. *Mol Cell Biol* **11**, 1107-13 (1991).
20. Naka K, Hoshii T, Muraguchi T, Tadokoro Y, Ooshio T, Kondo Y, Nakao S, Motoyama N und Hirao A. TGF-beta-FOXO signalling maintains leukaemia-initiating cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature* **463**, 676-80 (2010).
21. Carlesso N, Frank DA und Griffin JD. Tyrosyl phosphorylation and DNA binding activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cell lines transformed by Bcr/Abl. *J Exp Med* **183**, 811-20 (1996).
22. Shuai K, Halpern J, ten Hoeve J, Rao X und Sawyers CL. Constitutive activation of STAT5 by the BCR-ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia. *Oncogene* **13**, 247-54 (1996).
23. Ilaria RL, Jr. und Van Etten RA. P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *J Biol Chem* **271**, 31704-10 (1996).
24. Gesbert F und Griffin JD. Bcr/Abl activates transcription of the Bcl-X gene through STAT5. *Blood* **96**, 2269-76 (2000).

25. Nieborowska-Skorska M, Hoser G, Kossev P, Wasik MA und Skorski T. Complementary functions of the antiapoptotic protein A1 and serine/threonine kinase pim-1 in the BCR/ABL-mediated leukemogenesis. *Blood* **99**, 4531-9 (2002).
26. Horita M, Andreu EJ, Benito A, Arbona C, Sanz C, Benet I, Prosper F und Fernandez-Luna JL. Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL. *J Exp Med* **191**, 977-84 (2000).
27. Reuther JY, Reuther GW, Cortez D, Pendergast AM und Baldwin AS, Jr. A requirement for NF-kappaB activation in Bcr-Abl-mediated transformation. *Genes Dev* **12**, 968-81 (1998).
28. Puil L, Liu J, Gish G, Mbamalu G, Bowtell D, Pelicci PG, Arlinghaus R und Pawson T. Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *EMBO J* **13**, 764-73 (1994).
29. Pendergast AM, Quilliam LA, Cripe LD, Bassing CH, Dai Z, Li N, Batzer A, Rabun KM, Der CJ, Schlessinger J und et al. BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell* **75**, 175-85 (1993).
30. Sattler M, Mohi MG, Pride YB, Quinnan LR, Malouf NA, Podar K, Gesbert F, Iwasaki H, Li S, Van Etten RA, Gu H, Griffin JD und Neel BG. Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL. *Cancer Cell* **1**, 479-92 (2002).
31. Kosako H, Gotoh Y, Matsuda S, Ishikawa M und Nishida E. Xenopus MAP kinase activator is a serine/threonine/tyrosine kinase activated by threonine phosphorylation. *EMBO J* **11**, 2903-8 (1992).
32. Zheng CF und Guan KL. Dephosphorylation and inactivation of the mitogen-activated protein kinase by a mitogen-induced Thr/Tyr protein phosphatase. *J Biol Chem* **268**, 16116-9 (1993).

33. Fang ZH, Dong CL, Chen Z, Zhou B, Liu N, Lan HF, Liang L, Liao WB, Zhang L und Han ZC. Transcriptional regulation of survivin by c-Myc in BCR/ABL-transformed cells: implications in antileukemic strategy. *J Cell Mol Med* (2008).
34. Lidonnici MR, Corradini F, Waldron T, Bender TP und Calabretta B. Requirement of c-Myb for p210(BCR/ABL)-dependent transformation of hematopoietic progenitors and leukemogenesis. *Blood* **111**, 4771-9 (2008).
35. Kebache S, Ash J, Annis MG, Hagan J, Huber M, Hassard J, Stewart CL, Whiteway M und Nantel A. Grb10 and active Raf-1 kinase promote Bad-dependent cell survival. *J Biol Chem* **282**, 21873-83 (2007).
36. Daum G, Eisenmann-Tappe I, Fries HW, Troppmair J und Rapp UR. The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem Sci* **19**, 474-80 (1994).
37. Winer MA und Wolgemuth DJ. The segment-specific pattern of A-raf expression in the mouse epididymis is regulated by testicular factors. *Endocrinology* **136**, 2561-72 (1995).
38. Storm SM, Cleveland JL und Rapp UR. Expression of raf family proto-oncogenes in normal mouse tissues. *Oncogene* **5**, 345-51 (1990).
39. Pritchard CA, Bolin L, Slattery R, Murray R und McMahon M. Post-natal lethality and neurological and gastrointestinal defects in mice with targeted disruption of the A-Raf protein kinase gene. *Curr Biol* **6**, 614-7 (1996).
40. Wojnowski L, Zimmer AM, Beck TW, Hahn H, Bernal R, Rapp UR und Zimmer A. Endothelial apoptosis in Braf-deficient mice. *Nat Genet* **16**, 293-7 (1997).
41. Wojnowski L, Stancato LF, Zimmer AM, Hahn H, Beck TW, Larner AC, Rapp UR und Zimmer A. Craf-1 protein kinase is essential for mouse development. *Mech Dev* **76**, 141-9 (1998).

42. Mikula M, Schreiber M, Husak Z, Kucerova L, Ruth J, Wieser R, Zatloukal K, Beug H, Wagner EF und Baccarini M. Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf-1 gene. *EMBO J* **20**, 1952-62 (2001).
43. Raitano AB, Whang YE und Sawyers CL. Signal transduction by wild-type and leukemogenic Abl proteins. *Biochim Biophys Acta* **1333**, F201-16 (1997).
44. Sattler M, Salgia R, Okuda K, Uemura N, Durstin MA, Pisick E, Xu G, Li JL, Prasad KV und Griffin JD. The proto-oncogene product p120CBL and the adaptor proteins CRKL and c-CRK link c-ABL, p190BCR/ABL and p210BCR/ABL to the phosphatidylinositol-3' kinase pathway. *Oncogene* **12**, 839-46 (1996).
45. Oda T, Heaney C, Hagopian JR, Okuda K, Griffin JD und Druker BJ. Crkl is the major tyrosine-phosphorylated protein in neutrophils from patients with chronic myelogenous leukemia. *J Biol Chem* **269**, 22925-8 (1994).
46. Toker A und Cantley LC. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* **387**, 673-6 (1997).
47. Cantley LC und Neel BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4240-5 (1999).
48. Kharas MG und Fruman DA. ABL oncogenes and phosphoinositide 3-kinase: mechanism of activation and downstream effectors. *Cancer Res* **65**, 2047-53 (2005).
49. Chan TO und Tsichlis PN. PDK2: a complex tail in one Akt. *Sci STKE* **2001**, pe1 (2001).
50. Anderson KE, Coadwell J, Stephens LR und Hawkins PT. Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B. *Curr Biol* **8**, 684-91 (1998).

51. Andjelkovic M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJ, Frech M, Cron P, Cohen P, Lucocq JM und Hemmings BA. Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem* **272**, 31515-24 (1997).
52. Kandel ES und Hay N. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res* **253**, 210-29 (1999).
53. Jahn T, Seipel P, Urschel S, Peschel C und Duyster J. Role for the adaptor protein Grb10 in the activation of Akt. *Mol Cell Biol* **22**, 979-91 (2002).
54. Urschel S, Bassermann F, Bai RY, Munch S, Peschel C und Duyster J. Phosphorylation of grb10 regulates its interaction with 14-3-3. *J Biol Chem* **280**, 16987-93 (2005).
55. Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T und Korsmeyer SJ. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* **8**, 705-11 (2001).
56. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB und Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**, 727-30 (2001).
57. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y und Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**, 231-41 (1997).
58. del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R und Nunez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* **278**, 687-9 (1997).
59. Blume-Jensen P, Janknecht R und Hunter T. The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Curr Biol* **8**, 779-82 (1998).

60. Eves EM, Xiong W, Bellacosa A, Kennedy SG, Tschlis PN, Rosner MR und Hay N. Akt, a target of phosphatidylinositol 3-kinase, inhibits apoptosis in a differentiating neuronal cell line. *Mol Cell Biol* **18**, 2143-52 (1998).
61. Harada H, Andersen JS, Mann M, Terada N und Korsmeyer SJ. p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9666-70 (2001).
62. Harada H, Becknell B, Wilm M, Mann M, Huang LJ, Taylor SS, Scott JD und Korsmeyer SJ. Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. *Mol Cell* **3**, 413-22 (1999).
63. Virdee K, Parone PA und Tolkovsky AM. Phosphorylation of the pro-apoptotic protein BAD on serine 155, a novel site, contributes to cell survival. *Curr Biol* **10**, R883 (2000).
64. Houslay MD. A RSK(y) relationship with promiscuous PKA. *Sci STKE* **2006**, pe32 (2006).
65. Nantel A, Mohammad-Ali K, Sherk J, Posner BI und Thomas DY. Interaction of the Grb10 adapter protein with the Raf1 and MEK1 kinases. *J Biol Chem* **273**, 10475-84 (1998).
66. Nantel A, Huber M und Thomas DY. Localization of endogenous Grb10 to the mitochondria and its interaction with the mitochondrial-associated Raf-1 pool. *J Biol Chem* **274**, 35719-24 (1999).
67. Bai RY, Jahn T, Schrem S, Munzert G, Weidner KM, Wang JY und Duyster J. The SH2-containing adapter protein GRB10 interacts with BCR-ABL. *Oncogene* **17**, 941-8 (1998).

68. Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Muller M, Druker BJ und Lydon NB. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res* **56**, 100-4 (1996).
69. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J und Lydon NB. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* **2**, 561-6 (1996).
70. Okuda K, Weisberg E, Gilliland DG und Griffin JD. ARG tyrosine kinase activity is inhibited by STI571. *Blood* **97**, 2440-8 (2001).
71. Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, Stover D, Ohno-Jones S, Druker BJ und Lydon NB. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **295**, 139-45 (2000).
72. Heinrich MC, Griffith DJ, Druker BJ, Wait CL, Ott KA und Zigler AJ. Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood* **96**, 925-32 (2000).
73. Apperley JF, Gardembas M, Melo JV, Russell-Jones R, Bain BJ, Baxter EJ, Chase A, Chessells JM, Colombat M, Dearden CE, Dimitrijevic S, Mahon FX, Marin D, Nikolova Z, Olavarria E, Silbermann S, Schultheis B, Cross NC und Goldman JM. Response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloproliferative diseases with rearrangements of the platelet-derived growth factor receptor beta. *N Engl J Med* **347**, 481-7 (2002).
74. Gambacorti-Passerini C, Piazza R und D'Incalci M. Bcr-Abl mutations, resistance to imatinib, and imatinib plasma levels. *Blood* **102**, 1933-4; author reply 1934-5 (2003).

75. Nagar B, Bornmann WG, Pellicena P, Schindler T, Veach DR, Miller WT, Clarkson B und Kuriyan J. Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res* **62**, 4236-43 (2002).
76. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, Cornelissen JJ, Fischer T, Hochhaus A, Hughes T, Lechner K, Nielsen JL, Rousset P, Reiffers J, Saglio G, Shepherd J, Simonsson B, Gratwohl A, Goldman JM, Kantarjian H, Taylor K, Verhoef G, Bolton AE, Capdeville R und Druker BJ. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **348**, 994-1004 (2003).
77. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, Capdeville R und Talpaz M. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* **344**, 1038-42 (2001).
78. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S und Sawyers CL. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **344**, 1031-7 (2001).
79. Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F, Schiffer C, Gambacorti-Passerini C, Niederwieser D, Resta D, Capdeville R, Zoellner U, Talpaz M, Druker B, Goldman J, O'Brien SG, Russell N, Fischer T, Ottmann O, Cony-Makhoul P, Facon T, Stone R, Miller C, Tallman M, Brown R, Schuster M, Loughran T, Gratwohl A, Mandelli F, Saglio G, Lazzarino M, Russo D, Baccarani M und Morra E. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* **346**, 645-52 (2002).
80. Talpaz M, Silver RT, Druker BJ, Goldman JM, Gambacorti-Passerini C, Guilhot F, Schiffer CA, Fischer T, Deininger MW, Lennard AL, Hochhaus A, Ottmann OG, Gratwohl A, Baccarani M, Stone R, Tura S, Mahon FX, Fernandes-Reese S, Gathmann

- I, Capdeville R, Kantarjian HM und Sawyers CL. Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. *Blood* **99**, 1928-37 (2002).
81. Sawyers CL, Hochhaus A, Feldman E, Goldman JM, Miller CB, Ottmann OG, Schiffer CA, Talpaz M, Guilhot F, Deininger MW, Fischer T, O'Brien SG, Stone RM, Gambacorti-Passerini CB, Russell NH, Reiffers JJ, Shea TC, Chapuis B, Coutre S, Tura S, Morra E, Larson RA, Saven A, Peschel C, Gratwohl A, Mandelli F, Ben-Am M, Gathmann I, Capdeville R, Paquette RL und Druker BJ. Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood* **99**, 3530-9 (2002).
82. Kantarjian HM, Cortes J, O'Brien S, Giles FJ, Albitar M, Rios MB, Shan J, Faderl S, Garcia-Manero G, Thomas DA, Resta D und Talpaz M. Imatinib mesylate (STI571) therapy for Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in blast phase. *Blood* **99**, 3547-53 (2002).
83. Deininger M, O'Brien SG, Guilhot F, Goldman JM, Hochhaus A, Hughes TP, Radich JP, Hatfield AK, Mone M, Filian J, Reynolds J, Gathmann I, Larson RA und Druker BJ. International Randomized Study of Interferon Vs STI571 (IRIS) 8-Year Follow up: Sustained Survival and Low Risk for Progression or Events in Patients with Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CML-CP) Treated with Imatinib. in *51st ASH Annual Meeting and Exposition* (New Orleans, LA, USA, 2009).
84. Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O und Jones JD. A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* **312**, 436-9 (2006).
85. Waterhouse PM, Wang MB und Lough T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* **411**, 834-42 (2001).

86. Tabara H, Sarkissian M, Kelly WG, Fleenor J, Grishok A, Timmons L, Fire A und Mello CC. The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* **99**, 123-32 (1999).
87. Montgomery MK und Fire A. Double-stranded RNA as a mediator in sequence-specific genetic silencing and co-suppression. *Trends Genet* **14**, 255-8 (1998).
88. Katiyar-Agarwal S, Morgan R, Dahlbeck D, Borsani O, Villegas A, Jr., Zhu JK, Staskawicz BJ und Jin H. A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 18002-7 (2006).
89. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE und Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-11 (1998).
90. Cai X, Hagedorn CH und Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* **10**, 1957-66 (2004).
91. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH und Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* **23**, 4051-60 (2004).
92. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S und Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415-9 (2003).
93. Yi R, Qin Y, Macara IG und Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* **17**, 3011-6 (2003).
94. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE und Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **303**, 95-8 (2004).
95. Zeng Y und Cullen BR. Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res* **32**, 4776-85 (2004).

96. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM und Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363-6 (2001).
97. Schwarz DS, Hutvagner G, Haley B und Zamore PD. Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the Drosophila and human RNAi pathways. *Mol Cell* **10**, 537-48 (2002).
98. Zeng Y, Yi R und Cullen BR. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9779-84 (2003).
99. Yekta S, Shih IH und Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* **304**, 594-6 (2004).
100. Hutvagner G und Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* **297**, 2056-60 (2002).
101. Cullen BR. Viruses and microRNAs. *Nat Genet* **38 Suppl**, S25-30 (2006).
102. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K und Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-8 (2001).
103. Brummelkamp TR, Bernards R und Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**, 550-3 (2002).
104. Devroe E und Silver PA. Retrovirus-delivered siRNA. *BMC Biotechnol* **2**, 15 (2002).
105. Tiscornia G, Singer O, Ikawa M und Verma IM. A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 1844-8 (2003).
106. Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, Rooney DL, Zhang M, Ihrig MM, McManus MT, Gertler FB, Scott ML und Van Parijs L. A

- lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* **33**, 401-6 (2003).
107. Xia H, Mao Q, Paulson HL und Davidson BL. siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol* **20**, 1006-10 (2002).
108. Dickins RA, Hemann MT, Zilfou JT, Simpson DR, Ibarra I, Hannon GJ und Lowe SW. Probing tumor phenotypes using stable and regulated synthetic microRNA precursors. *Nat Genet* **37**, 1289-95 (2005).
109. Dickins RA, McJunkin K, Hernando E, Premsrirut PK, Krizhanovsky V, Burgess DJ, Kim SY, Cordon-Cardo C, Zender L, Hannon GJ und Lowe SW. Tissue-specific and reversible RNA interference in transgenic mice. *Nat Genet* **39**, 914-21 (2007).
110. Zeng Y, Wagner EJ und Cullen BR. Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol Cell* **9**, 1327-33 (2002).
111. Wendel HG, de Stanchina E, Cepero E, Ray S, Emig M, Fridman JS, Veach DR, Bornmann WG, Clarkson B, McCombie WR, Kogan SC, Hochhaus A und Lowe SW. Loss of p53 impedes the antileukemic response to BCR-ABL inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 7444-9 (2006).
112. Rodriguez-Tarduchy G, Collins M und Lopez-Rivas A. Regulation of apoptosis in interleukin-3-dependent hemopoietic cells by interleukin-3 and calcium ionophores. *EMBO J* **9**, 2997-3002 (1990).
113. Jin A, Kurosu T, Tsuji K, Mizuchi D, Arai A, Fujita H, Hattori M, Minato N und Miura O. BCR/ABL and IL-3 activate Rap1 to stimulate the B-Raf/MEK/Erk and Akt signaling pathways and to regulate proliferation, apoptosis, and adhesion. *Oncogene* **25**, 4332-40 (2006).

114. Zhang X und Ren R. Bcr-Abl efficiently induces a myeloproliferative disease and production of excess interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in mice: a novel model for chronic myelogenous leukemia. *Blood* **92**, 3829-40 (1998).
115. Schwaller J, Frantsve J, Aster J, Williams IR, Tomasson MH, Ross TS, Peeters P, Van Rompaey L, Van Etten RA, Ilaria R, Jr., Marynen P und Gilliland DG. Transformation of hematopoietic cell lines to growth-factor independence and induction of a fatal myelo- and lymphoproliferative disease in mice by retrovirally transduced TEL/JAK2 fusion genes. *EMBO J* **17**, 5321-33 (1998).
116. Tomasson MH, Sternberg DW, Williams IR, Carroll M, Cain D, Aster JC, Ilaria RL, Jr., Van Etten RA und Gilliland DG. Fatal myeloproliferation, induced in mice by TEL/PDGFBetaR expression, depends on PDGFBetaR tyrosines 579/581. *J Clin Invest* **105**, 423-32 (2000).
117. Li S, Ilaria RL, Jr., Million RP, Daley GQ und Van Etten RA. The P190, P210, and P230 forms of the BCR/ABL oncogene induce a similar chronic myeloid leukemia-like syndrome in mice but have different lymphoid leukemogenic activity. *J Exp Med* **189**, 1399-412 (1999).
118. Li MZ und Elledge SJ. Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC. *Nat Methods* **4**, 251-6 (2007).
119. Michor F, Hughes TP, Iwasa Y, Branford S, Shah NP, Sawyers CL und Nowak MA. Dynamics of chronic myeloid leukaemia. *Nature* **435**, 1267-70 (2005).
120. Roeder I, Horn M, Glauche I, Hochhaus A, Mueller MC und Loeffler M. Dynamic modeling of imatinib-treated chronic myeloid leukemia: functional insights and clinical implications. *Nat Med* **12**, 1181-4 (2006).
121. Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, La Rosee P, Muller MC, Lahaye T, Hanfstein B, Schoch C, Cross NC, Berger U, Gschaidmeier H, Druker BJ und Hehlmann R.

- Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia* **16**, 2190-6 (2002).
122. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN und Sawyers CL. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* **293**, 876-80 (2001).
123. Cortes J, Jabbour E, Kantarjian H, Yin CC, Shan J, O'Brien S, Garcia-Manero G, Giles F, Breeden M, Reeves N, Wierda WG und Jones D. Dynamics of BCR-ABL kinase domain mutations in chronic myeloid leukemia after sequential treatment with multiple tyrosine kinase inhibitors. *Blood* **110**, 4005-11 (2007).
124. Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B und Kuriyan J. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* **289**, 1938-42 (2000).
125. Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, Gorre ME, Paquette RL, Kuriyan J und Sawyers CL. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* **2**, 117-25 (2002).
126. Hantschel O, Nagar B, Guettler S, Kretzschmar J, Dorey K, Kuriyan J und Superti-Furga G. A myristoyl/phosphotyrosine switch regulates c-Abl. *Cell* **112**, 845-57 (2003).
127. Azam M, Latek RR und Daley GQ. Mechanisms of autoinhibition and STI-571/imatinib resistance revealed by mutagenesis of BCR-ABL. *Cell* **112**, 831-43 (2003).

128. Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, Branford S, Radich J, Kaeda J, Baccarani M, Cortes J, Cross NC, Druker BJ, Gabert J, Grimwade D, Hehlmann R, Kamel-Reid S, Lipton JH, Longtine J, Martinelli G, Saglio G, Soverini S, Stock W und Goldman JM. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* **108**, 28-37 (2006).
129. le Coutre P, Tassi E, Varella-Garcia M, Barni R, Mologni L, Cabrita G, Marchesi E, Supino R und Gambacorti-Passerini C. Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification. *Blood* **95**, 1758-66 (2000).
130. Gambacorti-Passerini C, Barni R, le Coutre P, Zucchetti M, Cabrita G, Cleris L, Rossi F, Gianazza E, Brueggen J, Cozens R, Pioltelli P, Pogliani E, Corneo G, Formelli F und D'Incalci M. Role of alpha1 acid glycoprotein in the in vivo resistance of human BCR-ABL(+) leukemic cells to the abl inhibitor STI571. *J Natl Cancer Inst* **92**, 1641-50 (2000).
131. Mahon FX, Deininger MW, Schultheis B, Chabrol J, Reiffers J, Goldman JM und Melo JV. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood* **96**, 1070-9 (2000).
132. Thomas J, Wang L, Clark RE und Pirmohamed M. Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. *Blood* **104**, 3739-45 (2004).
133. Crossman LC, Druker BJ, Deininger MW, Pirmohamed M, Wang L und Clark RE. hOCT 1 and resistance to imatinib. *Blood* **106**, 1133-4; author reply 1134 (2005).

134. Jiang X, Stuible M, Chalandon Y, Li A, Chan WY, Eisterer W, Krystal G, Eaves A und Eaves C. Evidence for a positive role of SHIP in the BCR-ABL-mediated transformation of primitive murine hematopoietic cells and in human chronic myeloid leukemia. *Blood* **102**, 2976-84 (2003).
135. Klejman A, Rushen L, Morrione A, Slupianek A und Skorski T. Phosphatidylinositol-3 kinase inhibitors enhance the anti-leukemia effect of STI571. *Oncogene* **21**, 5868-76 (2002).
136. Peters DG, Hoover RR, Gerlach MJ, Koh EY, Zhang H, Choe K, Kirschmeier P, Bishop WR und Daley GQ. Activity of the farnesyl protein transferase inhibitor SCH66336 against BCR/ABL-induced murine leukemia and primary cells from patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* **97**, 1404-12 (2001).
137. Yu C, Krystal G, Dent P und Grant S. Flavopiridol potentiates STI571-induced mitochondrial damage and apoptosis in BCR-ABL-positive human leukemia cells. *Clin Cancer Res* **8**, 2976-84 (2002).
138. Peng C, Chen Y, Yang Z, Zhang H, Osterby L, Rosmarin AG und Li S. PTEN is a tumor suppressor in CML stem cells and BCR-ABL-induced leukemias in mice. *Blood* **115**, 626-35 (2010).
139. Di Cristofano A, Niki M, Zhao M, Karnell FG, Clarkson B, Pear WS, Van Aelst L und Pandolfi PP. p62(dok), a negative regulator of Ras and mitogen-activated protein kinase (MAPK) activity, opposes leukemogenesis by p210(bcr-abl). *J Exp Med* **194**, 275-84 (2001).
140. Williams RT, Roussel MF und Sherr CJ. Arf gene loss enhances oncogenicity and limits imatinib response in mouse models of Bcr-Abl-induced acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 6688-93 (2006).

141. Dierks C, Beigi R, Guo GR, Zirlik K, Stegert MR, Manley P, Trussell C, Schmitt-Graeff A, Landwerlin K, Veelken H und Warmuth M. Expansion of Bcr-Abl-positive leukemic stem cells is dependent on Hedgehog pathway activation. *Cancer Cell* **14**, 238-49 (2008).
142. Ghaffari S, Kitidis C, Fleming MD, Neubauer H, Pfeffer K und Lodish HF. Erythropoiesis in the absence of janus-kinase 2: BCR-ABL induces red cell formation in JAK2(-/-) hematopoietic progenitors. *Blood* **98**, 2948-57 (2001).
143. Wagner K, Zhang P, Rosenbauer F, Drescher B, Kobayashi S, Radomska HS, Kutok JL, Gilliland DG, Krauter J und Tenen DG. Absence of the transcription factor CCAAT enhancer binding protein alpha results in loss of myeloid identity in bcr/abl-induced malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 6338-43 (2006).
144. Zhou LL, Zhao Y, Ringrose A, DeGeer D, Kennah E, Lin AE, Sheng G, Li XJ, Turhan A und Jiang X. AHI-1 interacts with BCR-ABL and modulates BCR-ABL transforming activity and imatinib response of CML stem/progenitor cells. *J Exp Med* **205**, 2657-71 (2008).
145. Peng C, Chen Y, Yang Z, Zhang H, Osterby L, Rosmarin AG und Li S. PTEN is a tumor suppressor in CML stem cells and BCR-ABL-induced leukemias in mice. *Blood* **115**, 626-35.
146. Silva JM, Li MZ, Chang K, Ge W, Golding MC, Rickles RJ, Siolas D, Hu G, Paddison PJ, Schlabach MR, Sheth N, Bradshaw J, Burchard J, Kulkarni A, Cavet G, Sachidanandam R, McCombie WR, Cleary MA, Elledge SJ und Hannon GJ. Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes. *Nat Genet* **37**, 1281-8 (2005).
147. Stegmeier F, Hu G, Rickles RJ, Hannon GJ und Elledge SJ. A lentiviral microRNA-based system for single-copy polymerase II-regulated RNA interference in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 13212-7 (2005).

148. Zeng Y, Cai X und Cullen BR. Use of RNA polymerase II to transcribe artificial microRNAs. *Methods Enzymol* **392**, 371-80 (2005).
149. Dickins RA, Hemann MT, Zilfou JT, Simpson DR, Ibarra I, Hannon GJ und Lowe SW. Probing tumor phenotypes using stable and regulated synthetic microRNA precursors. *Nature genetics* **37**, 1289-95 (2005).
150. Szulc J, Wiznerowicz M, Sauvain MO, Trono D und Aebischer P. A versatile tool for conditional gene expression and knockdown. *Nat Methods* **3**, 109-16 (2006).
151. Sankpal NV, Fleming TP und Gillanders WE. Dual Expression Lentiviral Vectors for Concurrent RNA Interference and Rescue. *J Surg Res* (2009).
152. Skorski T, Nieborowska-Skorska M, Szczylik C, Kanakaraj P, Perrotti D, Zon G, Gewirtz A, Perussia B und Calabretta B. C-RAF-1 serine/threonine kinase is required in BCR/ABL-dependent and normal hematopoiesis. *Cancer Res* **55**, 2275-8 (1995).
153. Scheid MP, Schubert KM und Duronio V. Regulation of bad phosphorylation and association with Bcl-x(L) by the MAPK/Erk kinase. *J Biol Chem* **274**, 31108-13 (1999).
154. Luciano F, Jacquel A, Colosetti P, Herrant M, Cagnol S, Pages G und Auberger P. Phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on serine 69 promotes its degradation via the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function. *Oncogene* **22**, 6785-93 (2003).
155. Harada H, Quearry B, Ruiz-Vela A und Korsmeyer SJ. Survival factor-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylates BIM, inhibiting its association with BAX and proapoptotic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15313-7 (2004).

156. Kometani K, Aoki M, Kawamata S, Shinozuka Y, Era T, Taniwaki M, Hattori M und Minato N. Role of SPA-1 in phenotypes of chronic myelogenous leukemia induced by BCR-ABL-expressing hematopoietic progenitors in a mouse model. *Cancer Res* **66**, 9967-76 (2006).
157. Kurachi H, Wada Y, Tsukamoto N, Maeda M, Kubota H, Hattori M, Iwai K und Minato N. Human SPA-1 gene product selectively expressed in lymphoid tissues is a specific GTPase-activating protein for Rap1 and Rap2. Segregate expression profiles from a rap1GAP gene product. *J Biol Chem* **272**, 28081-8 (1997).
158. Vossler MR, Yao H, York RD, Pan MG, Rim CS und Stork PJ. cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell* **89**, 73-82 (1997).
159. Wang L, Liu F und Adamo ML. Cyclic AMP inhibits extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathways by inhibiting Rap1. *J Biol Chem* **276**, 37242-9 (2001).
160. Christian SL, Lee RL, McLeod SJ, Burgess AE, Li AH, Dang-Lawson M, Lin KB und Gold MR. Activation of the Rap GTPases in B lymphocytes modulates B cell antigen receptor-induced activation of Akt but has no effect on MAPK activation. *J Biol Chem* **278**, 41756-67 (2003).
161. Margolis B, Silvennoinen O, Comoglio F, Roonprapunt C, Skolnik E, Ullrich A und Schlessinger J. High-efficiency expression/cloning of epidermal growth factor-receptor-binding proteins with Src homology 2 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 8894-8 (1992).
162. Daly RJ, Sanderson GM, Janes PW und Sutherland RL. Cloning and characterization of GRB14, a novel member of the GRB7 gene family. *J Biol Chem* **271**, 12502-10 (1996).

163. Ooi J, Yajnik V, Immanuel D, Gordon M, Moskow JJ, Buchberg AM und Margolis B. The cloning of Grb10 reveals a new family of SH2 domain proteins. *Oncogene* **10**, 1621-30 (1995).
164. Pandey A, Duan H, Di Fiore PP und Dixit VM. The Ret receptor protein tyrosine kinase associates with the SH2-containing adapter protein Grb10. *J Biol Chem* **270**, 21461-3 (1995).
165. Liu F und Roth RA. Grb-IR: a SH2-domain-containing protein that binds to the insulin receptor and inhibits its function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10287-91 (1995).
166. Hansen H, Svensson U, Zhu J, Laviola L, Giorgino F, Wolf G, Smith RJ und Riedel H. Interaction between the Grb10 SH2 domain and the insulin receptor carboxyl terminus. *J Biol Chem* **271**, 8882-6 (1996).
167. Morrione A, Valentinis B, Li S, Ooi JY, Margolis B und Baserga R. Grb10: A new substrate of the insulin-like growth factor I receptor. *Cancer Res* **56**, 3165-7 (1996).
168. Dey BR, Frick K, Lopaczynski W, Nissley SP und Furlanetto RW. Evidence for the direct interaction of the insulin-like growth factor I receptor with IRS-1, Shc, and Grb10. *Mol Endocrinol* **10**, 631-41 (1996).
169. Dong LQ, Farris S, Christal J und Liu F. Site-directed mutagenesis and yeast two-hybrid studies of the insulin and insulin-like growth factor-1 receptors: the Src homology-2 domain-containing protein hGrb10 binds to the autophosphorylated tyrosine residues in the kinase domain of the insulin receptor. *Mol Endocrinol* **11**, 1757-65 (1997).
170. Dong LQ, Du H, Porter SG, Kolakowski LF, Jr., Lee AV, Mandarino LJ, Fan J, Yee D und Liu F. Cloning, chromosome localization, expression, and characterization of an Src homology 2 and pleckstrin homology domain-containing insulin receptor binding protein hGrb10gamma. *J Biol Chem* **272**, 29104-12 (1997).

171. Wang J, Dai H, Yousaf N, Moussaif M, Deng Y, Boufelliga A, Swamy OR, Leone ME und Riedel H. Grb10, a positive, stimulatory signaling adapter in platelet-derived growth factor BB-, insulin-like growth factor I-, and insulin-mediated mitogenesis. *Mol Cell Biol* **19**, 6217-28 (1999).
172. Stein E, Cerretti DP und Daniel TO. Ligand activation of ELK receptor tyrosine kinase promotes its association with Grb10 and Grb2 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* **271**, 23588-93 (1996).
173. Moutoussamy S, Renaudie F, Lago F, Kelly PA und Finidori J. Grb10 identified as a potential regulator of growth hormone (GH) signaling by cloning of GH receptor target proteins. *J Biol Chem* **273**, 15906-12 (1998).
174. Deng Y, Bhattacharya S, Swamy OR, Tandon R, Wang Y, Janda R und Riedel H. Growth factor receptor-binding protein 10 (Grb10) as a partner of phosphatidylinositol 3-kinase in metabolic insulin action. *J Biol Chem* **278**, 39311-22 (2003).
175. Morrione A, Plant P, Valentinis B, Staub O, Kumar S, Rotin D und Baserga R. mGrb10 interacts with Nedd4. *J Biol Chem* **274**, 24094-9 (1999).
176. Urschel S. Charakterisierung des Grb10/Akt Komplexes und Identifikation von 14-3-3 als neuen Interaktionspartner von Grb10 Technische Universität München (2003).
177. Wick KR, Werner ED, Langlais P, Ramos FJ, Dong LQ, Shoelson SE und Liu F. Grb10 inhibits insulin-stimulated insulin receptor substrate (IRS)-phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by disrupting the association of IRS-1/IRS-2 with the insulin receptor. *J Biol Chem* **278**, 8460-7 (2003).
178. Langlais P, Dong LQ, Ramos FJ, Hu D, Li Y, Quon MJ und Liu F. Negative regulation of insulin-stimulated mitogen-activated protein kinase signaling by Grb10. *Mol Endocrinol* **18**, 350-8 (2004).

179. Cohen SN, Chang AC, Boyer HW und Helling RB. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 3240-4 (1973).
180. Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I und Khorana HG. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol* **56**, 341-61 (1971).
181. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA und Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-4 (1985).
182. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G und Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, 263-73 (1986).
183. McConlogue L, Brow MA und Innis MA. Structure-independent DNA amplification by PCR using 7-deaza-2'-deoxyguanosine. *Nucleic Acids Res* **16**, 9869 (1988).
184. Schuchard M, Sarkar G, Ruesink T und Spelsberg TC. Two-step "hot" PCR amplification of GC-rich avian c-myc sequences. *Biotechniques* **14**, 390-4 (1993).
185. Moreau A, Duez C und Dusart J. Improvement of GC-rich template amplification by inverse PCR. *Biotechniques* **17**, 232-4 (1994).
186. Sarkar G, Kapelner S und Sommer SS. Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. *Nucleic Acids Res* **18**, 7465 (1990).
187. Bachmann B, Luke W und Hunsmann G. Improvement of PCR amplified DNA sequencing with the aid of detergents. *Nucleic Acids Res* **18**, 1309 (1990).
188. Winship PR. An improved method for directly sequencing PCR amplified material using dimethyl sulphoxide. *Nucleic Acids Res* **17**, 1266 (1989).

189. Bookstein R, Lai CC, To H und Lee WH. PCR-based detection of a polymorphic BamHI site in intron 1 of the human retinoblastoma (RB) gene. *Nucleic Acids Res* **18**, 1666 (1990).
190. Hung T, Mak K und Fong K. A specificity enhancer for polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* **18**, 4953 (1990).
191. Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H und Rajewsky K. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* **265**, 103-6 (1994).
192. Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W und Bujard H. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* **268**, 1766-9 (1995).
193. Berens C und Hillen W. Gene regulation by tetracyclines. Constraints of resistance regulation in bacteria shape TetR for application in eukaryotes. *Eur J Biochem* **270**, 3109-21 (2003).
194. Krueger C, Berens C, Schmidt A, Schnappinger D und Hillen W. Single-chain Tet transregulators. *Nucleic Acids Res* **31**, 3050-6 (2003).
195. No D, Yao TP und Evans RM. Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 3346-51 (1996).
196. Pear WS, Miller JP, Xu L, Pui JC, Soffer B, Quackenbush RC, Pendergast AM, Bronson R, Aster JC, Scott ML und Baltimore D. Efficient and rapid induction of a chronic myelogenous leukemia-like myeloproliferative disease in mice receiving P210 bcr/abl-transduced bone marrow. *Blood* **92**, 3780-92 (1998).
197. Lozzio CB und Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* **45**, 321-34 (1975).

198. Lundberg KS, Shoemaker DD, Adams MW, Short JM, Sorge JA und Mathur EJ. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* **108**, 1-6 (1991).
199. Sambrook J, Maniatis T und Fritsch EF. *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).
200. Chomczynski P und Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-9 (1987).
201. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL und Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-75 (1951).
202. Spain LM und Mulligan RC. Purification and characterization of retrovirally transduced hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 3790-4 (1992).

8 **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 2.1: Reziproke (9;22)-Translokation resultiert in der Bildung des Philadelphia-Chromosoms	5
Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von c-ABL, c-BCR und BCR-ABL	6
Abb. 2.3: Signalkaskaden des BCR-ABL Onkogens	7
Abb. 2.4: Schematische Darstellung der Proteine der Raf-Familie.....	9
Abb. 2.5: Schematische Darstellung des Adapterproteins Grb10	11
Abb. 2.6: Modell der Grb10-vermittelten Aktivierung von AKT.	12
Abb. 2.7: Die Rolle von Grb10 im mitochondrialen Apoptoseweg	12
Abb. 2.8: Chemische Formel von Imatinib mesylate	14
Abb. 2.9: Funktionsweise des BCR-ABL-Inhibitors Imatinib.....	15
Abb. 2.10: Prozessierung von microRNAs innerhalb der Zelle.....	17
Abb. 3.1: Untersuchung verschiedener Raf-1-spezifischer shRNAs auf ihre Suppressionseffizienz.....	22
Abb. 3.2: Retrovirale Vektoren zur dualen Expression einer targetspezifischen shRNA und eines Onkogens.	23
Abb. 3.3: Die Stammschleife der endogenen miR30 kann durch eine targetspezifische Sequenz ersetzt werden, um eine miR30-basierte shRNA zu generieren.	25
Abb. 3.4: Strukturvergleich zwischen konventioneller shRNA ^{TOI} und miR ^{TOI}	25
Abb. 3.5: miR30-basierte weisen eine sehr starke und verlässliche Suppressionseffizienz auf und sind effektiver als konventionelle shRNAs.	27
Abb. 3.6: UV-induzierte Stabilisierung von p53 kann durch eine miR ^{p53} gehemmt werden.	28
Abb. 3.7: Durchflusszytometrische Sortierung von doppelinfizierten Knochenmarkzellen. .	29

Abb. 3.8: Raf-1 ist erforderlich für die Bildung transformierter Kolonien im Knochenmark-Methylzellulose-Assay.	29
Abb. 3.9: Prozessierung des Provirus zu miR ^{TOI} , BCR-ABL-Protein und GFP.	31
Abb. 3.10: Das retrovirale Konstrukt ermöglicht gleichzeitige Depletion des Targets und Überexpression des BCR-ABL-Onkogens.	32
Abb. 3.11: Raf-1-Suppression unterbricht die BCR-ABL abhängige ERK Aktivierung in myeloiden und lymphoiden Zelllinien.	33
Abb. 3.12: Raf-1-Suppression ist dauerhaft und stabil, auch unter Selektionsdruck.	34
Abb. 3.13: pMmiR ^{TOI} -BCR-ABL ist funktionell in murinen primären Knochenmarkzellen.	36
Abb. 3.14: Die BCR-ABL abhängige ERK2-Phosphorylierung ist in primären pMmiR ^{Raf-1} -BCR-ABL-transduzierten Knochenmarkzellen reduziert.	36
Abb. 3.15: Raf-1 ist erforderlich für die Transformation von BCR-ABL-positiven Knochenmarkzellen im Methylzellulose-Assay.	37
Abb. 3.16: pMmiR ^{BRAF} -BCR-ABL ist funktionell in Ba/F3 Zellen.	38
Abb. 3.17: Raf-1 jedoch nicht BRAF ist erforderlich für die Transformation von BCR-ABL-positiven Knochenmarkzellen im Methylzellulose-Assay.	39
Abb. 3.18: Schematische Darstellung des murinen Knochenmarktransplantationsmodells. ...	41
Abb. 3.19: Generierung und Titration eines BCR-ABL und miR ^{TOI} -tragenden Retrovirus und retroviraler Transfer von diesem Konstrukt in murines Knochenmark.	42
Abb. 3.20: Einfluss der Raf-1-Suppression auf den Verlauf der Leukozytenwerte im peripheren Blut nach Transplantation.	43
Abb. 3.21: Einfluss der Raf-1-Suppression auf die Entwicklung einer BCR-ABL induzierten Splenomegalie.	44
Abb. 3.22: Raf-1 ist erforderlich für die Entwicklung einer BCR-ABL-abhängigen Granulozytose.	45
Abb. 3.23: Raf-1-Suppression resultiert in einer Verdoppelung des Gesamtüberlebens von Balb/C-Mäusen im BCR-ABL-Transplantationsmodell.	45
Abb. 3.24: qRT-PCR zur Analyse der p53 und der Raf-1-Suppression in leukämischen Zellen erkrankter Mäuse.	46
Abb. 3.25: Untersuchung einer Grb10-spezifischen miR auf ihre Suppressionseffizienz.	47
Abb. 3.26: pMmiR ^{Grb10} -BCR-ABL ist in NIH/3T3-, Ba/F3-, 32D- und primären murinen Knochenmarkzellen funktionell.	48

Abb. 3.27: Grb10 ist erforderlich für die Bildung transformierender Kolonien im Knochenmark-Methylzellulose-Assay	49
Abb. 3.28: Einfluss von Grb10-Suppression auf die BCR-ABL-induzierte Leukozytose.	50
Abb. 3.29: Grb10 ist erforderlich für die Entwicklung einer BCR-ABL-abhängigen Granulozytose	51
Abb. 3.30: Grb10-Suppression führt zu einer signifikanten Verlängerung des Gesamtüberlebens im BCR-ABL-Transplantationsmodell.....	51
Abb. 3.31: Klonierungsstrategie zur Generierung des Vektors pMmiR ^{TOI} -BCR-ABL mittels SLIC.	53

9 Danksagung

Besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Justus Duyster für die aktive Betreuung dieser Arbeit, insbesondere für die Diskussionsbereitschaft, seinen wissenschaftlichen Rat und für die wertvolle Möglichkeit, frei und unbedarft forschen zu dürfen.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Groll für das Interesse an dieser Arbeit und die freundliche Bereitschaft, diese Arbeit von Seiten der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zu betreuen.

Bei Herrn Prof. Dr. Christian Peschel möchte ich mich bedanken für die Möglichkeit, diese Dissertation im Hämatologischen Forschungslabor am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München anfertigen zu können.

Bedanken möchte ich mich insbesondere bei meiner Betreuerin und Freundin Frau Dr. Anna Lena Illert, die mir während der ganzen Jahre zur Seite stand. Sie hatte zu jeder Tages- oder Nachtzeit ein offenes Ohr für mich, sowohl bei fachlichen als auch persönlichen Fragen und mit ihr hat jeder Kongress gleich doppelt so viel Spaß gemacht. Danke für die vielen schönen und diskussionsreichen Abende.

Herrn Dr. Cornelius Miething danke ich herzlich für kreative Ideen bezüglich meines Projektes und dafür, dass er sich selbst in der Ferne bereitwillig mit meinen Problemen auseinandergesetzt hat.

Den Mitarbeitern des Tierstalls danke ich für die herausragende Betreuung der Mäuse.

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen des Hämatologischen Forschungslabors bedanken. Besonders erwähnen möchte ich Frau Petra Schenk, Frau Melanie Sickinger, Frau Melanie Thiede, Frau Dr. Rebekka Dechow, Frau Dr. Susanne Raulefs, Herrn Sivahari Gorantla und Herrn Richard Huss, die den Laboralltag stets versüßt haben und auch mit ihrem Fachwissen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Hannes bedanke ich mich von Herzen. Du hast mit mir die freudigen Momente geteilt, aber besonders musstest Du herhalten, wenn Murphys Gesetze es mal wieder nicht gut mit mir meinten. Danke, dass Du mich immer wieder motivierst und für mich da bist.

Mein größter Dank gilt allen voran meinen lieben Eltern Anke und Heinrich Albers und meiner Schwester Jasmin Crollly für Eure bedingungslose Unterstützung, für die Motivation in jeder Lebenslage und für das Vertrauen, das Ihr in mich habt und in das, was ich tue. Danke, dass es Euch gibt!

10 Publikationen

Albers C, Illert AL, Miething C, Leischner H, Peschel C and Duyster J. A single retroviral vector design for the simultaneous expression of a miR30-based shRNA with an oncogene – a versatile approach for the identification of crucial signaling targets in murine leukemia models. (submittiert)

Markova B, **Albers C**, Breitenbuecher F, Melo JV, Brummendorf TH, Heidel F, Lipka D, Duyster J, Huber C and Fischer T. Novel pathway in BCR-ABL signal transduction involves Akt-independent, PLC-gamma1-driven activation of mTOR/p70S6-kinase pathway. *Oncogene* **29**, 739-51 (2010)

Hartmann N, Leithäuser F, **Albers C**, Duyster J, Möller P, Debatin KM and Strauss. Alloantigen-specific CD95-resistant T cells mediate graft-versus tumor activity in the absence of graft-versus host disease. (submittiert)