

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III Großhadern  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. W. Hiddemann

**Das Fusionsprotein AML1-ETO inhibiert die PU.1-  
abhängige Transkription und führt bei der akuten  
myeloischen Leukämie mit Translokation t(8;21)  
zum Differenzierungsblock.**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
Marion Susanne Heiß-Neumann  
aus  
Straubing  
2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Hiddemann  
Prof. Dr. Peter B. Becker

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Georg W. Bornkamm  
Prof. Dr. Karl Sotlar

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Gerhard Behre

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Maximilian Reiser

Tag der mündlichen Prüfung: 09.10.2008

*Gewidmet*

*meiner „großen Oma“ und Jutta,  
die beide den Kampf gegen malignes Wachstum  
viel zu früh verloren haben...*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>6</b>
1.1	Epidemiologie und Klassifizierung der akuten myeloischen Leukämie.....	6
1.2	Physiologische Hämatopoese und Transkriptionsfaktoren.....	11
1.3	Pathogenese und molekulargenetische Veränderungen in der akuten myeloischen Leukämie .....	15
1.4	Translokation t(8;21) und das Fusionsprotein AML1-ETO .....	18
1.5	Ziele der Arbeit.....	22
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden</b> .....	<b>24</b>
2.1	Zellkultur.....	24
2.2	Transfektionen .....	26
2.3	Western Blot.....	31
2.4	Coimmunopräzipitation.....	36
2.5	GST-Protein-Interaktions Assay .....	38
2.6	Realtime PCR .....	41
2.7	Herstellernachweis Reagenzien und Materialien .....	44
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>45</b>
3.1	AML1-ETO beeinflusst PU.1-abhängige Transkription negativ .....	45
3.2	AML1-ETO benutzt für den beschriebenen Effekt keine Corepressoren.....	55
3.3	Physikalische Interaktion zwischen PU.1 und AML1-ETO .....	57
3.4	AML1-ETO vermindert die Transkriptionsaktivität des M-CSF-Rezeptor Promotors in myeloischen Zellen .....	61
3.5	Verminderte Expression des autoregulierten Proteins PU.1 .....	62
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>64</b>
4.1	Die Transaktivierungskapazität des Transkriptionsfaktors PU.1 wird durch das Fusionsprotein AML1-ETO blockiert .....	64

4.2	Das Fusionsprotein AML1-ETO stört die physiologische Differenzierung innerhalb der myeloischen Zellreihe und trägt so zur Leukämieentstehung bei.....	74
5	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>80</b>
6	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>82</b>
7	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>89</b>
8	<b>Danksagungen.....</b>	<b>93</b>
9	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>94</b>
10	<b>Erklärung nach §2.....</b>	<b>95</b>

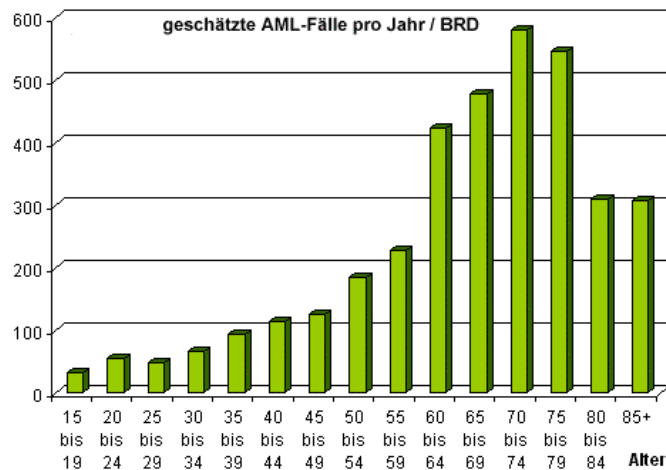
## 1 Einleitung

Leukämien stellen klonale Erkrankungen mit maligner Transformation hämatopoetischer Zellen dar. Es handelt sich um eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, die in chronische und akute, sowie myeloische und lymphatische Leukämien eingeteilt werden. Allen gemein ist ein gestörtes Proliferations- und Differenzierungsverhalten des betroffenen Zellklons, das Folge einer Reihe von genetischen Veränderungen ist. Die akute myeloische Leukämie (AML) entsteht durch klonale Expansion einer primitiven myeloischen Vorläuferzelle. Verschiedene erworbene genetische oder molekulare Aberrationen führen zu einer Akkumulation teilungsfähiger, aber abnormer, funktionell unreifer myeloischer Zellen in Blut und Knochenmark. Es resultiert das klinische Bild einer Verdrängung der normalen hämatopoetischen Zellpopulation mit Anämie, Thrombopenie und Granulozytopenie. Der von Virchow geprägte Begriff Leukämie (= weißes Blut) geht auf massiv erhöhte Leukozytenzahlen im Blutbild zurück, die sich im Falle einer Ausschwemmung der leukämischen Zellen in das periphere Blut finden.

### 1.1 Epidemiologie und Klassifizierung der akuten myeloischen Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) tritt in den USA mit einer Häufigkeit von 3,5 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner und Jahr auf und bildet mit 80% den Hauptanteil an akuten Leukämien im Erwachsenenalter. Der Altersmedian liegt bei 63 Jahren und die Inzidenz steigt deutlich mit dem Lebensalter auf über 15 Erkrankungen/100.000 Einwohner/Jahr. Es wurde ein Überwiegen des männlichen Geschlechts beobachtet (Inzidenz USA 4,3 vs. 2,9 bei Frauen).

Für die Bundesrepublik Deutschland ergibt sich daraus eine geschätzte Zahl an Neuerkrankungen von rund 3600 Fällen/Jahr. In der folgenden Abbildung nach Altersgruppen dargestellt<sup>1</sup>.



**Abbildung 1-1** Geschätzte Fälle von AML in der Bundesrepublik Deutschland auf Basis der dokumentierten Inzidenzen in den USA (SEER) und Daten des Statistischen Bundesamtes. Entnommen aus <http://leukaemie.krebsinfo.de>

Der Anteil der AML an allen malignen Erkrankungen macht 3% aus; zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr stellt sie die häufigste tödlich verlaufende Neoplasie dar. Für die Prognose der Erkrankung spielt neben dem Alter des Patienten, Leukozytenzahl und LDH bei Erstdiagnose, v.a der Karyotyp eine große Rolle. Klonale Chromosomenveränderungen kommen bei 50-60% der Erwachsenen und 75-85% der Kinder mit AML vor. Die Inzidenz der verschiedenen Aberrationen ist altersabhängig. Die prognostische Bedeutung einer Karyotypveränderung ist jedoch altersunabhängig. So stellt der Karyotyp der leukämischen Blasten derzeit den wichtigsten unabhängigen prognostischen Parameter bei der AML dar<sup>2,3</sup>.

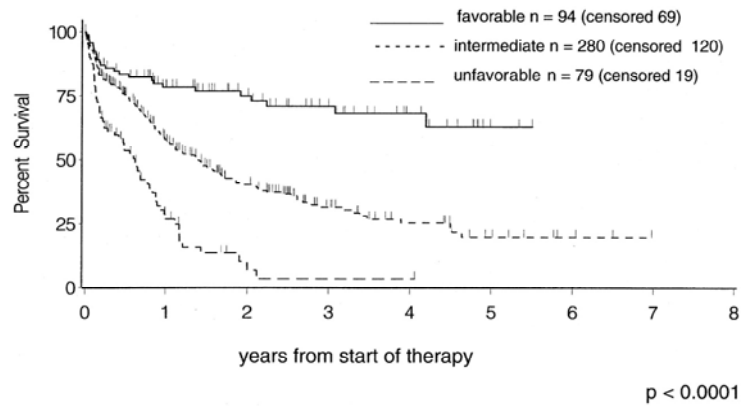
---

<sup>1</sup> Entnommen aus <http://leukaemie.krebsinfo.de> am 2.04.2007.

<sup>2</sup> (Haferlach, T et al., 2004: Genetic classification of acute myeloid leukemia (AML).)

<sup>3</sup> (Haferlach, T & Schoch, C, 2002: [Modern techniques in leukemia diagnosis].)

**Gesamtüberleben für Patienten mit *de-novo* AML eingeteilt anhand der zytogenetischen Risikogruppen**



- Favorable = t(8;21) +/- del(Y), t(15;17), inv(16), del(16)
- Intermediate = normaler Karyotyp
- Unfavorable = -5/5q-, -7/7q-, +11q23, inv(3), +3;3, komplexe Aberrationen

**Abbildung 1-2 Gesamtüberleben nach Risikogruppen definiert anhand des Karyotyps. Daten basieren auf einer Auswertung von insgesamt 614 Patienten von Haferlach et al.<sup>4</sup> Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Risikogruppen.**

Das pathogenetische Korrelat der akuten myeloischen Leukämien besteht in der Transformation einer frühen myeloischen Vorläuferzelle. Dementsprechend findet sich im Knochenmark der Patienten eine monomorphe Population von Blasten, d.h. unreifer Zellen mit großem Zellkern, deutlich sichtbarem Nukleolus und schmalen basophilem Zytoplasmasaum. Die häufig verwendete FAB-Klassifikation der AML aus dem Jahre 1976 bzw. in erweiterter Fassung von 1985 der French-American-British Cooperative Group fordert für die Diagnose der akuten myeloischen Leukämie einen Blastenanteil von mindestens 30% im Knochenmark. Die Einteilung in die Subtypen M0 bis M7 erfolgt anhand von

<sup>4</sup> (Haferlach, T et al., 2003: Morphologic dysplasia in de novo acute myeloid leukemia (AML) is related to unfavorable cytogenetics but has no independent prognostic relevance under the conditions of intensive induction therapy: results of a multiparameter analysis from the German AML Cooperative Group studies.)



Morphologie und Zytochemie und spiegelt die unterschiedlichen Ausreifungsstörungen wieder.

	Morphologie	Typische Translokation
<b>FAB M0</b>	AML mit minimaler Differenzierung	
<b>FAB M2</b>	akute myeloische Leukämie mit Ausreifung	t(8;21)
<b>FAB M3</b>	akute Promyelozytenleukämie	t(15;17)
<b>FAB M3V</b>	variante, mikrogranuläre Promyelozytenleukämie	t(15;17)
<b>FAB M4</b>	akute myelomonozytäre Leukämie	
<b>FAB M4Eo</b>	entsprechende Leukämien mit Eosinophilie	inv(16)
<b>FAB M5b</b>	reife akute monozytäre Leukämie	
<b>FAB M6</b>	akute Erythroleukämie	
<b>FAB M7</b>	akute Megakaryoblastenleukämie	

**Tabelle 1-1 FAB (FrenchAmericanBritish)-Klassifikation nach Bennett et al.<sup>5</sup>**

In den letzten zehn Jahren wurden die diagnostischen Möglichkeiten grundlegend erweitert und die daraus gewonnenen Parameter mit dem klinischem Verlauf korreliert. Dadurch ist man heute in der Lage, aus der umfassenden Diagnostik prognostische Parameter abzuleiten und diese Befunde für die Entscheidung über die richtige Therapie heranzuziehen. Neben einer erweiterten Immunphänotypisierung der Zellen haben sich vor allem molekularbiologische und zytogenetische Methoden in der Leukämiediagnostik etabliert und zur Identifikation vieler charakteristischer Chromosomenaberrationen geführt. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse wurden eigenständige Entitäten mit typischer Morphologie und charakteristischem klinischem Verlauf definiert. Die neue

---

<sup>5</sup> (Bennett, JM et al., 1985: Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group.)

WHO-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie aus dem Jahre 2001 trägt dem Rechnung.

<p><b>1. AML mit spezifischen zytogenetischen Translokationen</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• AML mit t(8;21)/AML1-ETO</li><li>• Akute Promyelozytenleukämie mit t(15/17)/PML/RAR<math>\alpha</math></li><li>• AML mit abnormer KM-Eosinophilien und inv(16) oder t(16;16)/CBF<math>\beta</math>/MYH11</li><li>• AML mit 11q23 /MLL-Anomalien</li></ul>
<p><b>2. AML mit multilineärer Dysplasie (2 – 3 Linien betroffen)</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• AML mit vorausgegangenem myelodysplastischem Syndrom</li><li>• AML ohne vorausgegangenem myelodysplastischem Syndrom</li></ul>
<p><b>3. Therapieinduzierte AML und myelodysplastisches Syndrom</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• nach Alkylazien</li><li>• nach Topoisomerase II-Inhibitoren</li><li>• andere Auslöser</li></ul>
<p><b>4. AML ohne andere Einordnungsmöglichkeit ( analog FAB M0-M7)</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• AML minimal differenziert</li><li>• AML ohne Ausreifung</li><li>• AML mit Ausreifung</li><li>• Akute myelomonozytäre Leukämie</li><li>• Akute monozytäre Leukämie</li><li>• Akute Erythroleukämie</li><li>• Akute Megakaryoblastenleukämie</li><li>• Akute Basophilenleukämie</li><li>• Akute Panmyelose mit Myelofibrose</li><li>• Myelosarkom/Chlorom</li><li>• Akute biphänotypische Leukämie</li></ul>

***Tabelle 1-2 WHO-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie mit Einteilung in Kategorie 1 bis 4. In Kategorie 1 sind typische Translokationen mit resultierendem Fusionsprotein angegeben<sup>6</sup>.***

---

<sup>6</sup>(Brunner, R et al., 2001: Acute myeloid leukaemia.)

(Haferlach, T & Schoch, C, 2002: [WHO classification of acute myeloid leukaemia (AML) and the myelodysplastic syndrome (MDS)].)

Neu ist hier, dass nach WHO-Kriterien ein Blasten-Anteil von 20% zur Diagnose einer AML ausreicht. Die Kategorie 4 ist als morphologische Einteilung zu verstehen und entspricht weitgehend der FAB Klassifikation.

Auch der steigenden Zahl an therapieinduzierten AML-Fällen (auch sekundäre AML genannt), die mittlerweile 10-20% aller Fälle ausmachen<sup>7</sup>, wird hier erstmalig Rechnung getragen und als eigene Kategorie aufgenommen.

### 1.2 Physiologische Hämatopoese und Transkriptionsfaktoren

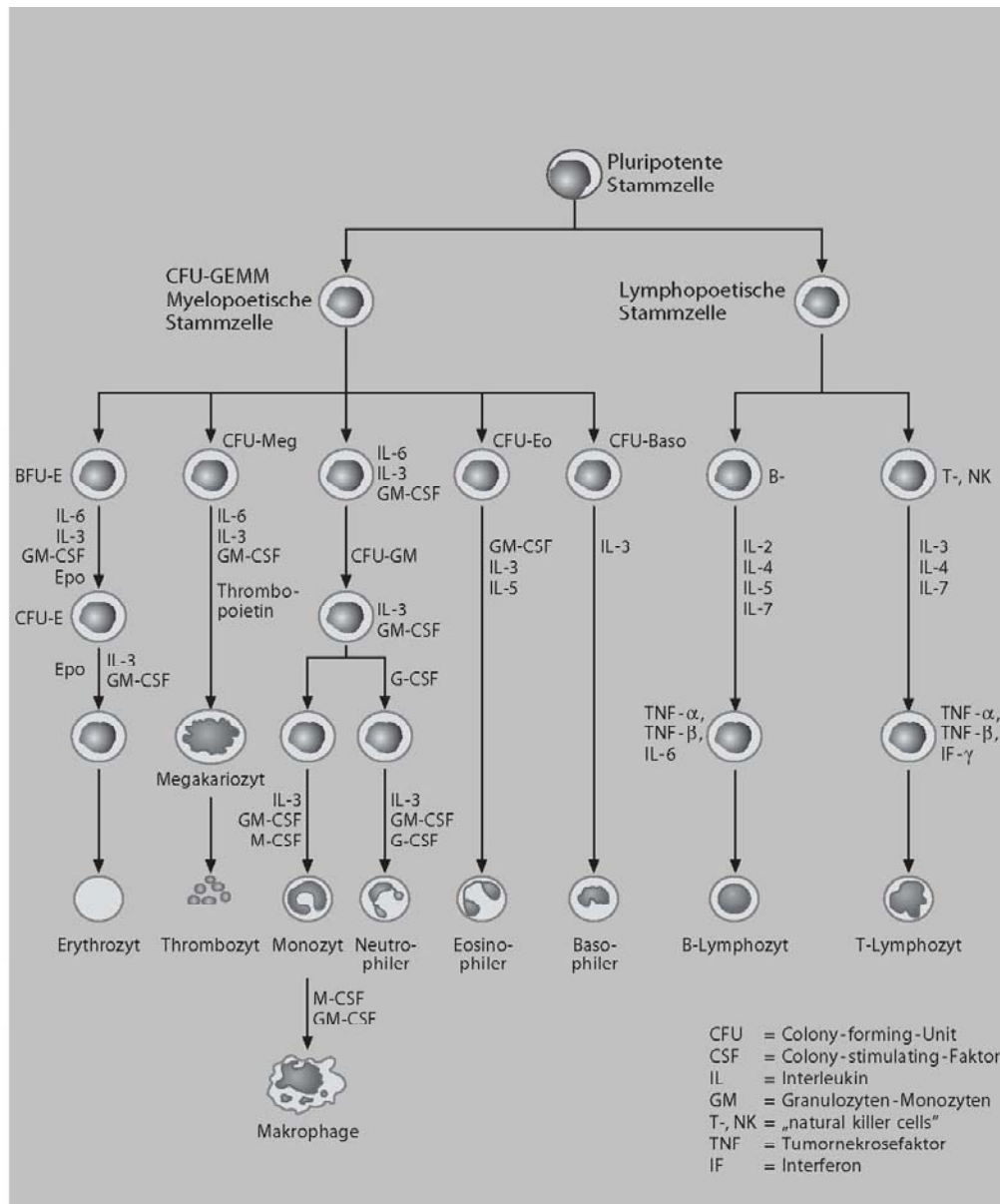
Die normale Blutbildung ist ein dynamischer, aber hoch stringent regulierter Prozess. Die Regulation erfolgt durch das Zusammenspiel von Wachstums- und Transkriptionsfaktoren, die bestimmte genetische Programme bezüglich Linienspezifität und Differenzierung der Zellen aktivieren.

Ausgangspunkt der Hämatopoese ist die pluripotente Stammzelle des Knochenmarks. Diese Zelle ist in der Lage, sich ständig zu reduplizieren, d.h. sich selbst zu erneuern („self-renewal capacity“). Andererseits erfolgt unter entsprechenden Stimulationsbedingungen die Proliferation und Ausdifferenzierung in erythropoetische, myeloische und lymphatische Zellen, sowie Thrombozyten.

Die Reduplikation der Stammzelle ist für die Erhaltung des blutbildenden Systems verantwortlich. Durch den Eintritt der Stammzelle in die Differenzierungsreihe geht sie dem Pool an pluripotenten Zellen verloren. Die Zelle proliferiert und wird zur Vorläuferzelle, die nun auf eine Zelldifferenzierungslinie festgelegt ist. Mit jedem weiteren Teilungsschritt erfolgt eine zunehmende Differenzierung und damit Restriktion der Vorläuferzelle auf eine bestimmte hämatopoetische Zellreihe. Das Proliferationspotential der Zelle nimmt dabei mit fortschreitender Differenzierung immer mehr ab.

---

<sup>7</sup> (Lowenberg, B et al., 1999: Acute myeloid leukemia.)



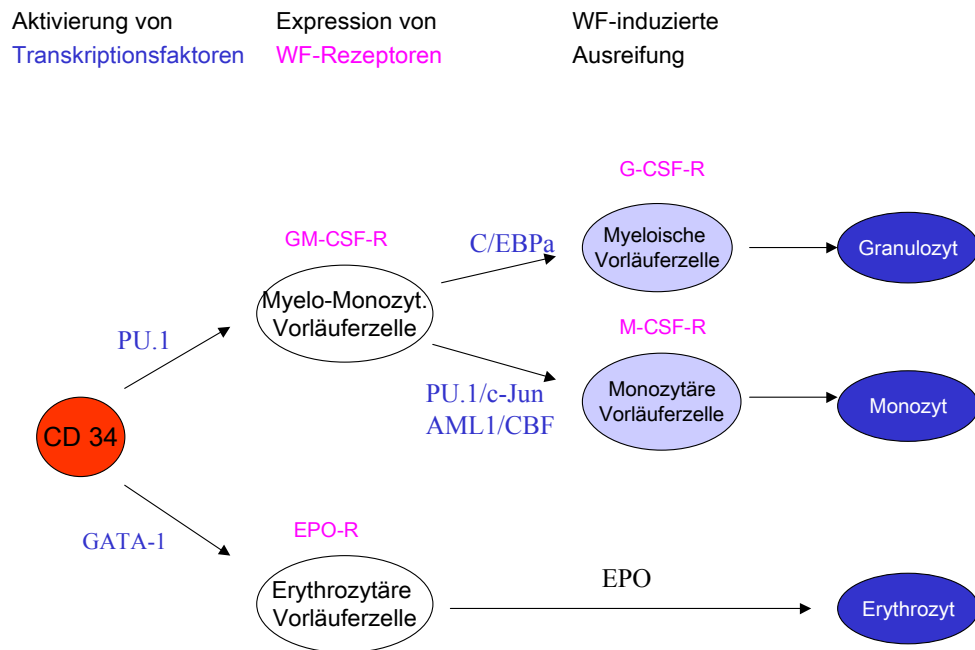
**Abbildung 1-3 Die verschiedenen Zellreihen der Hämatopoese mit entsprechenden Wachstumsfaktoren (nach Löffler/Rastetter<sup>8</sup>)**

Die Entscheidung, in welche Richtung sich eine multipotente Vorläuferzelle entwickelt, wird über die Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren gesteuert<sup>9</sup>. Erhöhte Expression und/oder Aktivierung dieser Faktoren führt zu einer vermehrten Expression von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren. Gleichzeitig zeigen viele dieser hämatopoetischen Wachstumsfaktoren eine

<sup>8</sup> Löffler/Rastetter, Atlas der klinischen Hämatologie, CD-Rom, Springer Verlag, 2001

<sup>9</sup> (Tenen, DG et al., 1997: Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia.)

ausgeprägte Autoregulation und erhöhen somit ihre eigene Expression. Die weiteren Differenzierungsschritte der Zellen werden dann durch die entsprechenden Wachstumsfaktoren induziert. In nachfolgender Abbildung ist dieses Zusammenspiel von Transkriptions- und Wachstumsfaktoren in der Differenzierung schematisch dargestellt.



**Abbildung 1-4 Wachstumsfaktoren in der Hämatopoese- modifiziert nach D. Tenen et al.<sup>10</sup>**  
 Ausgehend von der CD34-positiven Stammzelle werden die Zellen durch Expression charakteristischer Transkriptionsfaktoren einer bestimmten Zelldifferenzierungslinie zugeordnet, entlang der dann eine durch Wachstumsfaktoren induzierte Ausreifung erfolgt.

Expression des Transkriptionsfaktors GATA-1 führt die Zelle der Erythropoese zu, während PU.1 die myelomonozytäre Differenzierung triggert. Beide Faktoren unterliegen einer starken Autoregulation und regulieren sich gegenseitig negativ<sup>11</sup>.

<sup>10</sup> (Tenen et al., 1997)

<sup>11</sup> (Zhang, P et al., 1999: Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1.)

Der Transkriptionsfaktor PU.1 wird ausschließlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert<sup>12</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass PU.1 in multipotenten Vorläuferzellen auf niedrigem Niveau<sup>13</sup>, dann aber früh in der Myelopoese deutlich vermehrt exprimiert wird; dieses hohe Expressionsniveau bleibt während der gesamten Differenzierung von Monozyten und Neutrophilen bestehen<sup>14,15</sup>. In der erythroiden Differenzierung wird PU.1 dagegen nur wenig exprimiert<sup>16</sup>.

PU.1 reguliert die Expression von beinahe allen charakterisierten myeloischen Genen einschließlich der Rezeptoren für Wachstumsfaktoren<sup>17</sup>. Insbesondere ist er verantwortlich für die Regulation des M-CSF-Rezeptors<sup>18</sup>, der für das Überleben und die Proliferation von Monozyten kritisch ist. In diesem Zusammenhang wird PU.1 durch den Coaktivator c-Jun aktiviert<sup>19</sup>. Zusammenfassend deuten diese Daten darauf hin, dass PU.1 einer der Hauptregulatoren der myeloischen und insbesondere der monozytären Differenzierung ist. Auf der Ebene der myelomonozytären Vorläuferzelle sind für die weitere Linienrestriktion wieder entsprechende Expressionsmuster von Transkriptionsfaktoren entscheidend. Starke Expression von C/EBP $\alpha$  führt zu granulozytärer Differenzierung. Während weiterhin hohe Expression von PU.1 zusammen mit seinem Cofaktor c-Jun in monozytärer Ausreifung resultieren.

Ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor in der Hämatopoese ist der sogenannte Core binding factor (CBF), ein Heterodimer, bestehend aus einer DNA-bindenden  $\alpha$ -Einheit (CBF $\alpha$  oder AML1) und einer  $\beta$ -Einheit (CBF $\beta$ ).

---

<sup>12</sup> (Nerlov, C & Graf, T, 1998: PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors.)

<sup>13</sup> (Cross, MA et al., 1994: Expression of lineage restricted transcription factors precedes lineage specific differentiation in a multipotent haemopoietic progenitor cell line.)

<sup>14</sup> (Chen, HM et al., 1995: Neutrophils and monocytes express high levels of PU.1 (Spi-1) but not Spi-B.)

<sup>15</sup> (Hromas, R et al., 1993: Hematopoietic lineage- and stage-restricted expression of the ETS oncogene family member PU.1.)

<sup>16</sup> (Voso, MT et al., 1994: Inhibition of hematopoiesis by competitive binding of transcription factor PU.1.)

<sup>17</sup> (Tenen et al., 1997)

<sup>18</sup> (Zhang, DE et al., 1994b: The macrophage transcription factor PU.1 directs tissue-specific expression of the macrophage colony-stimulating factor receptor.)

<sup>19</sup> (Behre, G et al., 1999: c-Jun is a JNK-independent coactivator of the PU.1 transcription factor.)

Beide binden zuerst aneinander und anschließend als Heterodimer an entsprechende Promotor-Sequenzen, die sie, unterstützt von rekrutierten Coaktivatoren und in Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren, transaktivieren<sup>20</sup>. In normalen hämatopoetischen Zellen reguliert der CBF $\alpha/\beta$ -Komplex die Transkription wichtiger Gene für die Hämatopoese, wie Interleukin-1 und -3, GM-CSF, Myeloperoxidase und BCL-2. CBF-*knock-out* Mäuse sterben bereits *in utero* bei vollständig fehlender Hämatopoese<sup>21</sup>. Maus-Embryonen, denen das AML1-Gen fehlt, sterben ebenfalls bereits an Tag 12 aufgrund von ZNS-Blutungen bei fehlender Thrombopoese<sup>22</sup>.

### 1.3 Pathogenese und molekulargenetische Veränderungen in der akuten myeloischen Leukämie

Leukämische Zellen haben zwar die Fähigkeit zur Differenzierung in reife hämatopoetische Zellen verloren, aber ihre Teilungs- und Proliferationskapazität behalten. Folglich akkumulieren im Knochenmark unreife myeloische Zellen, die sogenannten Blasten.

Man geht davon aus, dass die Entstehung der AML das Ergebnis eines Stufenprozesses ist, der zumindest zwei erworbene genetische Veränderungen voraussetzt. Mehr als 50 rekurrente strukturelle Chromosomenaberrationen wurden bei der AML beschrieben<sup>23</sup>. Bereits in den 1970er Jahren wurden für die akute myeloische Leukämie verschiedene Translokationen charakterisiert, die häufigsten sind die Translokationen t(8;21), t(15;17), inv(16)<sup>24</sup>. Es handelt sich hier um sogenannte balancierte chromosomale Translokationen, das heißt ein Stück genetischen Materials bricht an einem Chromosomenarm ab und lagert sich

---

<sup>20</sup> (Petrovick, MS et al., 1998: Multiple functional domains of AML1: PU.1 and C/EBP $\alpha$  synergize with different regions of AML1.)

<sup>21</sup> (Speck, NA et al., 1999: Core-binding factor: a central player in hematopoiesis and leukemia.)

<sup>22</sup> (Okuda, T et al., 1996: AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis.)

<sup>23</sup> (Heim S. & Mittelman F., 1995: Cancer Cytogenetics.)

<sup>24</sup> (Look, AT, 1997a: Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias.; Look, AT, 1997c: Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias.)

dann an anderer Stelle an, so dass die Gesamtmenge an Erbgut unverändert bleibt. Balancierte Translokationen sind bei etwa 20% der Patienten mit AML nachweisbar<sup>25</sup>.

Es handelt sich bei diesen Translokationen immer um erworbene, somatische Aberrationen innerhalb der leukämischen Zellen. Sie beziehen sich meist auf DNA-bindende Transkriptionsfaktoren oder regulatorische Komponenten von Transkriptionskomplexen, die häufig bei der Regulation der Zelldifferenzierung eine Rolle spielen<sup>26 27</sup>. Auf dem Boden der Umlagerung genetischen Materials kann es zum einen zur Fehlregulation dieser Proteine kommen, zum anderen zur Entstehung von sogenannten Fusionsproteinen. In der Konsequenz bedeutet dies, daß AML-assoziierte Fusionsproteine als aberrante transkriptionale Regulatoren funktionieren und das Potential haben, die myeloische Differenzierung empfindlich zu stören. Als Zielgene dieser Fusionsproteine finden sich auch Gene die am „self-renewal“ sowie an DNA-Reparatur- Mechanismen beteiligt sind<sup>28</sup>.

Zum größten Teil lassen sich die vorkommenden Translokationen entsprechend der beteiligten Gene bestimmten Familien zuordnen: In der Core Binding Factor (CBF) Familie die Translokation t(8;21) mit dem Fusionsprotein AML1-ETO, die die Funktion von CBF $\alpha$  stört, sowie die Inversion inv(16) mit Beteiligung von CBF $\beta$  im Fusionsprotein CBF $\beta$ -MYH11<sup>29</sup>.

In der MLL-Familie fasst man Rearrangements zusammen, die das MLL-Gen auf Chromosom 11 Bande q23 involvieren. Der genaue Mechanismus der Leukämogenese ist hier nicht bekannt, es häufen sich jedoch die Hinweise, dass durch MLL-Translokationen die für die Stammzellentwicklung entscheidenden HOX-Gene gestört werden<sup>30</sup>. Diese Veränderungen treten in bis zu 80% der

---

<sup>25</sup> (Christ, O et al., 2007: [Pathobiology of acute myeloid leukemia].)

<sup>26</sup> (Alcalay, M et al., 2001: Common themes in the pathogenesis of acute myeloid leukemia.)

<sup>27</sup> (Look, AT, 1997b: Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias.)

<sup>28</sup> (Alcalay, M et al., 2003: Acute myeloid leukemia fusion proteins deregulate genes involved in stem cell maintenance and DNA repair.)

<sup>29</sup> (Feuring-Buske, M et al., 2002: [Pathogenesis and biology of leukemias].)

<sup>30</sup> (Buske, C & Humphries, RK, 2000: Homeobox genes in leukemogenesis.)



AML-Fälle im Kindesalter sowie bei der sekundären AML nach Behandlung mit Topoisomerase II-Inhibitoren auf.

Translokationen der RAR $\alpha$ -Familie findet man bei der Promyelozyten-Leukämie. Beteiligt ist hier das Retinolsäurerezeptor  $\alpha$ -Gen (RAR $\alpha$ ) auf Chromosom 17. Bei der Translokation t(15;17) entsteht das Fusionsprotein PML-RAR $\alpha$ , bzw. PLZF-RAR $\alpha$  bei t(11;17). Es resultieren aberrante Retinolsäure-Rezeptoren, die als dominant negative Inhibitoren des Wildtyp-Rezeptors fungieren<sup>31</sup>.

Unbalancierte Chromosomenanomalien, insbesondere Deletionen an den Chromosomen 5 und 7 kommen wesentlich seltener als balancierte Translokationen vor und finden sich v.a. in Assoziation mit einer Alkylanzientherapie als sekundäre AML<sup>32</sup>.

Als komplexe Anomalien bezeichnet man drei oder mehr nicht verwandte zytogenetische Veränderungen in einem Klon. Komplex aberrante Karyotypen werden in 10-15% der Fälle von De-novo-AML, respektive 25% der sekundären, therapieassoziierten AML beobachtet<sup>33</sup>.

Innerhalb der Gruppe von Patienten mit „normalem Karyotyp“ zeigen sich durch Verbesserung der diagnostischen Methoden verschiedene molekulargentische Veränderungen, so dass es hier zu einer Unterteilung in molekular definierte Subgruppen kommt. So konnte bereits gezeigt werden, dass 40% der Patienten, die keine Auffälligkeiten in der klassischen Zytogenetik zeigen, Mutationen im Bereich der Rezeptortyrosinkinase FLT3 aufweisen<sup>34</sup>. Das Nucleophosmin (NPM)-Gen ist bei einem Drittel aller Patienten mit primärer AML mutiert<sup>35</sup>.

---

<sup>31</sup> (Warrell, RP, Jr. et al., 1998: Therapeutic targeting of transcription in acute promyelocytic leukemia by use of an inhibitor of histone deacetylase.)

<sup>32</sup> (Andersen, MK et al., 1998: Chromosomal abnormalities in secondary MDS and AML. Relationship to drugs and radiation with specific emphasis on the balanced rearrangements.)

<sup>33</sup> (Schoch, C et al., 2005: Acute myeloid leukemia with a complex aberrant karyotype is a distinct biological entity characterized by genomic imbalances and a specific gene expression profile.)

<sup>34</sup> (Schnittger, S et al., 2002: Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease.)

<sup>35</sup> (Falini, B et al., 2005: Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype.)

Mutationen des NPM-Gens stellen die häufigste genetische Einzelaberration bei der AML dar; sie sind aber auch gehäuft mit aktivierenden Mutationen von FLT3 vergesellschaftet. Außerdem wurden Mutationen der Transkriptionsfaktoren CEBP $\alpha$ <sup>36</sup> und PU.1<sup>37</sup> beschrieben.

Ein neueres Modell zur Pathogenese der AML nach Gilliland und Griffin postuliert eine „2-hit-Hypothese“, in der Rearrangements unter Beteiligung von Transkriptionsfaktoren als Klasse 2 Mutationen bezeichnet werden. Diese Mutationen stören die Differenzierung der hämatopoetischen Zelle, sind aber nicht in der Lage alleine zur Entstehung einer Leukämie zu führen. Dazu sind zusätzlich sogenannte Klasse 1 Mutationen erforderlich, die zu einer Aktivierung der Tyrosinkinase 3 führen und die Proliferation verstärken und der Apoptose entgegenwirken<sup>38</sup>.

### 1.4 Translokation t(8;21) und das Fusionsprotein AML1-ETO

Die balancierte Translokation t(8;21)(q22;q22) findet sich in 7–8% aller akuten myeloischen Leukämien<sup>39</sup> bzw. in bis zu 40% der Fälle von AML M2<sup>40</sup> und stellt damit die häufigste chromosomale Aberration bei der akuten myeloischen Leukämie dar. Gelegentlich findet sich die Translokation auch in M0, M1 und M4 Subtypen. 1973 wurde diese Translokation erstmals von *Rowley et al.* charakterisiert<sup>41</sup>, die beteiligten Gene konnten jedoch erst in den 1990er Jahren identifiziert werden. Sie ist mit einer myelomonozytären Morphologie und einer

---

<sup>36</sup> (Pabst, T et al., 2001: Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia.)

<sup>37</sup> (Mueller, BU et al., 2003: Heterozygous PU.1 mutations are associated with acute myeloid leukemia.)

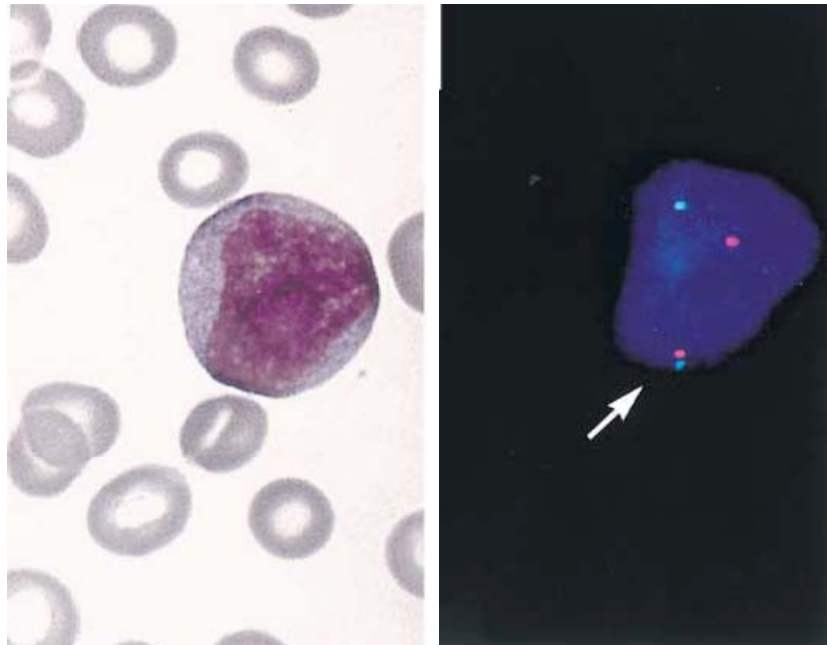
<sup>38</sup> (Gilliland, DG & Griffin, JD, 2002: The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia.; Spiekermann, K et al., 2003: The protein tyrosine kinase inhibitor SU5614 inhibits FLT3 and induces growth arrest and apoptosis in AML-derived cell lines expressing a constitutively activated FLT3.)

<sup>39</sup> (Marcucci, G et al., 2003: Core binding factor (CBF) acute myeloid leukemia: is molecular monitoring by RT-PCR useful clinically?)

<sup>40</sup> (Bitter, MA et al., 1987: Associations between morphology, karyotype, and clinical features in myeloid leukemias.)

<sup>41</sup> (Rowley, JD, 1973: Identificaton of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia.)

günstigen Prognose assoziiert<sup>42</sup>. Bereits in den 1970er Jahren wurde beschrieben, dass 82-100% der Patienten eine komplette Remission erreichen und das mediane Überleben 14-33 Monate beträgt. Diese Daten konnten auch in späteren Analysen belegt werden<sup>43</sup>.



**Abbildung 1-5** Präparate eines Patienten mit *t(8;21)*-positiver AML M2. Links leukämischer Blast in Ausstrich von peripherem Blut (May-Grünwald-Giemsa-Färbung). Rechts Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an selbem Präparat. Blau dargestellt Bruchstellenregion auf Chromosom 8(q22) bzw. in Magentarot 21(q22). Der weiße Pfeil markiert die chromosomale Fusion.

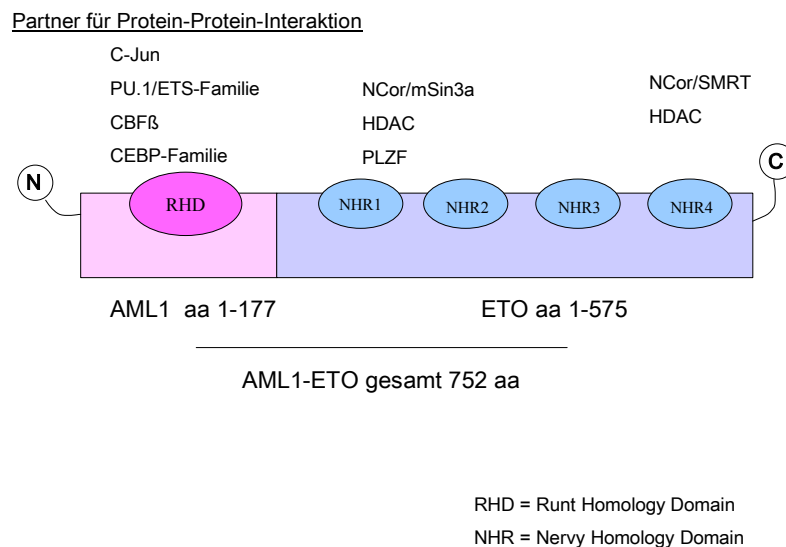
Fusioniert wird das AML1 (Acute myleoid leukemia1, auch CBF $\alpha$ )-Gen auf Chromosom 21 mit dem ETO (Eight-twenty-one)-Gen auf Chromosom 8.

---

<sup>42</sup> (Nucifora, G & Rowley, JD, 1995: AML1 and the 8;21 and 3;21 translocations in acute and chronic myeloid leukemia.)

<sup>43</sup> (Trujillo, JM et al., 1979: Hematologic and cytologic characterization of 8/21 translocation acute granulocytic leukemia.)

Innerhalb des AML1-Locus kommt es dabei zu einem Bruch zwischen Exon 5 und 6, so dass die ersten 177 Aminosäuren von AML1 im Fusionsprotein enthalten sind<sup>44</sup>. Die *Runt Homology Domain* (RHD), die für DNA-Bindung und Protein-Protein-Interaktion von großer Bedeutung ist, bleibt dabei erhalten, während die Transaktivierungsdomäne komplett verloren geht. Dieses Bruchstück des AML1-Gens wird auf Chromosom 8 transloziert und vor das komplette ETO-Gen geschaltet. ETO gehört zur Gruppe der transkriptionellen Regulatoren, seine genaue Funktion im Säugetier ist jedoch bisher nicht geklärt. Es konnte aber gezeigt werden, dass dieses Protein über die Rekrutierung von Corepressoren am Chromatin-Remodelling mitwirkt. Dabei spielen vier sogenannte *Nervy Homology Region* (NHR) eine besondere Rolle; dabei handeltet es sich um hoch konservierte Genabschnitte die aus dem Drosophila-Genom bekannt sind.



**Abbildung 1-6** Das Fusionsprotein AML1-ETO beinhaltet die N-terminal ersten 177 Aminosäuren von AML1 und ist an das gesamte ETO-Protein fusioniert. Im AML1-Anteil findet sich die Runt-homology-Domäne (RHD); ETO trägt die hoch konservierten Nervy-homology-Domänen (NHR1-4). Zusätzlich dargestellt bekannte Interaktionspartner an diesen Domänen.

<sup>44</sup> (Levanon, D et al., 2001: Architecture and anatomy of the genomic locus encoding the human leukemia-associated transcription factor RUNX1/AML1.)

In der Abbildung 1-6 sind die Struktur des Fusionsproteins sowie relevante Protein-Domänen mit den bekannten interagierenden Proteinen stark vereinfacht dargestellt.

AML1-ETO kann ebenso wie AML1 als transkriptioneller Aktivator wirken<sup>45,46,47</sup>. Gleichzeitig wurden aber in anderem Zusammenhang repressive Effekte, insbesondere auf AML1-abhängige Transkription, beschrieben<sup>48,49</sup>. AML1-ETO (+/-) *knock-in* Mäuse zeigen einen ähnlichen Phänotyp wie AML1(-/-) *knock-out* Mäuse, weshalb ein dominant-negativer Effekt von AML1-ETO auf die physiologische AML1-Funktion postuliert wurde. Gleichzeitig zeigte sich jedoch im Gegensatz zu den *knock-out* Individuen ein Differenzierungspotential für Dottersackzellen, weshalb von weiteren Funktionen des Fusionsproteins AML1-ETO auszugehen ist<sup>50</sup>.

Klassischerweise findet man diese Aberration in der Leukämiediagnostik mittels Karyotypisierung. In jüngerer Zeit kann der Nachweis jedoch auch über Realtime-PCR oder Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) erfolgen (siehe Abbildung 1-5). Bei der Realtime-PCR erhält man dabei zusätzlich eine Quantifizierung des Fusionsproduktes auf RNA-Ebene. Es gibt Daten dafür, dass so auch in scheinbar normalen Karyotypen das Fusionsgen nachweisbar ist. Hauptsächlich verwendet wird diese Methode zum quantitativen Nachweis einer „Minimal Residual Disease“ und zum Therapiemonitoring bei Patienten in kompletter Remission<sup>51</sup>.

---

<sup>45</sup> (Rhoades, KL et al., 1996: Synergistic up-regulation of the myeloid-specific promoter for the macrophage colony-stimulating factor receptor by AML1 and the t(8;21) fusion protein may contribute to leukemogenesis.)

<sup>46</sup> (Frank, RC et al., 1999: The t(8;21) fusion protein, AML1/ETO, transforms NIH3T3 cells and activates AP-1.)

<sup>47</sup> (Elsasser, A et al., 2003: The fusion protein AML1-ETO in acute myeloid leukemia with translocation t(8;21) induces c-jun protein expression via the proximal AP-1 site of the c-jun promoter in an indirect, JNK-dependent manner.)

<sup>48</sup> (Meyers, S et al., 1993: Identification of AML-1 and the (8;21) translocation protein (AML-1/ETO) as sequence-specific DNA-binding proteins: the runt homology domain is required for DNA binding and protein-protein interactions.)

<sup>49</sup> (Frank, R et al., 1995: The AML1/ETO fusion protein blocks transactivation of the GM-CSF promoter by AML1B.)

<sup>50</sup> (Yergeau, DA et al., 1997: Embryonic lethality and impairment of haematopoiesis in mice heterozygous for an AML1-ETO fusion gene.)

<sup>51</sup> (Kern, W et al., 2005: Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia.)

## 1.5 Ziele der Arbeit

Einer gestörten Zelldifferenzierung innerhalb der myeloischen Linie kommt in der Pathogenese der akuten myeloischen Leukämie eine übergeordnete Bedeutung zu. Für das Fusionsprotein AML1-ETO, das aus der Translokation t(8;21) resultiert, wurden bereits verschiedene Interaktionen mit bedeutenden Proteinen der Myelopoese oder deren regulatorischen Sequenzen beschrieben. In t(8;21)-positiven Zelllinien ist morphologisch ein Differenzierungsblock zu beobachten.

Dem Transkriptionsfaktor PU.1 kommt in der normalen Hämatopoese und vor allem in der Myelopoese eine Schlüsselrolle zu. Bereits in frühen Differenzierungsstadien wird dieser Transkriptionsfaktor auf hohem Niveau exprimiert. Die Differenzierung zu Monozyten treibt PU.1 in Kooperation mit dem Coaktivator c-Jun voran, in dem es den M-CSF-Rezeptor Promotor stark aktiviert<sup>52</sup>. In Mutationsanalysen an AML-Patientenproben konnte eine Vielzahl von PU.1-Mutationen identifiziert werden, und zwar im untersuchten Kollektiv vor allem in den FAB-Subtypen M0 und M5, nicht jedoch in der Subklasse M2, für welche die Translokation t(8;21) typisch ist<sup>53</sup>.

Die Arbeitshypothese war somit, dass es im Fall der AML1-ETO-positiven AML einen Mechanismus geben muss, über den – an Stelle einer Mutation - der Transkriptionsfaktor PU.1 durch das Fusionsprotein in seiner Funktion als positiver Transaktivator gestört wird.

Generell kann man die Mechanismen, über die Transkription beeinflusst wird, zwei Kategorien zuordnen. Zum einen Interaktionen an regulatorischen Sequenzen, zum anderen Protein-Protein-Interaktionen mit regulatorischen Proteinen, sogenannten Transkriptionsfaktoren.

So ergeben sich hier folgende konkreten Fragestellungen:

Beeinflusst AML1-ETO die Transaktivierungskapazität von PU.1 an dessen Zielsequenzen, wie z.B. dem M-CSF-Rezeptor-Promotor?

---

<sup>52</sup> (Behre et al., 1999)

<sup>53</sup> (Mueller et al., 2003)

Welche regulatorischen Sequenzen der PU.1-Zielgene spielen hierbei eine Rolle?

Kann AML1-ETO direkt an Promotor-Sequenzen binden oder finden Protein-Interaktionen zwischen AML1-ETO und PU.1 statt?

Werden PU.1- Bindungspartner wie der Coaktivator c-Jun dabei verdrängt?

Spielen Corepressoren bei der Interaktion zwischen AML1-ETO und PU.1 eine Rolle?

Beeinflusst AML1-ETO die autoregulatorische Funktion von PU.1?

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Monolayer-Kulturen

Für die transienten Transfektionen kamen Zellen zur Anwendung, die sich durch einfache Kulturbedingungen und hohe Transfektionseffektivität auszeichnen.

	Organismus	Beschreibung	Kulturmedium	Referenz
CV-1	Monkey	Fibroblasten aus der Niere	DMEM Medium + 10% FBS + 1% Glutamine + 1% Penicillin/ Streptomycin	Jensen et al. <sup>54</sup>
F9	Mouse	Epitheliale Zellen aus Hodenteratom	DMEM Medium (4,5g Glucose/l) + 10% FBS + 1% Glutamine + 1% Pen/Strept	Darrow et al. <sup>55</sup> Jin et al. <sup>56</sup>
293T	Human	Epithelien der embryonalen Niere	DMEM Medium + 10% FBS + 1% Glutamine + 1% Pen/Strept	Pear et al. <sup>57</sup>

***Tabelle 2-1 Kulturbedingungen für adhärenente Zellen***

Die Zellen wurden in einer Dichte von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml in  $75\text{cm}^2$  Zellkulturflaschen ausgesät. Ein Mediumwechsel fand dreimal pro Woche statt. Bei Konfluenz der Kultur wurden die Zellen mit 0,5%iger Trypsin-EDTA-Lösung

---

<sup>54</sup> (JENSEN, FC et al., 1964: INFECTION OF HUMAN AND SIMIAN TISSUE CULTURES WITH ROUS SARCOMA VIRUS.)

<sup>55</sup> (Darrow, AL et al., 1990: Maintenance and use of F9 teratocarcinoma cells.)

<sup>56</sup> (Jin, C et al., 2002: Transcriptional regulation of the c-jun gene by AP-1 repressor protein JDP2 during the differentiation of F9 cells.)

<sup>57</sup> (Pear, WS et al., 1993: Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection.)



3-5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die so abgelösten Zellen wurden zweimal in entsprechendem Kulturmedium gewaschen und nach Prüfung von Vitalität und Zellzahl erneut gesplittet. Dabei kam eine Split Ratio von 1:2 für F9, 1:3 für CV-1 und 1:10 für 293T Zellen zur Anwendung. Die Bebrütung erfolgte unter konventionellen Bedingungen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

### 2.1.2 Suspensions-Kultur

Für die Experimente in myeloischen Zellen wurden humane U-937 Zellen verwendet. Diese Zelllinie wurde aus Histiocytom-Gewebe isoliert und zeigt monozytäre Eigenschaften, wie die Expression der monozytären Differenzierungsmarker: CD13+, CD15+, CD 33+, CD34-.

	Organismus	Beschreibung	Kulturmedium	Referenz
U937	Human	monozytär	RPMI + 10% FBS + 1% Glutamin + 1% Pen/Strept	Sundstrom et al. <sup>58</sup>
U937-AE	Human	AML1-ETO vor Zink-induzierbarem Promotor stabil transfiziert in o.g. U937-Zellen	Idem Induktion mit 100µM ZnSO <sub>4</sub>	PG Pelicci, Mailand <sup>59</sup>

***Tabelle 2-2 Kulturbedingungen für myeloische Zellen***

Die Kultivierung fand ebenfalls unter konventionellen Bedingungen bei + 37°C und 5% CO<sub>2</sub> statt. Ein Mediumwechsel wurde zwei- bis dreimal pro Woche vorgenommen. Die Aussaat in frisches Kulturmedium wurde dabei in einer finalen Zellkonzentration von 0,5 – 1 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml vorgenommen.

---

<sup>58</sup> (Sundstrom, C & Nilsson, K, 1976: Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937).)

<sup>59</sup> (Alcalay et al., 2003)

## 2.2 Transfektionen

Zur Untersuchung der Promotor-Regulation dienten transiente Transfektionen. Im Sinne einer Kotransfektion wurde die zu untersuchende Promotorsequenz mit nachgeschaltetem Reporter gen und gleichzeitig ein oder mehrere Expressionsplasmide für entsprechende Transkriptionsfaktoren in die Wirtszelle eingeschleusst. Die myeloischen Zellen in Suspensionskultur wurden mittels Elektroporationsverfahren transfiziert.

### 2.2.1 DNA-Konstrukte

#### Promotor Konstrukte und Reporter-System

Als Reporter-System für die untersuchte Promotor-Aktivität wurde die Enzymaktivität der *Firefly* Luciferase verwendet. Als Kontrollreporter wurde das Gen für *Renilla* Luciferase eingeführt. Mittels dieses internen Kontrollgens kann die Variabilität des eigentlichen Reporters *Firefly* aufgrund der unterschiedlichen Viabilität und Transfektions-Effektivität minimiert werden.

Reporter	Beschreibung	Quelle
pXP <sub>2</sub>	Firefly Luciferase Reporter Plasmid	Behre et al. <sup>60</sup> Nordeen et al. <sup>61</sup>
pM-CSF-R wildtype	Humaner M-CSF-Rezeptor Promotor (bp -416 bis +124) kloniert in pXP <sub>2</sub>	Zhang et al. <sup>62</sup>
pM-CSF-R (mB)	o.g. M-CSF-R-Promotor mit mutierter AML1-Bindungsstelle	Zhang et al.
pTK-PU.1	zwei PU.1-Bindungsstellen vor einem minimalen Promotor in pTK81-luc	Behre et al. <sup>63</sup>
pRL-null	Kontroll-Vektor für das Dual-Luciferase Reporter System: <i>Renilla</i> Luciferase ohne eukaryontischen Promotor oder Enhancer.	Promega, D-Mannheim

**Tabelle 2-3 Die Promotorkonstrukte wurden jeweils in Vektoren mit *Firefly*/*Renilla*-Reporter gen kloniert (pXP<sub>2</sub> bzw. pTK81-luc).**

<sup>60</sup> (Behre, G et al., 1999: Analysis of the modulation of transcriptional activity in myelopoiesis and leukemogenesis.)

<sup>61</sup> (Nordeen, SK, 1988: Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers.)

<sup>62</sup> (Zhang, DE et al., 1994a: The macrophage transcription factor PU.1 directs tissue-specific expression of the macrophage colony-stimulating factor receptor.)

<sup>63</sup> (Behre et al., 1999)

### Expressionsplasmide

Um eine transiente Überexpression bestimmter Transkriptionsfaktoren zu erreichen, wurden gemeinsam mit den beschriebenen Reporter-Konstrukten eukaryotische Expressionsplasmide in die Zellen eingeschleust.

pCMV <sub>5</sub>	Eukaryotisches Expressionsplasmid	Amersham, D-Braunschweig
pCMV5-AE	AML1-ETO kloniert in pCMV <sub>5</sub>	S.Hiebert, Memphis, USA <sup>64</sup>
pS3H-c-Jun	c-Jun in pS3H	D. Tenen, Boston, USA
pECE-PU.1	PU.1 in pECE	D. Tenen, Boston, USA

***Tabelle 2-4 Eukaryotische Expressionsplasmide zur Überexpression von Transkriptionsfaktoren in den zu untersuchenden Zelllinien.***

### Herstellung der DNA

Zur Herstellung der benötigten DNA wurden mit oben genannten Konstrukten transformierte DH5<sub>alpha</sub> Bakterien über Nacht in LB Medium bei 37°C kultiviert und am nächsten Morgen mit einer Geschwindigkeit von 6000g für 15 Minuten zentrifugiert. Anschließend erfolgte die DNA-Präparation mittels Maxi-Prep Kit<sup>TM</sup> genau nach Herstelleranweisung.

Die fertig präparierte DNA wurde in 500µl TE Puffer (pH 8,0) resuspendiert und anschließend mittels Massenspektrometer auf DNA-Konzentration und Reinheit überprüft.

### **2.2.2 Transfektion mittels Liposomen-Technik**

#### LipofectAmin<sup>TM</sup> (Gibco BRL, USA)<sup>65</sup>

In den adhärenen Zelllinien CV-1 und F9 wurden die Transfektionen nach dem Prinzip der Liposomen-Technik unter Verwendung des LipofectAmin® Kits durchgeführt. Bei dieser Technik der Transfektion werden Phospholipid-Vesikel

---

<sup>64</sup> (Rhoades et al., 1996)

<sup>65</sup> Vollständige Liste aller Hersteller/Bezugsquellen siehe Kapitel 2.7

mit Nukleinsäuren beladen und mit der Zellmembran fusioniert. Die DNA gelangt somit durch Endozytose in das Zellinnere.

Um für den Tag der Transfektion eine Konfluenz der Zellen von 60-80% zu erreichen, wurden die Kulturen 24 Stunden vor Transfektion trypsiniert, gezählt und mit neuem Medium ausgesät. CV-1 Zellen wurden in 24-well-Platten mit einer Dichte von  $0,4 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung in 400 $\mu$ l Medium gesät. Für F9 Zellen konnte in 6-well-Platten bessere Transfektionseffizienzen erzielt werden; hier wurden  $5 \times 10^4$  in 2 ml plattiert.

Das Komplexieren der DNA mit den Phospholipidvesikeln erfolgte nach Herstelleranweisung, dabei wurden folgende Mengen an Reagenzien und DNA verwendet.

	<b>CV1</b>	<b>F9</b>
DNA	0,45 $\mu$ g	1 $\mu$ g
Plus Reagenz	4 $\mu$ l	6 $\mu$ l
LipofectAmin	1 $\mu$ l	4 $\mu$ l
Serumfreies Medium	x $\mu$ l	x $\mu$ l
Endvolumen	50 $\mu$ l	200 $\mu$ l

Das Zellkulturmedium wurde jeweils abgenommen und in den 24-well-Platten durch 200 $\mu$ l serumfreies Medium ersetzt (bzw. 800 $\mu$ l in den 6-well-Platten), bevor die entsprechende Menge der DNA-Komplex-Mischung zugesetzt wurde.

Nach dreistündiger Inkubation bei konventionellen Bedingungen erfolgte durch Zugabe von Kulturmedium mit einem Serumgehalt von 20% (250 $\mu$ l bzw. 100 $\mu$ l) die Wiederherstellung der üblichen Serumkonzentration von 10%.

Nach einer Gesamtinkubation von 24h wurden die Zellen wie unter 2.2.4 beschrieben geerntet.

### Effectene™ (Quiagen, D)

293T Zellen wurden unter Verwendung von Effectene™ transfiziert. Hierbei handelt es sich um ein Transfektionssystem, das eine noch höhere Effizienz und damit Expression der eingeschleusten Gene liefert. Zudem ermöglicht es Transfektion in Anwesenheit von FBS, so dass die Zellen gleichmäßig mit Serum

versorgt werden. Die Nukleinsäuren werden hierbei nicht in Liposomen, sondern in Mizellen gepackt und so durch die Zellmembran geschleust.

Die Transfektionen wurden in 75 ml Zellkulturflaschen durchgeführt. 24 Stunden vor Transfektion wurden  $1 \times 10^6$  Zellen pro Flasche ausgesät.

Die Herstellung der DNA-Komplexe erfolgte nach Hersteller-Anweisung. Es wurden insgesamt  $2\mu\text{g}$  ( $=20\mu\text{l}$ ) DNA und folgende Reagenzien-Mengen eingesetzt:

20 $\mu\text{l}$	DNA
300 $\mu\text{l}$	EC Puffer
16 $\mu\text{l}$	Enhancer
30 $\mu\text{l}$	Effectene

Die Zellen konnten hier nach 35 Stunden Inkubation bei konventionellen Bedingungen geerntet werden.

### 2.2.3 Elektroporation

Für die transienten Transfektionen von Promotor-Konstrukten in myeloische U937 Zellen kam die Technik der Elektroporation zur Anwendung.

Einen Tag vor Durchführen der Elektroporation wurden die Zellen in frisches RPMI 1640 Medium mit einer Zell-Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät.

Am Tag der Transfektion wurden nach Bestimmung der Zellzahl jeweils  $1 \times 10^7$  Zellen pro Ansatz entnommen, zweimal mit PBS gewaschen und dann in 500 $\mu\text{l}$  serumfreiem RPMI Medium resuspendiert. Nach Zugabe von  $20\mu\text{g}$  DNA wurden die Zellen bei 980 $\mu\text{F}$  und 280V elektroporiert, anschließend in 10ml regulärem Kulturmedium resuspendiert und in 100mm Kulturplatten transferiert.

Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen für weitere 7 Stunden unter konventionellen Konditionen bebrütet.

### 2.2.4 Dual-Luciferase Assay (PROMEGA)

Nach Ende der oben genannten Inkubationszeiten wurden die Zellen jeweils zweimal mit PBS gewaschen und dann entsprechend den Herstelleranweisungen mit 100 µl entsprechend verdünntem Passive Lysis Buffer lysiert. Nach 30 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur auf dem Schüttler konnten 20µl des Lysates aufgenommen und mit 100µl LAR II Reagenz verdünnt werden. Die Aktivität der *Firefly* Luciferase wurde dann unter Verwendung des Luminometers bestimmt. Diese Lumineszenz wurde anschließend mittels Zugabe von 100µl Stop & Glo Reagenz terminiert. Die verbleibende Aktivität der *Renilla* Luciferase konnte im Anschluss bestimmt werden. Die Ratio zwischen *Firefly* und *Renilla* Aktivität wurde durch das Luminometer automatisch berechnet.

Zur Darstellung der Ergebnisse wurde jeweils der Basisaktivität des verwendeten Promotors der Wert 1 zugewiesen und die z.B. durch Transkriptionsfaktoren modulierte Aktivität als y-fachen Wert dieser Basisaktivität dargestellt. Die Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt und die erzielten Ergebnisse entsprechend als Mittelwert und Standard-Abweichung angegeben.

## 2.3 Western Blot

### 2.3.1 Antikörper

Antikörper	Eigenschaft	Verdünnung
Anti PU.1 Sc-352	Rabbit polyklonaler AK gegen Carboxy-Terminus von PU.1	1 : 1.000
Anti $\beta$ -Tubulin Sc-9104	Rabbit, polyklonaler AK gegen C-Terminus	1 : 500
Goat-anti-rabbit HRP Sc-2030	Sekundärer AK mit HRP-Konjugat	1 : 2.000

*Tabelle 2-5 Antikörper Western Blot (Bezugsquelle: Santa Cru Biotech., USA)*

### 2.3.2 Puffer

#### Puffer für Zellkernextrakte

*Puffer A*

20mM	HEPES pH 7,9
10mM	NaCl
3 mM	MgCl <sub>2</sub>
0,1 %	NP40
10 %	Glycerol
0,2mM	EDTA
1mM	DTT
0,4mM	PMSF
1µg/ml	Antipain
1µg/ml	Leupeptin

*Puffer B*

20mM	HEPES pH7,9
400mM	NaCl
0,2mM	EDTA
20%	Glycerol
1mM	DTT
0,4mM	PMSF
1µg/ml	Antipain
1µg/ml	Leupeptin

#### Lösungen für Gel-Elektrophorese(SDS-Page)

*Tankpuffer*

25mM	Tris, pH 8,3
250mM	Glycine
0,1%	SDS

## 2 Materialien und Methoden

---

### *SDS/Acrylamid Gel*

#### Running Gel (10%)

3,0ml Acrylamid (40%)  
3,8ml 1,5M Tris, pH 8,8  
0,1ml 10% SDS  
0,2ml 10% APS  
5,0µl TEMED  
2,8ml dH<sub>2</sub>O

#### Stacking Gel (10%)

0,65ml Acrylamid (40%)  
1,25ml 0,5M Tris, pH 6,8,  
0,05ml 10% SDS  
0,05ml 10% APS  
5,0µl TEMED  
3,0ml dH<sub>2</sub>O

### *Loading Dye (2x)*

125mM Tris/HCL, pH 6,8  
4% SDS  
10% β-Mercapto-Ethanol  
30% Glycerol  
0,004% Bromophenol Blau

### *Transfer Puffer*

25mM Tris  
0,2M Glycin  
20% Methanol

## Western Blotting Lösungen

### *10x TBS(Tris-buffered saline)*

24,2g Tris  
80g NaCl  
0,8l dH<sub>2</sub>O  
End-pH von 8,0 eingestellt mittels HCl

*TBST* 0,05% Tween 20 in 1x TBS

### *Block-Lösung*

1x TBS  
0,1% Tween 20  
5% Magermilchpulver

### *Verdünnungslösung für Antikörper*

1x TBST  
2,5% Magermilchpulver

### *Stripping Puffer*

0,1M β-Mercapto-Ethanol  
2% SDS  
1M Tris (pH6,8)

### *TE Puffer*

10mM Tris/HCl, pH 8,0  
1mM EDTA



### **2.3.3 Herstellung von Zellkernextrakten (nuclear extracts)**

Um Zellkernextrakte mit möglichst guter Transfektionseffektivität und hohem Proteingehalt herzustellen, wurden 293T Zellen in 100mm Platten mittels Effectene® (wie unter 2.2.2 beschrieben) transfiziert. Nach entsprechender Inkubationszeit wurden die Zellen trypsiniert, gewaschen und in PBS resuspendiert. Nach dem Transfer in 2ml Reaktionsgefäße erfolgte die Zentrifugation der Zellen für 5 Minuten bei 2000 rpm und 4°C. Das entstandene Pellet wurde in 100µl Puffer A resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte zur Pelletierung der Zellkerne eine weitere Zentrifugation für 5 Minuten bei 2000rpm und 4°C. Das entstandene Pellet wurde dann in 50µl Puffer C (eisgekühlt) resuspendiert und durch abwechselndes Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und Rütteln homogenisiert. Nach erneuter Zentrifugation für 15 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C konnte die Proteinlösung als Überstand abgenommen und bei –80°C kryokonserviert werden.

### **2.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Zur Bestimmung der erreichten Proteinkonzentrationen wurden Analysen nach dem Prinzip der „Bradford-dye binding procedure“<sup>66</sup> unter Verwendung des Bio-rad Protein Estimation Kits™ durchgeführt. Die Untersuchung basiert auf der Farbveränderung von Coomassie Blau entsprechend verschiedenen Proteinkonzentrationen. 20µl der 1:20 verdünnten Probe wurden mit 1ml der 1:5 verdünnten Reaktionslösung gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten wurde die Farbänderung bei 595nm am Photometer bestimmt. BSA-Lösungen mit bekannter Protein-Konzentration dienten zur Erstellung einer Standardkurve, mit Hilfe derer dann die Proteinkonzentration der Proben in mg/ml errechnet werden konnte.

---

<sup>66</sup> (Bradford, MM, 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.)

### **2.3.5 Gelelektrophorese**

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Lysate wurden für alle Proben gleiche Proteinmengen eingesetzt (50-100µg). die Proben wurden entsprechend mit 2x Loading Dye vermischt und für 5 Minuten bei 95°C auf dem Heizblock denaturiert.

Die Auftrennung der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht erfolgte durch ein 10%iges SDS-Polyacrylamid Gel bei 125V. 10µl eines vorgefärbten Protein-Markers wurden zur Zuordnung des Molekulargewichtes auf jedem Gel inkludiert.

### **2.3.6 Western Blot Transfer und Immundetection**

Die aufgetrennten Proteine wurden unter Anwendung der Methode des Elektro-Blottings auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Vor Beginn des Transfers wurde diese Membran 15 Min. in Methanol eingeweicht, mit dH<sub>2</sub>O gespült und dann in Transfer-Puffer aufbewahrt. Die Transfer-Kassette des Tank-Blotting-Systems wurde entsprechend gängiger Western-Blot-Protokolle bzw. nach Herstelleranweisung bestückt und komplett mit Transfer-Puffer aufgefüllt. Der Protein-Transfer fand dann bei 100Volt für 90 Min. im 4°C Kühlraum statt.

Nach erfolgreichem Transfer der Proteinbanden wurde die Membran für 2 Stunden mit Blocking Puffer inkubiert, um unspezifische Bindungen der später eingesetzten Antikörper mit der Membran zu verhindern. Zur Entfernung dieses Puffers war anschließend sorgfältiges Waschen der Membran mit TBST erforderlich. Danach konnte der primäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert werden. Am nächsten Morgen wurde die Antikörper-Lösung wieder entfernt, gefolgt von dreimaligem Waschen der Membran mit TBST. Entsprechend dem ersten Antikörper wurde dann die Membran mit dem passenden sekundären Antikörper in einer Verdünnung von 1:2.000 für 1 Stunde bei Raumtemperatur bebrütet und zum Schluss noch viermal für 5 min mit TBST gewaschen. Die sekundären Antikörper sind an eine Peroxidase gekoppelt, so dass im Anschluss die Detektion mittels

Chemolumineszenz möglich ist. Dafür wurden beide ECL Lösungen nach Herstelleranweisung 1:1 gemischt und auf die feuchte Membran appliziert. Nach einer Minute Inkubation erfolgte die Exposition auf einem entsprechenden Film. Nach 60 sec konnte dann der erste Film entwickelt werden. Je nach Ergebnis folgten dann zur Optimierung der Bandendarstellung entsprechend längere oder kürzere Expositionen.

Das beschriebene Detektionsverfahren bietet die Möglichkeit einer bis zu dreimaligen Wiederholung der Detektion mit jeweils neuen Antikörpern. Dazu musste die Membran für 30 Minuten bei 55°C im rotierenden Wasserbad mit Stripping Puffer behandelt werden. Nach einmaligem Waschen mit TBST kann eine erneute Immunodetektion nach dem selbem Protokoll erfolgen.

Zur internen Standardisierung wurden die Blots jeweils mit Antikörpern gegen  $\beta$ -Tubulin, einem Haushaltsgen, inkubiert.

## 2.4 Coimmunopräzipitation

Diese Methode wurde verwendet, um die Bindung zweier Proteine aneinander *in vivo* zu zeigen. Dazu wird ein Antikörper gegen Protein A mit Agarose beads konjugiert. Dies ermöglicht die anschließende Separation dieses Proteins und seiner Bindungspartner aus dem Lysat. Im zweiten Schritt wird die Probe elektrophoretisch aufgetrennt und nach Western Blot Technik transferiert. Durch Inkubation mit einem Antikörper gegen Protein B lässt sich dann die Bindung der beiden Protein aneinander darstellen.

### 2.4.1 Puffer

*Lyse-Puffer für Coimmunopräzipitation*

50mM	Tris pH 7,5
50mM	NaCl
1mM	EDTA
5%	Glycerol
1%	NP 40
+ Proteinase Inhibitoren	

### 2.4.2 Antikörper

	Eigenschaft	Hersteller
Anti-Pu.1	Polyklonaler AK gegen C-Terminus, Rabbit	Santa Cruz Biotech., USA
Anti-ETO	Polyklonaler AK gegen C-Terminus, Goat	
Normal Rabbit IgG	Kontroll-Antikörper	
Protein A-Agarose	Maus IgG, polyklonaler AK, Rabbit	
Anti-Rabbit IgG-HRP	Sek. AK mit HRP-Konjugat	Amersham, D-Freiburg
Anti-Goat IgG-HRP		Dako, D-Hamburg

*Tabelle 2-6 Antikörper für Coimmunopräzipitation*

### 2.4.3 Methode

Zur Durchführung der Co-Immunopräzipitation kamen ebenfalls Zellkernextrakte wie unter 2.3.3 beschrieben zur Anwendung.

Die eingesetzte Proteinmenge betrug 400µg. Zur Minimierung unspezifischer Bindungen erfolgte ein Preclearing mit

400µg	Lysat
1ml	CoIP Puffer
1,5µl	Normal Rabbit IgG
20µl	Protein A Agarose

Dieser Versuchsansatz wurde 30 Minuten bei 4°C unter Rotation inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation für 5 Minuten bei 2.500 rpm und 4°C wurden unspezifisch gebundene Proteine abgetrennt. Der Überstand wurde dann zusammen mit 3µg des anti PU.1 Antikörpers für 1 Stunde unter Rotation bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von 20µl Protein A-Agarose Lösung weitere Rotation unter vorgenannten Bedingungen für 2 – 4 Stunden.

Durch erneute Zentrifugation konnten dann die PU.1-haltigen Proteinkomplexe separiert werden. Nach dreimaligem Waschen mit Co-IP Puffer konnten die Proben dann entsprechend dem Protokoll unter 2.3.5 für die Gel-Separation vorbereitet werden. Die auf die Membran transferierten Proteine wurden dann mit anti-ETO-Antikörper analysiert.

## 2.5 GST-Protein-Interaktions Assay

Der GST-Protein-Interaktions Assay stellt eine weitere Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen dar. Im Gegensatz zur oben beschriebenen Coimmunopräzipitation bietet sich hier die Möglichkeit auch Interaktionen zwischen mehr als zwei Proteinen zu untersuchen. Eines der interagierenden Proteine wird dabei mittels eines entsprechenden Expressionsvektors (pGEX) als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase(GST)-Tag exprimiert. Durch die hohe Bindungsaffinität von GST zu Glutathion gelingt dann eine effektive Aufreinigung dieser GST-Fusionsproteine mittels Glutathion-Agarose Kugeln (im folgenden GST beads). Um eine direkte Interaktion zwischen einem GST-Fusionsprotein A und einem Protein B nachzuweisen, bedient man sich der radioaktiven Markierung dieses Proteins B mit  $^{35}\text{S}$  im Rahmen einer *in vitro* Translation. Protein A und B werden miteinander inkubiert. Nach verschiedenen Waschschritten erfolgt die Auftrennung der Proteinkomplexe mittels SDS-PAGE. Interagiert das  $^{35}\text{S}$ -markierte Protein wird es mit aufgereinigt und erzeugt ein Signal bei der autoradiographischen Analyse.

### 2.5.1 Puffer

NETN Puffer

20mM	Tris pH 8,0
150mM	NaCl
1mM	EDTA
0,5%	NP 40
0,4mM	PMSF
1µg/ml	Antipain
1µg/ml	Chymotrypsin
1µg/ml	Leupeptin

### 2.5.2 Plasmide

	Beschreibung	Bezugsquelle
pcDNA1-PU.1 pSP65-c-Jun	Murine Expressionsplasmide für in vitro Translation	Behre et al. <sup>67</sup>
pGEX-2TK-PU.1 pGEX-2TK-β3β4	PU.1 bzw. β3β4-Domäne mit GST-Konjugat	
pcDNA3-AE	AML1-ETO wurde an der Xba1-site in pcDNA3 kloniert.	Vangala et al. <sup>68</sup>

*Tabelle 2-7 Plasmide für in vitro Translation und Expressionsplasmide für GST-Fusionsproteine*

### 2.5.3 In-vitro-Translation von Proteinen

Um die Proteine PU.1, c-Jun und AML1-ETO in vitro herzustellen, wurde das TNT<sup>®</sup> Coupled Reticulocyte Lysate System nach Herstelleranweisung verwendet. Zur radioaktiven Markierung der gewonnenen Proteine stand <sup>35</sup>S Methionin zur Verfügung. Für einen 50µl Ansatz wurden folgende Mengen eingesetzt:

25µl	TNT <sup>®</sup> Rabbit reticulocyte lysate
2µl	TNT <sup>®</sup> reaction buffer
1 µl	RNA Polymerase (SP <sub>6</sub> oder T <sub>3</sub> )
1µl	Aminosäure-Mischung ohne Methionin
2µl	<sup>35</sup> S Methionin
1µl	Ribonuclease Inhibitor (Rnasin)
1µg	Plasmid-DNA
	dH <sub>2</sub> O zur Erreichung des Endvolumens

Die Reagenzien wurden gemischt und für 90 Minuten bei 30°C inkubiert.

Anschließend wurden je 2µl der Proben entsprechend dem Protokoll für die Gelelektrophorese vorbereitet und in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt.

Danach wurden die Gele getrocknet und für 5 Stunden auf Biomax Filmen exponiert. Nach Entwicklung der Filme konnte die regelrechte Synthese der Proteine kontrolliert werden.

---

<sup>67</sup> (Zhang et al., 1999)

<sup>68</sup> (Vangala, RK et al., 2003: The myeloid master regulator transcription factor PU.1 is inactivated by AML1-ETO in t(8;21) myeloid leukemia.)

### 2.5.4 Herstellung von GST-Konjugaten

DH5<sub>alpha</sub> Bakterien, die mit den entsprechenden pGEX-Konstrukten transformiert worden waren, wurden in 10ml LB Medium über Nacht bei 37°C bebrütet. Nach Überführung dieser Vor-Kultur in Erlenmeyer-Kolben mit jeweils 100ml LB Medium und einer weiteren Inkubation von 3 Stunden bei 37°C in einem Schüttel-Inkubator. Durch Zugabe von 1M IPTG (Endkonzentration 0,5M) und weiterer Inkubation für 3 Stunden konnte die Synthese der Fusionsproteine induziert werden. Anschließend wurden die Bakterien bei 4500 rpm und 4°C abzentrifugiert und das gewonnene Pellet in 5ml NETN Puffer resuspendiert. Durch 5–6malige Behandlung der Zellen im Ultraschallzerkleinerer für jeweils 15 Sekunden unter anschließender Eiskühlung konnten die Zellenmembranen zerstört werden. Zentrifugation bei 14.000 rpm (5 Minuten bei 4°C) lieferte die synthetisierte Proteine gelöst im Überstand. In der Zwischenzeit wurden je 0,5ml der nach Herstelleranweisung vorhydrierten GST-beads dreimal zur Vorbereitung in NETN-Puffer gewaschen. Durch Inkubation für 1 Stunde bei 4°C mit dem zuvor gewonnen Überstand entstanden die GST-Konjugate. Nach erneutem waschen mit NETN-Puffer waren die Proben bereit zur weiteren Verwendung.

Um die regelrechte Synthese zu kontrollieren, wurden kleine Proben in 12%SDS-Gel aufgetrennt und mittels Comassie Blau visualisiert.

### 2.5.5 Protein-Interaktions-Analyse

25µl der GST-fusionierten Proteine wurden jeweils mit der benötigten Menge der in-vitro-translatierten Proteine für 1 Stunde bei 4°C inkubiert und anschließend zweimal mit NETN Puffer gewaschen. Nach Denaturierung erfolgte die Auftrennung in 12% SDS-Gel. Die getrockneten Gele wurden dann für 3 Stunden auf Biomax Filmen exponiert



## **2.6 Realtime PCR**

Zur Quantifizierung der Genexpression auf RNA-Niveau wurde die Methode der Realtime PCR verwendet. Hierbei wird die Amplifikation von Gensequenzen in Echtzeit gemessen und es kann dann anhand von Eichkurven die Ausgangsmenge an DNA bestimmt werden.

### **2.6.1 U937-Zellen mit Zink-induzierbarer AML1-ETO-Expression**

U937-Zellen mit stabil transfiziertem, Zink-induzierbarem AML1-ETO wurden in frisches Nährmedium mit ZnSO<sub>4</sub> in einer finalen Konzentration von 100µM eingesetzt und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der Zink-Exposition geerntet und dann der entsprechenden RNA-Präparation zugeführt.

### **2.6.2 Patientenproben**

Verglichen wurden insgesamt 10 Knochenmarks-Proben von Patienten mit primärer akuter myeloischer Leukämie des Subtyps M2 zum Zeitpunkt der Erstdiagnose. Dabei trugen die Proben von fünf Patienten die Translokation t(8;21); die übrigen fünf Proben zeigten normalen Karyotyp. Die entsprechenden Proben wurden uns bereits mittels Ficoll-Separation aufbereitet freundlicherweise von C.Schoch und S.Schnittger (Labor für Leukämie-Diagnostik, Med. Klinik III Großhadern) oder als fertig extrahierte RNA-Proben von K.Spiekermann (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) zur Verfügung gestellt.

### **2.6.3 RNA-Präparation**

20 x 10<sup>6</sup> Zellen der gefrorenen Patienten Proben bzw. U937-Zellen wurden in 5 ml eisgekühltem PBS gewaschen und für 5 Minuten bei 1.000 rpm zentrifugiert. Nach einem zweiten Waschschrift in PBS erfolgte die Aufarbeitung der Probe entsprechend dem RNeasy Kit™ Protokoll. Die finale Elution erfolgte mittels RNase freiem Wasser. Anschließend konnte die RNA-Konzentration photometrisch bei 260 und 280 nm bestimmt werden.

#### 2.6.4 Reverse Transkription

Im nächsten Schritt wurden die gewonnene RNA mittels einer retroviralen reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben um die Proben einer quantitativen PCR-Analyse zuführen zu können. Entsprechend dem Protokoll des Omniscript™ RT Kits wurde folgender Reaktionsansatz gewählt:

dNTPs 5mM	2µl
RNA	1µl
RT Puffer 10x	2µl
Oligo-dT (10µM)	2µl
RNasin	1µl
RT Enzym	1µl
RNase freies H <sub>2</sub> O	11µl

Anschließend wurde für 90 min bei 37°C inkubiert. Die Aufbewahrung der cDNA erfolgte bei – 20°C.

#### 2.6.5 Realtime-Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Realtime PCR unter Verwendung des LightCycler™-Systems (Roche Diagnostics) ermöglicht eine Echtzeit-Messung der synthetisierten PCR Produkte. Da das PCR Produkt pro Synthese-Zyklus exponentiell vermehrt wird, kann die initiale Konzentration der Zielsequenz rechnerisch ermittelt werden. Zur Messung der PCR Produkte ist der Einbau eines fluoreszierenden Farbstoffes in die synthetisierte DNA erforderlich. Hierfür wurde SYBR Green™ verwendet, welches effektiv in doppelsträngige DNA eingebaut wird. Diese Fluoreszenz wird am Ende einer jeden Elongationsphase gemessen.

In unseren Versuchen wurde die Expression des Transkriptionsfaktors PU.1 unter Verwendung eines entsprechenden Primer Sets (Search-LC GmbH, D-Heidelberg) quantifiziert. Ebenso wurde aus jeder Probe die Expression des Haushaltsgens Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD) als interner Standard gemessen; diese Primer wurden uns freundlicherweise von Herrn A. Hochhaus, Med.III, Uni Heidelberg, zur Verfügung gestellt<sup>69</sup>. Anschließend konnte das Zielgen relativ

---

<sup>69</sup> (Hochhaus, A et al., 1996: Quantification of residual disease in chronic myelogenous leukemia patients on interferon-alpha therapy by competitive polymerase chain reaction.)

dazu quantifiziert werden, indem jeweils die Ratio zwischen Ziel- und Haushaltsgen (PU.1/G6PD) ermittelt und direkt miteinander verglichen wurde. Als Berechnungsgrundlage für die Quantifizierung der PCR Produkte diente eine Standard-Kurve auf Basis einer Verdünnungsreihe des G6PD Plasmids.

Der Reaktionsansatz erfolgte in folgenden Mengen und Konzentrationen

### **PU.1**

Primer Set PU.1	2 µl
Master Mix (Fast Start)	2 µl
cDNA	10µl
dH <sub>2</sub> O	6 µl
Gesamtvolumen	20µl

### **G6PD**

Primer 1	0,5µl (= 7,5µM)
Primer 2	0,5µl
MgCl <sub>2</sub>	2,4µl (= 4 mM)
Master Mix	2 µl
CDNA	10µl
dH <sub>2</sub> O	4,6µl
Gesamtvolumen	20µl

Zur Durchführung der Realtime PCR wurde folgendes Amplifications-Programm verwendet:

Denaturierung	95°C	10 min
<u>Anschließend insgesamt 35 Zyklen</u>		
Aktivierung der Polymerase	95°C	10 sec
Annealing	68°C	10 sec
Extension	72°C	16 sec

Nach jedem Amplifikationszyklus wurde die Fluoreszenz bei 530 nm gemessen. Im Anschluss an den letzten Syntheszyklus erfolgte eine Schmelzkurven-Analyse, um die PCR-Produkte auf Ihre Reinheit zu überprüfen. Hierzu wurde erneut bei 95°C denaturiert, anschließend Annealing bei 58°C. Danach langsames Erhitzen bis 95°C, wobei eine erneute Fluoreszenz-Messung nach jeweils 0,2°C Temperaturanstieg erfolgte.

### 2.7 Herstellernachweis Reagenzien und Materialien

#### **Zellkultur**

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) Gibco BRL, Rockville, MD, USA

RPMI 1640 Medium

Fetales Kälber Serum (Fetal Bovine Serum, FBS)

Glutamin

Penicillinum/Streptomycin

Trypsin

Gewebekultur-Flaschen 75 cm<sup>2</sup> und 175 cm<sup>2</sup>

Sarstedt, D-Nürnberg

Einmalpipetten

Zentrifugenröhrchen 50ml und 10 ml

Zählkammer

Brand, D-Wertheim

Mikroskop

Zeiss, D-Oberkochen

Inkubator

WTB, D-Tuttlingen

#### **Transfektionen**

6- und 24-well Platten

Sarstedt, D-Nürnberg

100mm Gewebekultur-Platten

Effectene Transfektions Kit

Quiagen, D-Hilden

Maxiprep DNA Isolations-Kit

LipofectAmin Plus Kit

Gibco BRL, Rockville, MD, USA

Dual-Luciferase Assay Kit

PROMEGA, D-Mannheim

Luminometer

Turner Designs TD-20/20

Spektrometer DU-600

Beckmann, D-Heidelberg

#### **Elektrophorese/Western Blot**

Acrylamid 40%

Serva, D-Heidelberg

Ammoniursulfat (APS)

Bio-rad, D-München

Bio-rad Protein-Estimation Kit

SDS

Tris

Gelelektrophorese-Systeme

Detection System ECL

Amersham, D-Braunschweig

ECL-Filme

Rainbow coloured Protein Marker

Nitricellulose Membran

Filmentwicklungs-Gerät

AGFA, D-Leverkusen

Phosphat buffered Saline (PBS)

PAN, D-Aidenbach

#### **In-vitro-Translation**

TNT Reticulocyte Lysate System

PROMEGA, D-Mannheim

35S-Methionin

Amersham, D-Braunschweig

GST beads

Sigma, D-

BIOmax Filme

Kodak, D-

#### **Realtime PCR**

Rneasy Mini Kit

Quiagen, D-Hilden

Omniscript RT cDNA Kit

LightCycler FAST Start DNA

Roche Diagnostics, D-Mannheim

Master SYBR Green I

Light Cycler Instrument

LightCycler Primer Set SPI-1

Search-LC GmbH, D-Heidelberg

## 3 Ergebnisse

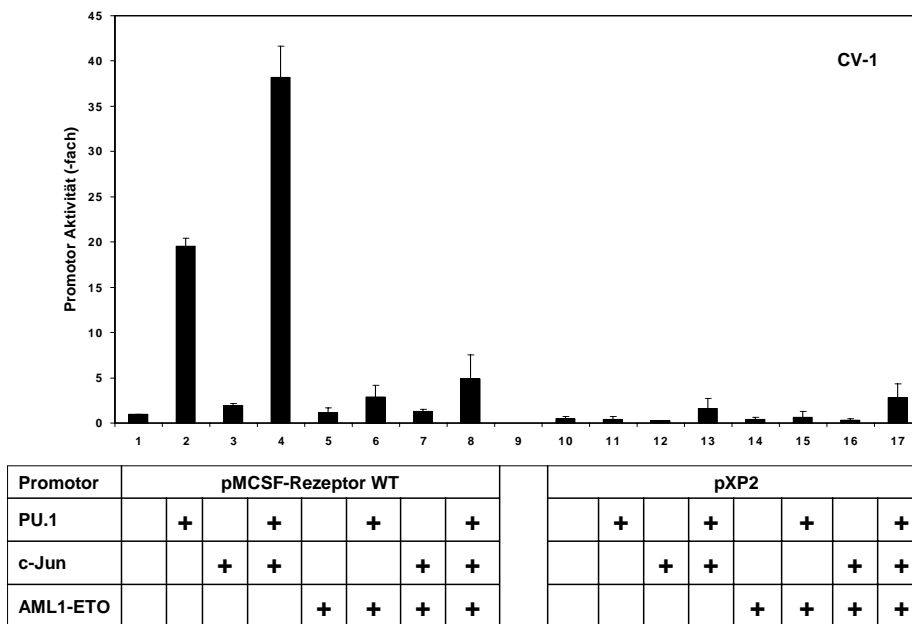
### 3.1 AML1-ETO beeinflusst PU.1-abhängige Transkription negativ

#### 3.1.1 AML1-ETO reduziert die Transaktivierungskapazität des Transkriptionsfaktors PU.1 am M-CSF-Rezeptor Promotor

Zum Studium der Regulationsvorgänge am Promotor des M-CSF-Rezeptors dienten transiente Transfektionsexperimente in nicht-myeloischen CV-1-Zellen. Durch gleichzeitige Einschleusung eines Promotor-Konstruktes des M-CSF-Rezeptors und entsprechender Expressionsplasmide für die Transkriptionsfaktoren PU.1, c-Jun und AML1-ETO konnte die Aktivierung des Promotors durch die Faktoren im Einzelnen und im Zusammenspiel evaluiert werden. Dabei diente *Firefly* Luciferase als Reporter- und *Renilla* Luciferase als Kontroll-System wie unter 2.2.4 beschrieben.

In Abbildung 3-1 werden die jeweiligen Promoter-Aktivitäten der verschiedenen Versuchsansätze gegenüber gestellt. Säule 1 stellt die Basisaktivität des Promotors ohne Zugabe der Expressionsplasmide dar und wird *per definitionem* mit dem Wert 1 angegeben. Alle weiteren Werte verstehen sich als y-fache Aktivität dieser Basisaktivität des Promotors. Alle Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt. Angegebenen wurden die Werte als Mittelwert mit Standardabweichung.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3-1** AML1-ETO blockt die Transaktivierung des M-CSF-Rezeptor Promotors durch den Transkriptionsfaktor PU.1 und seinen Coaktivator c-Jun. Transiente Transfektion in CV-1-Zellen. Transfiziert wurden jeweils 0,2µg des Promotor-Konstruktes pM-CSF-R WT bzw. pXP<sub>2</sub>, 0,05µg des Kontroll-Plasmides pRL0. Die Transfektion der Expressionsplasmide erfolgte nach dem in der Abbildung angegebenen Schema in folgenden Mengen: 0,1µg PU.1, 0,05µg c-Jun und 0,02µg AML1-ETO.

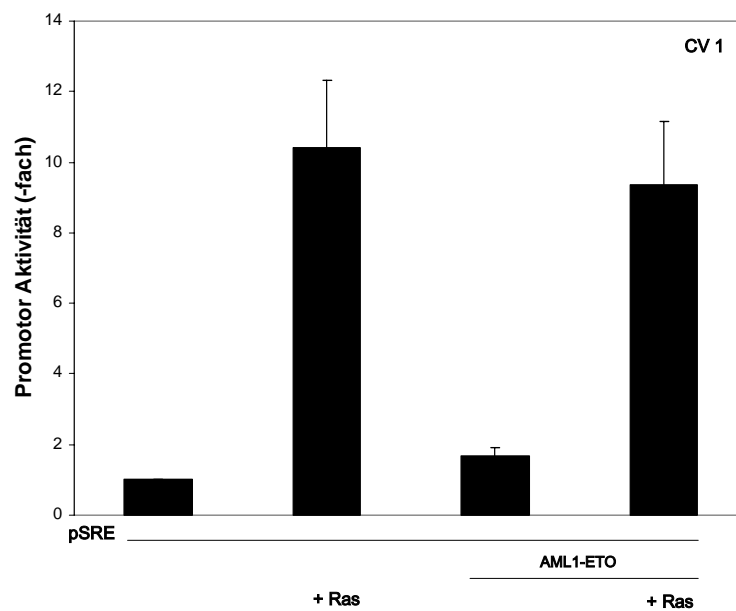
Analog zu den von Behre et al. beschriebenen Ergebnissen, zeigte sich eine deutliche Transaktivierung des M-CSF-Promotors durch PU.1 auf den knapp 20-fachen Wert der basalen Aktivität (Säule 2); bei gleichzeitiger Transfektion von c-Jun wurde eine 38-fache Aktivität (Säule 4) gemessen. Unter zeitgleicher Expression von AML1-ETO lässt sich lediglich eine geringfügige Transaktivierung des Promotors durch PU.1 nachweisen (Säule 6), die auch durch zusätzliche Transfektion des Koaktivators c-Jun nicht wesentlich verbessert werden kann (Säule 8). Die Basisaktivität des Promotors bleibt in Anwesenheit von AML1-ETO nahezu unverändert (Säule 5). Analog wurde dieses Experiment

### 3 Ergebnisse

---

mit dem leeren Reporterkonstrukt pXP2 durchgeführt, um einen vektorvermittelten Effekt auszuschließen (Säulen 10-17).

Als Kontrolle dafür, dass das verwendete AML1-ETO-Konstrukt nicht einfach universell repressiv wirkt, wurden in analogem Versuchsaufbau ein Reporterkonstrukt mit einem vorgeschalteten Serum Response Element (pSRE) und Expressionsplasmiden für Ras in die Zellen transfiziert.



**Abbildung 3-2** Aktivierung des Serum Response Element Promotors (pSRE) durch Ras bleibt auch bei Coexpression von AML1-ETO erhalten. Transfektionen analog zu o.g. Experiment in CV1-Zellen. Basisaktivität des Promotors entspricht dem Wert 1.

Nach 24-stündiger Inkubation zeigte sich eine Aktivierung des pSRE durch Ras das 10,4-faches des Ausgangswertes. Unter Einfluss von AML1-ETO zeigt sich die Basisaktivität des Promotors mit knapp zweifacher Aktivität und bei zusätzlicher Expression von Ras kommt es wieder zu einer deutlichen Aktivierung auf den rund neunfachen Wert.

### 3.1.2 AML1-ETO behindert die koaktivierende Funktion von c-Jun auf PU.1

Um die Kooperation zwischen Transkriptionsfaktor PU.1 und Koaktivator c-Jun genauer untersuchen zu können, wurden die nachfolgenden Experimente in F9-Zellen durchgeführt. Im Gegensatz zu CV1-Zellen findet sich hier keine detektierbare endogene c-Jun-Expression. Das unter 3.1.1 beschriebene Experiment wurde in analogem Versuchsablauf in F9-Zellen wiederholt. Um valide Signale zu erhalten war hier jedoch die Verwendung von 6-well-Platten und somit größeren Zellzahlen sowie eine totalen Menge von 1,0µg DNA erforderlich.

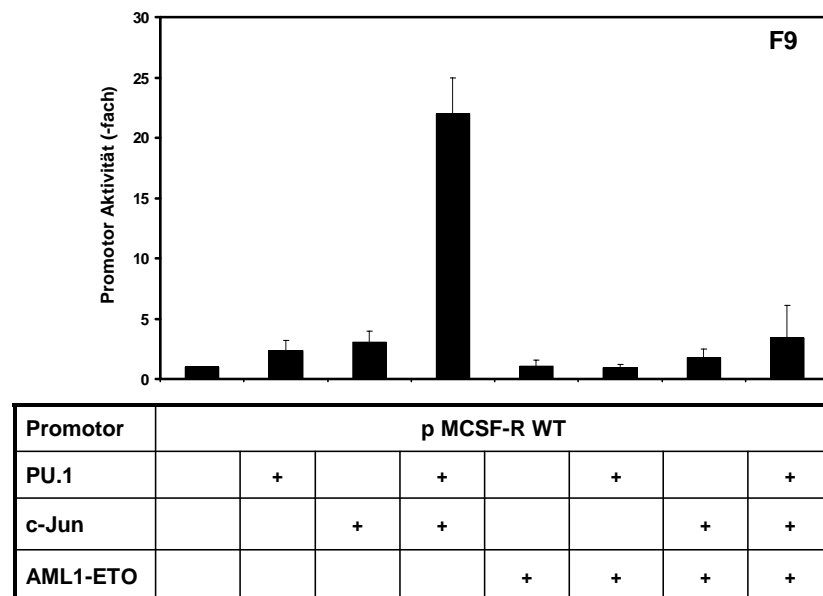


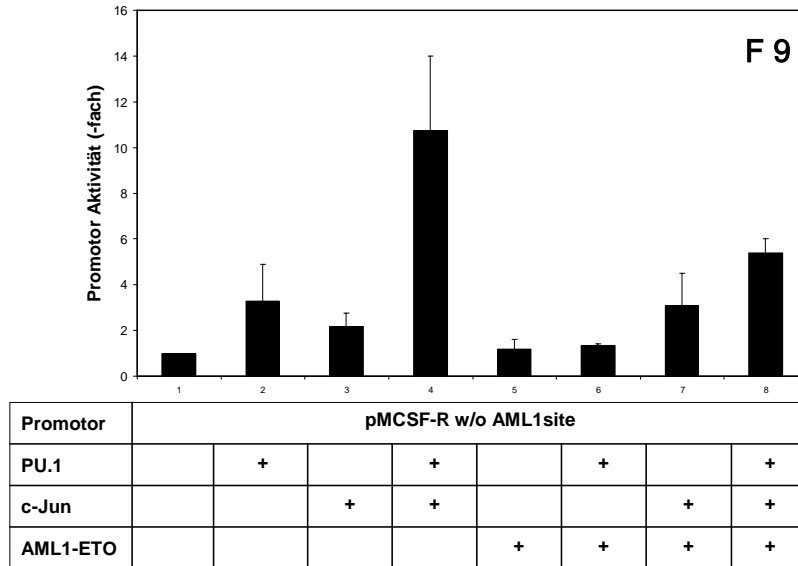
Abbildung 3-3 Transiente Transfektion in F9-Zellen, die keine endogene c-Jun-Expression aufweisen. Versuchsaufbau analog zu Basisexperiment (3.1.1).



Expression von PU.1 führte hier lediglich zu einer Aktivitätszunahme des Promotors auf das zweifache des Ausgangswertes (Säule 2). Hier zeigte sich bereits der deutliche Unterschied der beiden Zellsysteme durch die fehlende endogene c-Jun-Expression. Durch gleichzeitige Überexpression von c-Jun konnte die 21-fache Aktivität erreicht werden. Wurde in entsprechender Versuchsanordnung AML1-ETO koexprimiert, so zeigte sich keinerlei Transaktivierung durch PU.1 alleine (Säule 6) und nur die dreifache Aktivität beim Zusammenwirken beider Faktoren (Säule 8). Diese Ergebnisse zeigen zum einen erneut den Effekt, dass AML1-ETO die Transaktivierungskapazität von PU.1 auf den Promotor effektiv behindert und unterstreichen gleichzeitig die Bedeutung des Koaktivators c-Jun. Dies deutet darauf hin, dass die „Wirksamkeit“ von PU.1 stark von Anwesenheit und Funktion seines Koaktivators c-Jun abhängt und durch AML1-ETO beeinflusst wird.

#### **3.1.3 AML1-Bindungsstelle ist für den beobachteten Effekt nicht erforderlich**

Der M-CSF-Rezeptor-Promotor besitzt in seiner regulatorischen Sequenz Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren. Diese Arbeit beschäftigt sich mit einer durch AML1-ETO veränderten PU.1-Funktion am Promotor. Die Bindungsstellen für PU.1 und AML1-ETO, respektive AML1, innerhalb der regulatorischen Sequenz sind daher von besonderem Interesse. Im nächsten Experiment kam ein Konstrukt mit mutierter AML1-Bindungsstelle zur Anwendung. Es zeigte sich in diesem Versuch, dass die Transaktivierung durch die Faktoren PU.1 und c-Jun auch an diesem Promotor stattfindet (Säulen 2 und 4). Wie in den vorangegangenen Experimenten beeinträchtigt AML1-ETO diese Kooperation aber deutlich und vermindert die Transaktivierung des Promotors durch den PU.1/c-Jun-Komplex um über 50% (Säule 8).

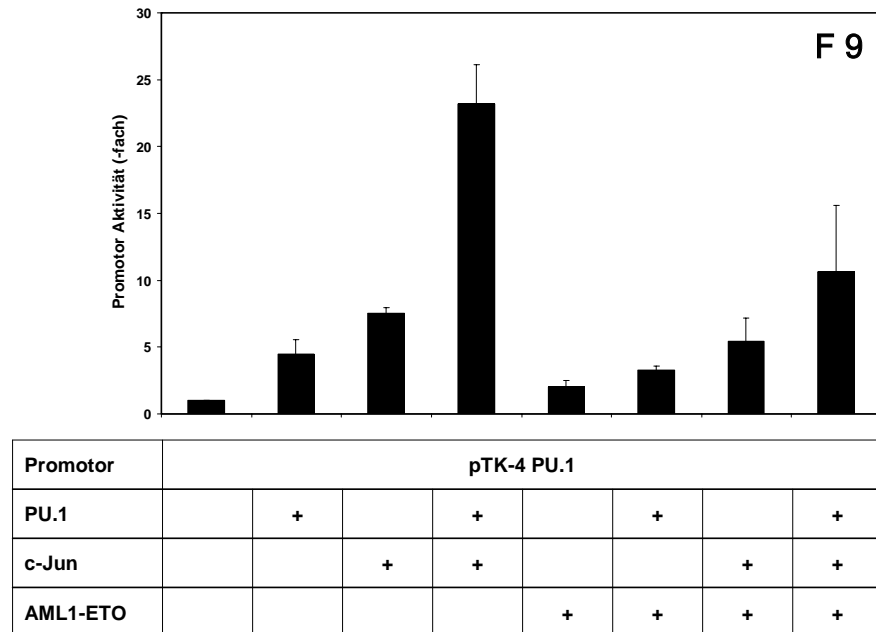


*Abbildung 3-4 Transfektion in F9-Zellen. Promotor mit mutierter AML1-Bindungsstelle. Versuchsablauf analog zu 3.1.2*

Eine Bindung von AML1-ETO an die DNA-Sequenz ist hier bei Fehlen einer intakten AML1-Bindungsstelle weitgehend ausgeschlossen.

### **3.1.4 Ein minimaler Promotor mit PU.1-Bindungsstelle ist ausreichend für reprimierenden Effekt von AML1-ETO**

Um die Hypothese, AML1-ETO wirke in diesem System über Bindung an PU.1, weiter zu festigen, wurden die Promotor-Studien zuletzt an einem Luciferase-Konstrukt wiederholt, das lediglich vier PU.1-DNA-Bindungsstellen vor einem minimalen Thymidinkinasepromotor beinhaltet.



*Abbildung 3-5 Transfektion in F9-Zellen. Auch an einem Minimalpromotor mit vier in Reihe klonierter PU.1-Bindungsstellen blockiert AML-ETO effektiv die Transaktivierungskapazität von PU.1 und c-Jun.*

Im Falle dieses Minimalpromotors konnte durch Bindung von PU.1 eine Aktivitätszunahme auf das 4,5-fache des Ausgangswertes und durch Kooperation von PU.1 und c-Jun die 23-fache Aktivität nachgewiesen werden. Unter Anwesenheit von AML1-ETO verringerte sich die Aktivierung auf das zwei- bzw. zehnfache der Basisaktivität. Die Transaktivierungskapazität wird also auch in diesem Experiment durch AML1-ETO um circa die Hälfte reduziert.

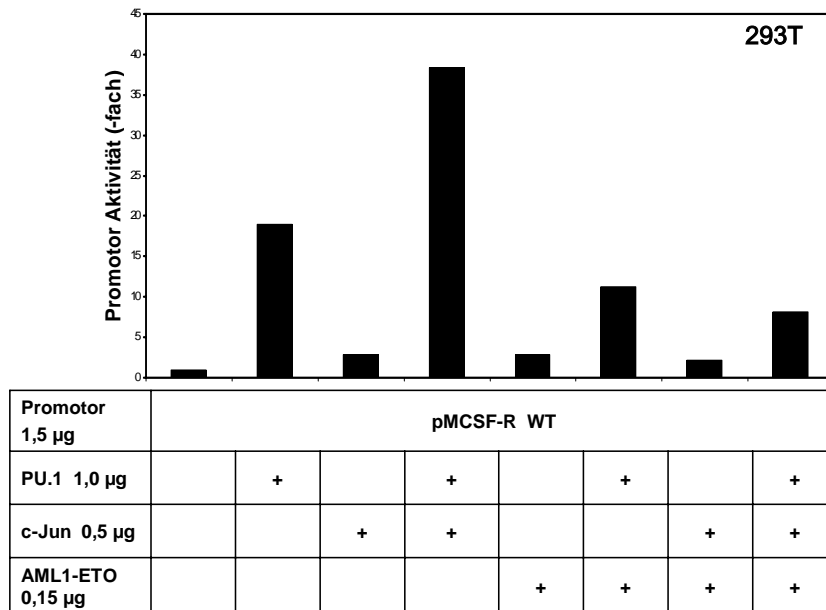
Ein pTK-Promotor mit vier mutierten PU.1-Bindungsstellen wurde in diesem Fall als Kontrolle benutzt und zeigte keine Transaktivierung durch PU.1 und c-Jun.

#### **3.1.5 Expressionsniveau für PU.1 im Modellsystem ist unabhängig von AML1-ETO**

Im verwendeten Modellsystem diente die *Luciferase*-Aktivität als Reporter für die Promotor-Aktivierung. Die gemessene Aktivität kommt durch Transaktivierung der regulatorischen Sequenzen im vorgeschalteten Promotor zustande. Die Intensität der Transaktivierung ist im Wesentlichen abhängig von zwei Faktoren, nämlich der Menge und der Transaktivierungskapazität des Transkriptionsfaktors.

Um zu zeigen, dass durch Koexpression des Fusionsproteins das Expressionsniveau für PU.1 im verwendeten Testsystem unverändert bleibt, wurde PU.1-Expression auf Proteinebene mittels Western-Blot untersucht. Um die für die Western Blot-Technik benötigten Proteinmengen zu erreichen, wurden hier 293T Zellen in 100mm Platten verwendet und mit einer DNA-Menge von 4,0µg mittels Effectene® analog zu vorbeschriebenen Experimenten mit Plasmiden für PU.1 und AML1-ETO sowie pMCSF-Rezeptor transfiziert. Ein Teil der geernteten Zellen wurde mittels Luciferase Assay analysiert, um Transfektionseffektivität und Vorhandensein des Aktivierungsblocks zu überprüfen.

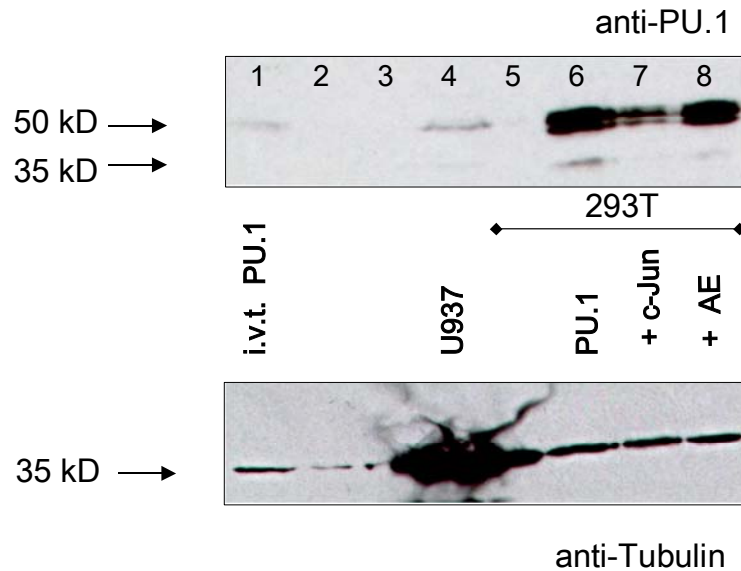
### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3-6** Transfektion von 293T-Zellen mittels Effectene® in 100mm Platten. Auch hier guter Nachweis der vorbeschriebenen Effekte von AML1-ETO auf die Transaktivierungskapazität von PU.1 am M-CSF-Rezeptor-Promotor.

Die eingangs beschriebenen Effekte konnten auch in dieser Zellreihe dargestellt werden, so dass man von einer Eignung der Lysate für die Überprüfung des PU.1-Expression ausgehen kann.

Die restlichen Zellen wurden zur Herstellung von Zellkern-Extrakten verwendet. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration der gewonnenen Lysate erfolgte die Auftrennung der Proteine mittels SDS-Elektrophorese und Immunoblotting mit PU.1-Antikörper.



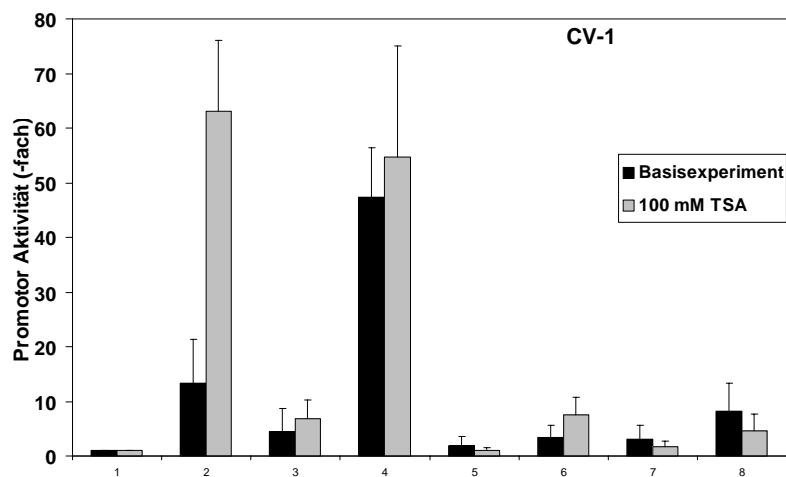
**Abbildung 3-7 Western Blot :** Zelkernextrakte (NE) aus 293T Zellen wurden elektrophoretisch aufgetrennt und nach Übertragen auf eine Membran mit Antikörpern gegen PU.1 sowie  $\beta$ -Tubulin als internen Standard inkubiert. Als Kontrolle wurden NE aus U937 Zellen sowie *in vitro* translatiertes PU.1 verwendet.

In Abbildung 3-7 zeigen die Banden 5 – 8 die Lysate der zuvor transfizierten 293T-Zellen. Als positive Kontrolle für den PU.1 Antikörper diente *in vitro* translatiertes PU.1 (Bande 1) und Lysat von myeloischen U937 Zellen (4). Negativ-Kontrolle i.v.t.-Ansatz ohne DNA (2) und 293T ohne PU.1-Plasmid (5).

Vergleicht man die Banden für PU.1 alleine (6) und PU.1 mit AML1-ETO (AE) (8), so findet sich, korreliert mit den entsprechenden Banden für  $\beta$ -Tubulin als Haushaltsgen, in etwa gleiche Intensität. Das Expressionsniveau des Transkriptionsfaktors PU.1 im Testsystem wird also in Anwesenheit von AML1-ETO nicht verändert.

### 3.2 AML1-ETO benutzt für den beschriebenen Effekt keine Corepressoren

Die Rekrutierung von Corepressoren ist ein häufig vorkommendes Prinzip in der negativen Regulation von Transkriptionsvorgängen. Die unter 3.1.1 dargestellten Versuche wurden deshalb unter Zusatz von Trichostatin A (TSA), einer Substanz, die Corepressoren effektiv blockiert, wiederholt.



Promotor	pMCSF-R WT							
	PU.1		+		+		+	
c-Jun			+	+			+	+
AML1-ETO					+	+	+	+

*Abbildung 3-8 Basisexperiment am M-CSF-R Promotor wie zuvor beschrieben (schwarze Säulen) und nach Zusatz von Trichostatin A (TSA) in einer Endkonzentration von 100mM 3h nach Transfektion (graue Säulen).*

Nach Transfektion laut oben gezeigtem Schema und 3-stündiger Inkubation wurde dem Zellmedium Trichostatin A zugesetzt, so dass sich eine Endkonzentration von 100 mM ergab. Nach 16 weiteren Stunden Bebrütung wurden die Zellen wie in vorangegangenen Experimenten beschrieben geerntet und mittels Luciferase Assay analysiert.

### 3 Ergebnisse

---

Es zeigte sich, dass auch unter Zusatz von TSA die Transaktivierungskapazität von PU.1 durch AML1-ETO effektiv blockiert wird. Es zeigte sich sogar eine Verbesserung der Transaktivierungskapazität von PU.1 durch Zusatz von TSA.



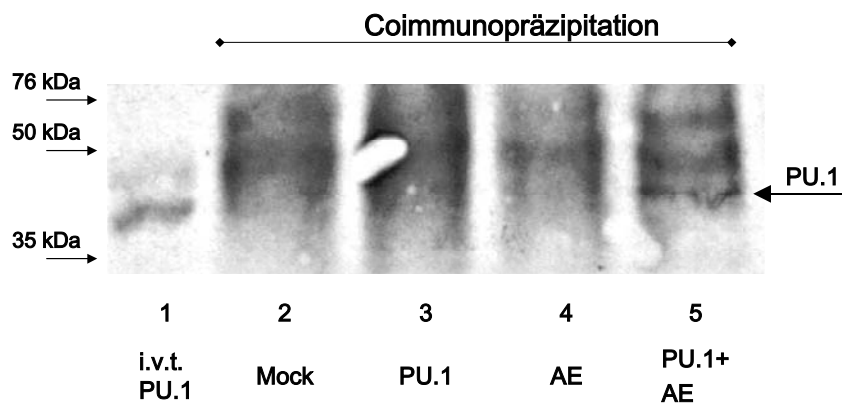
### 3.3 Physikalische Interaktion zwischen PU.1 und AML1-ETO

Nachdem die vorausgegangenen Promotor Studien darauf hinweisen, dass AML1-ETO am M-CSF-Rezeptor Promotor die Transaktivierungskapazität von PU.1 negativ beeinflusst, wurden Protein-Interaktions-Versuche zur Darstellung einer physikalischen Bindung zwischen den beiden Faktoren durchgeführt.

#### 3.3.1 PU.1 und AML1-ETO binden *in vivo* aneinander

Eine mögliche *in vivo* Interaktion zwischen PU.1 und AML1-ETO im Testsystem wurde mittels Coimmunopräzipitations-Studien untersucht.

Aus entsprechend transfizierten 293T Zellen wurden Zellkernextrakte hergestellt und nach dem Protokoll für Coimmunopräzipitation untersucht. Zur primären Präzipitation der AML1-ETO-bindenden Proteine wurde ein anti-ETO-Antikörper eingesetzt. Zur Darstellung nach elektrophoretischer Auftrennung diente anti-PU.1.



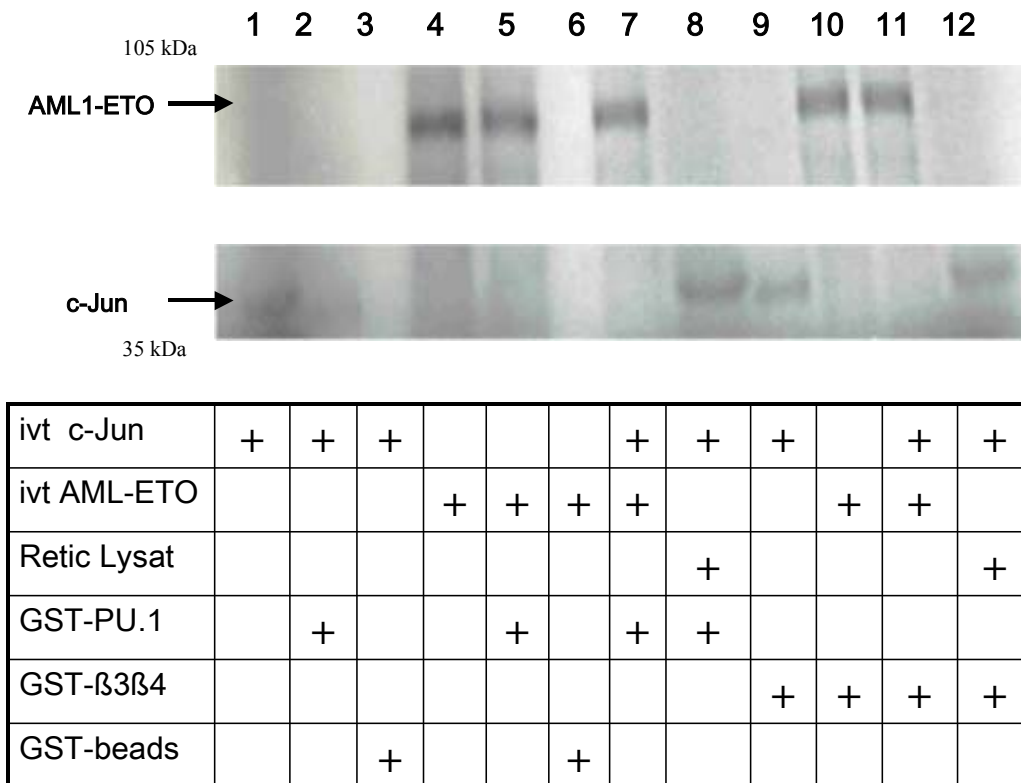
**Abbildung 3-9 Coimmunopräzipitation.** 293T-Zellen wurden wie vorher beschrieben transfiziert, nach 24 h geerntet und zu Zellkernextrakten weiter verarbeitet. Mittels ETO-Antikörper erfolgte die Präzipitation der Proteine. Anschließend elektrophoretische Auftrennung und Darstellung mittels PU.1-Antikörper. Spezifische Bande bei 42 kDa darstellbar. Als Spezifitätskontrolle diente *in vitro* translatiertes PU.1.

Reihe 5 stellt Zellen dar, in denen eine Expression von beiden Transkriptionsfaktoren statt fand. AML1-ETO-haltige Proteinkomplexe wurden mittels anti-ETO Antikörper und Agarose-Partikeln aus dem Lysat separiert. Der Western Blot weist PU.1-Proteine bei 42 kD nach, so dass die Darstellung von PU.1 in Reihe 5 eine physikalische Bindung zwischen PU.1 und AML1-ETO nachweist. Reihen 3 und 4 stehen für Zellen, die nur jeweils eines dieser Proteine exprimieren und zeigen folgerichtig keine spezifischen Banden. Als Kontrolle für die Spezifität der Bande für PU.1 diente *in-vitro-translatiertes* PU.1 (Reihe 1).

#### **3.3.2 AML1-ETO verdrängt c-Jun aus seiner Bindung an der $\beta$ 3/ $\beta$ 4-Domäne**

Die Ergebnisse aus den Transfektionsversuchen deuten bereits darauf hin, dass durch AML1-ETO die Coaktivator-Funktion von c-Jun behindert wird. Eine physikalische Interaktion *in vivo* zwischen PU.1 und AML1-ETO konnte in der Coimmunoprecipitation gezeigt werden. Aus diesen Ergebnissen leitete sich die These ab, dass AML1-ETO letztlich den Coaktivator c-Jun aus seiner Bindungsstelle an PU.1 verdrängt. Um Protein-Protein-Interaktion zwischen den drei Transkriptionsfaktoren PU.1, c-Jun und AML1-ETO zu untersuchen wurde ein GST-pulldown Assay durchgeführt. Es handelt sich hierbei um ein *in vitro* System, das die Darstellung von Interaktionen zwischen mehr als zwei Proteinen erlaubt. Verwendet wurde ein PU.1-GST-Fusionsprotein und *in vitro*-translatiertes und  $^{35}\text{S}$ -markiertes c-Jun und AML1-ETO. Nach gemeinsamer Inkubation und anschließender Aufreinigung erfolgte die Auswertung mittels Autoradiographie.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3-10 Protein-Protein-Interaktion dargestellt mittels GST-pulldown-Assay. PU.1 bzw. β3β4-Domäne gekoppelt an GST-beads wurden jeweils mit in-vitro-translatiertem c-Jun oder AML1-ETO inkubiert und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Als Spezifitätskontrollen dienen Reticulozytenlysate (Retic Lysate) und GST-beads ohne konjugiertes Protein.**

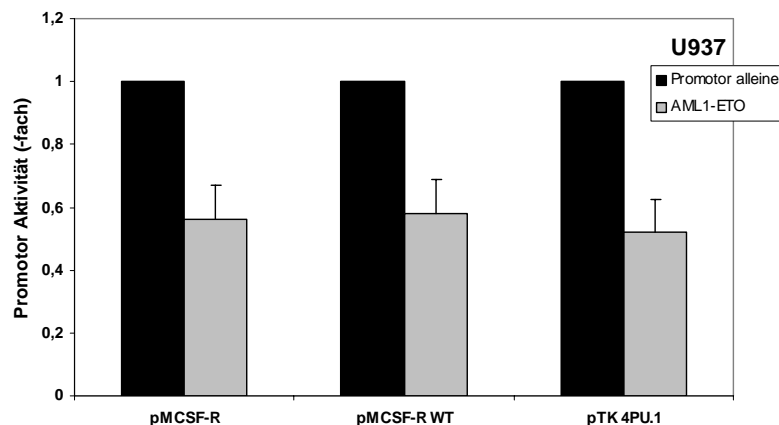
Die Bindung von GST-PU.1. an c-Jun konnte hier dargestellt werden (Bande 2), als Positiv-Kontrolle für c-Jun wurde i.v.t. Protein aufgetragen (1). Verwendet man anstelle von c-Jun das Fusionsprotein AML1-ETO erhält man ebenfalls ein gutes Signal auf Höhe der AML1-ETO-spezifischen Bande, entsprechend einer Interaktion zwischen beiden Proteinen (5). Auch hier i.v.t. AML1-ETO als Positivkontrolle (4). Um zu zeigen, dass es sich um eine spezifische Bindung von PU.1 mit c-Jun bzw. AML1-ETO handelt wurden GST-beads ohne Protein in selber Weise angewandt (Bande 3 und 6). Inkubiert man alle drei Proteine zusammen erhält man ein Signal entsprechend der Bindung von AML1-ETO an PU.1 (Bande 7). Hieraus lässt sich folgern, dass bei äquivalenten Mengen der

konkurrierenden Bindungspartner c-Jun durch AML1-ETO verdrängt wird. Als nochmalige Spezifitätskontrolle in Bande 8 Inkubation mit Reticulozytenlysat anstelle von AML1-ETO.

Zur genaueren Eingrenzung der verantwortlichen Bindungsstelle innerhalb des PU.1-Proteins wurde der Versuch analog mit GST-Beads durchgeführt, die lediglich mit der  $\beta 3/\beta 4$ -Domäne von PU.1 fusioniert sind. Hier konnten ebenfalls eine Bindung beider Proteine einzeln (9,10), sowie eine Verdrängung von c-Jun durch AML1-ETO (11) gezeigt werden. Verwendet man Retikulozyten-Lysate anstelle von AML-ETO, so kann c-Jun seine Bindungsstelle wieder einnehmen (12).

### 3.4 AML1-ETO vermindert die Transkriptionsaktivität des M-CSF-Rezeptor Promotors in myeloischen Zellen

Alle bisher beschriebenen Experimente wurden in Fibroblasten-Kulturen durchgeführt. Im nächsten Schritt sollten die Ergebnisse in myeloischen Zellen weiter verifiziert werden. U937 Zellen wurden mit bereits beschriebenen Promotor-Konstrukten jeweils zusammen mit bzw. ohne AML1-ETO transfiziert und die Promotor-Aktivität nach entsprechender Inkubationszeit mittels Luciferase-Assay gemessen.



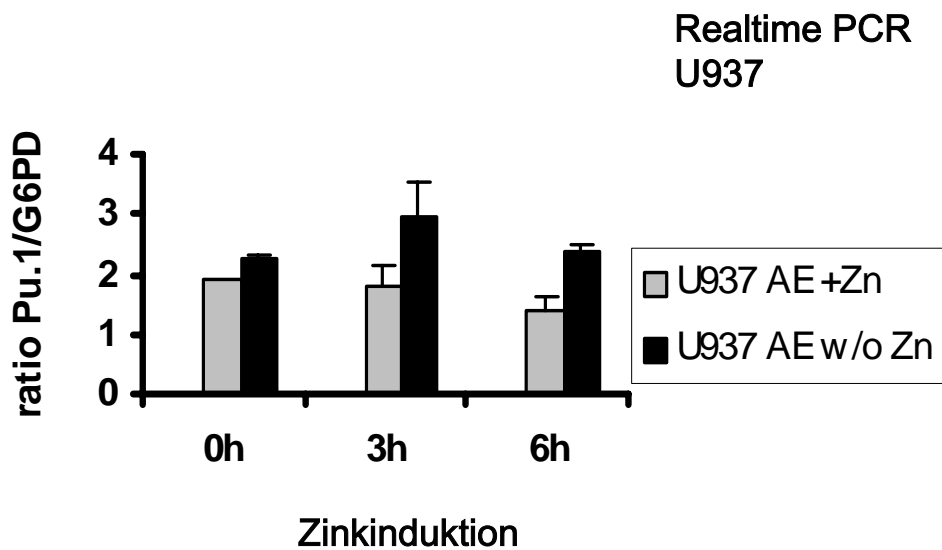
*Abbildung 3-11 Transfektion der verschiedenen Promotor-Konstrukte in myeloischen U937 Zellen. Der jeweiligen Basisaktivität der Konstrukte wurde der Wert 1 zugewiesen (schwarze Säulen) und mit der Aktivität bei Coexpression von AML1-ETO verglichen (graue Säulen).*

Es zeigte sich bei allen Konstrukten eine deutliche Reduktion der Transkriptionsaktivität auf etwa die Hälfte der Ausgangsaktivität durch die Zugabe von AML1-ETO. Die vorbeschriebenen Effekte lassen sich also im myeloischen Zellmilieu ebenfalls darstellen.

### 3.5 Verminderte Expression des autoregulierten Proteins PU.1

PU.1 reguliert seinen eigenen Promotor. Entsprechend ist anzunehmen, dass in Zellen, die die Translokation t(8;21) bzw. das Fusionsgen AML1-ETO tragen, PU.1 weniger exprimiert wird.

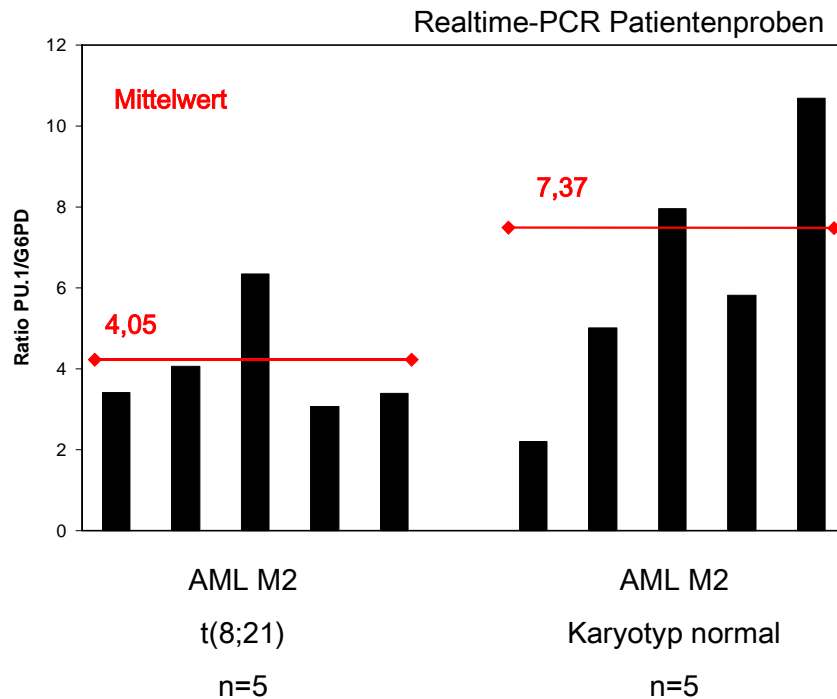
Es wurden Zellen mit stabil transfiziertem Fusionsgene AML1-ETO vor einem Zink-induzierbaren Promotor auf ihre PU.1-Expression auf RNA-Niveau untersucht. Mittels Realtime PCR wurde nach RNA-Extraktion und cDNA-Synthese PU.1 gemessen. Als interner Standard diente das Haushaltsgen Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase. Verglichen wurden die Zellen mit und ohne Zink-Induktion zu verschiedenen Zeitpunkten des Experiments. Nach 3 und 6 Stunden Induktion stellte sich ein deutlicher Unterschied in der Expression dar.



*Abbildung 3-12 U937 Zellen mit Zink-induzierbarer AML1-ETO-Expression wurden mittels Realtime-PCR hinsichtlich ihrer PU.1-Expression auf RNA-Niveau untersucht.*

Während in den Zellen mit Zink-induzierter AML1-ETO-Expression im Verlauf von einer PU.1/G6PD-Ratio von 2 auf 1,5 abnimmt, steigt in nicht-induzierten Zellen der Wert auf 3 nach 3 Stunden und bleibt auch nach 6 Stunden über dem Ausgangsniveau.

Analog wurden Knochenmarks-Proben von AML-Patienten untersucht. Jeweils fünf Proben der Subklasse M2 mit t(8;21) versus M2 klassifizierte Proben mit normalen Karyotyp wurden bezüglich ihrer PU.1-Expression verglichen.



*Abbildung 3-13 Patientenproben der AML-Subklasse M2 mit und ohne t(8;21) wurden auf RNA-Niveau hinsichtlich ihrer PU.1-Expression verglichen. Die Einzelergebnisse der Proben sind als schwarze Säulen dargestellt. Zusätzlich wurden die Mittelwerte der Ergebnisse je Gruppe ermittelt und in die Graphik eingetragen (◆—◆).*

Die Varianz der Ergebnisse war hier zwar sehr groß, bildet man aber die Mittelwerte je Patientengruppe (n=5), so zeigt sich doch ein deutlicher Unterschied in der PU.1/G6PD-Ratio von 4,05 versus 7,37. Um valide Ergebnisse zu bekommen, müsste selbstverständlich ein deutlich größeres Kollektiv untersucht werden. Dennoch kann man zumindest einen Trend hin zu einer verminderten Expression von PU.1 in den t(8;21)-positiven Proben ableiten.

## 4 Diskussion

In der Hämatopoese erfolgt ausgehend von der pluripotenten Stammzelle die Ausdifferenzierung in die verschiedenen Zellreihen. Man weiß heute, dass hierfür ein kompliziertes Zusammenspiel von Transkriptionsfaktoren und extrazellulären Signalen erforderlich ist<sup>70</sup>. In zytogenetischen und molekularbiologischen Untersuchungen von AML-Patienten-Proben zeigte sich, dass die gefundenen Translokationen und Mutationen bevorzugt diese Transkriptionsfaktoren und Signalwege betreffen.

### 4.1 Die Transaktivierungskapazität des Transkriptionsfaktors PU.1 wird durch das Fusionsprotein AML1-ETO blockiert

Für die myeloische Zellreihe wurde der Transkriptionsfaktor PU.1 als einer der wichtigsten Regulatoren der monozytären Zelldifferenzierung charakterisiert<sup>71</sup>. Es konnte bereits gezeigt werden, dass PU.1 während der Hämatopoese auf hohem Niveau exprimiert wird<sup>72</sup> und entscheidend an der Genregulation des M-CSF-Rezeptors beteiligt ist<sup>73</sup>. Dabei wird dieser Transkriptionsfaktor von c-Jun als Coaktivator unterstützt<sup>74</sup>. In PU.1 *knock-out* Mäusen findet zwar ein „lineage commitment“ zur myeloischen Zellreihe statt, die monozytäre Differenzierung fehlt jedoch völlig, ebenso wie die Expression von Rezeptoren für die Wachstumsfaktoren G-CSF, M-CSF und GM-CSF<sup>75,76</sup>. In einer Arbeit von McKercher *et al.* trugen die untersuchten Mäuse homozygot eine Mutation an der

---

<sup>70</sup> (Tenen et al., 1997)

<sup>71</sup> (Nerlov et al., 1998)

<sup>72</sup> (Voso et al., 1994)

<sup>73</sup> (Zhang, DE et al., 1996: Function of PU.1 (Spi-1), C/EBP, and AML1 in early myelopoiesis: regulation of multiple myeloid CSF receptor promoters.)

<sup>74</sup> (Behre et al., 1999)

<sup>75</sup> (Anderson, KL et al., 1998: Neutrophils deficient in PU.1 do not terminally differentiate or become functionally competent.)

<sup>76</sup> (Anderson, KL et al., 1998: Myeloid development is selectively disrupted in PU.1 null mice.)



DNA-bindenden Domäne von PU.1. Dieser Defekt führte innerhalb von 48h postnatal zum Exitus letalis im Rahmen einer ausgeprägten Sepsis bei gestörter Funktion der Neutrophilen. Unter antibiotischer Abdeckung waren die Mäuse jedoch lebensfähig und entwickelten innerhalb von 3 – 5 Tagen postnatal normale T-Zellen. Reife B-Zellen und Makrophagen fehlten jedoch auch weiterhin <sup>77</sup>.

Mueller B. *et al.* konnten in AML-Proben multiple PU.1-Mutationen nachweisen<sup>78</sup>. Dabei wurden insgesamt sieben Defekte (Punktmutationen oder Deletionen) im Bereich der DNA-bindenden Domäne von PU.1 gefunden und es zeigte sich, dass im Rahmen dieser Mutationen sowohl die Bindung an die Promotor-Sequenz als auch die Transaktivierung des M-CSF Rezeptors gestört war. Zusätzlich waren die durch Protein-Interaktion vermittelten Synergie-Effekte mit Coaktivtoren wie c-Jun oder AML1 vermindert. In weiteren Proben fanden sich einzelne Punktmutationen der PEST- oder Transaktivierungs-Domäne. Die beschriebenen Mutationen konnten vor allem in der sehr unreifen AML-Subklasse M0 sowie in der monozytären AML M5 nachgewiesen werden. In den untersuchten AML M2 Proben mit oder ohne Translokation t(8;21) fanden sich keine derartigen Mutationen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass im Fall der AML-ETO-positiven AML ein anderer Mechanismus zur Inaktivierung von PU.1 führen könnte.

### **4.1.1 AML1-ETO blockiert die Transaktivierung durch PU.1/c-Jun an regulatorischen Sequenzen von PU.1-Zielgenen**

Ausgehend von Ergebnissen von Behre *et al.*<sup>79</sup> wurde in dieser Arbeit der Einfluss des Fusionsproteins AML1-ETO auf die Transaktivierung des M-CSF Rezeptor Promotors durch PU.1 und c-Jun untersucht. Wie in Abbildung 3-1 dargestellt konnte in Transfektions-Experimenten gezeigt werden, dass die physiologische Transaktivierung dieses Promotors durch PU.1 effektiv durch Expression von

---

<sup>77</sup> (McKercher, SR *et al.*, 1996: Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities.)

<sup>78</sup> (Mueller *et al.*, 2003)

<sup>79</sup> (Behre *et al.*, 1999)

AML1-ETO blockiert wird. Die Funktion des Transkriptionsfaktors am M-CSF-Rezeptor Promotor lässt sich auch in Anwesenheit von c-Jun nicht wiederherstellen. Anschließend wurden diese Experimente in F9 Zellen wiederholt, die im Gegensatz zu CV-1 keine endogene c-Jun-Expression aufweisen und somit eine genauere Beurteilung der Funktion des Coaktivators c-Jun zulassen. Hier zeigte sich noch deutlicher eine Blockade der PU.1-induzierten Promotor-Aktivierung.

### 4.1.2 *Runt*-Domäne bindet an AML1-Bindungsstelle

Der M-CSF-Rezeptor Promotor verfügt über eine Bindungsstelle für AML1, an die dieser Transkriptionsfaktor über seine *runt*-Domäne bindet<sup>80</sup>. In dem Fusionsprotein AML1-ETO ist diese DNA-bindende Domäne erhalten. *Rhoades et al.* konnten am M-CSF Rezeptor Promotor zeigen, dass auch das Fusionsprotein AML1-ETO an der AML1-Bindungsstelle interagieren kann und in niedrigen Konzentrationen in Synergie mit AML1B diesen Promotor transaktiviert, bei weiterer Dosisescalation jedoch die Transaktivierungskapazität von AML1b eingeschränkt.<sup>81</sup> Es gibt viele Arbeiten, die eine negative Regulation von AML1-Zielgenen durch AML1-ETO zeigen<sup>82,83</sup>. Daneben gibt es sehr viele Arbeiten über eine Modulation von AML1-abhängiger Transkription durch AML1-ETO über Bindung an die AML1-Bindungsstelle. Dabei findet man meist eine negative Regulation über die Rekrutierung von Corepressoren. Betroffene Zielgene sind z.B. GM-CSF Rezeptor, Interleukin 3 oder c-fos.

Um zu zeigen, dass die in dieser Arbeit beschriebenen Effekte von einer AML1-Bindungsstelle unabhängig sind und über einen anderen Mechanismus entstehen, wurde die Transfektionen nochmals unter Verwendung eines Promotor-Konstruktes wiederholt, dessen AML1-Bindungsstelle mutiert und somit nicht mehr bindungsfähig ist. Auch in diesem Versuchsaufbau lässt sich eine effektive

---

<sup>80</sup> (Meyers et al., 1993)

<sup>81</sup> (Rhoades et al., 1996)

<sup>82</sup> (Frank et al., 1995)

<sup>83</sup> (Meyers, S et al., 1995: The t(8;21) fusion protein interferes with AML-1B-dependent transcriptional activation.)

Blockade der Transaktivierung des Promotors durch AML1-ETO nachweisen (vgl. Abbildung 3-4). Somit konnten wir zeigen, daß hier nicht die oben erwähnten, vorbeschriebenen Mechanismen verantwortlich sind, sondern ein neuer repressiver Mechanismus für AML1-ETO bestehen muß.

Um die entscheidende Bindungsstelle innerhalb des M-CSF Rezeptor Promotors weiter einzugrenzen, wurde im nächsten Schritt ein minimaler Promotor mit lediglich vier in Reihe klonierten PU.1-Bindungsstellen verwendet. Auch an diesem minimalen Promotor konnte die Transaktivierung durch PU.1 und den Coaktivator c-Jun analog zu den vorangegangenen Experimenten dargestellt werden und auch in diesem Versuchsaufbau kam es zu einer effektiven Blockade dieser Effekte durch AML1-ETO.

Die PU.1-Bindungsstelle des M-CSF-Rezeptor Promotors konnte also als die Region innerhalb des M-CSF Promotors identifiziert werden, über die der Mechanismus der Blockade der PU.1-Funktion vermittelt wird. Eine direkte Bindung von AML1-ETO an dieser Stelle ist aus struktureller Sicht nicht vorstellbar, so dass der Effekt am ehesten über Protein-Protein-Interaktionen zu erklären ist.

### 4.1.3 AML1-ETO und Chromatin Remodelling

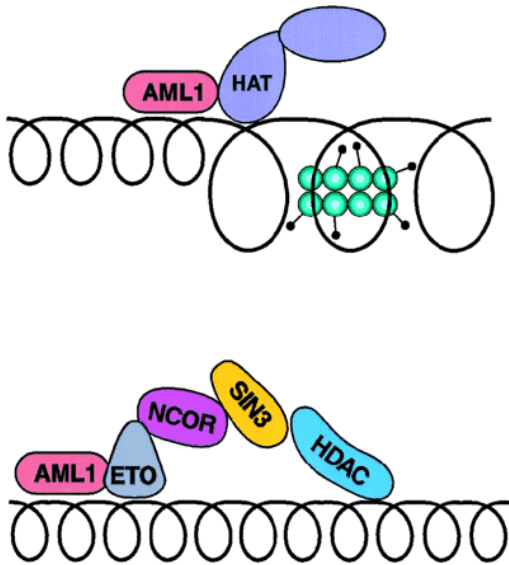
Ein Chromatin Remodelling im Rahmen der Leukämogenese wurde bereits in vielen Übersichtsarbeiten beschrieben <sup>84</sup>. Über Corepressoren werden Histon Deacetylasen (HDAC) gebunden, die Acetyl-Reste von den Histonen abspalten und darüber zu einer stärkeren Verpackung von DNA an den Histonen führen und somit weniger zugänglich für transkriptionelle Vorgänge machen. Der Mechanismus einer Rekrutierung von Corepressoren über Fusionsproteine ist für die Promyelozyten-Leukämie M3 und das hierbei vorkommende Fusionsprotein PML/RAR $\alpha$  gut charakterisiert. Die in der Therapie verwendete All-trans Retinsäure (ATRA) degradiert das Fusionsprotein und stört so die Interaktion mit Corepressoren, was in der Konsequenz zu einer Ausdifferenzierung der leukämischen Blasten und somit zur Remission führt. Diese Therapie ist heute zusammen mit einer konventionellen Induktionstherapie die Standardtherapie dieser Entität und die erste klinisch etablierte spezifische Therapie einer AML.

Auch für das Fusionsprotein AML1-ETO wurde in der Literatur bereits mehrfach das Rekrutieren von Corepressoren als repressiver Mechanismus beschrieben. Beispielsweise in Arbeiten von *Gelmetti et al.* <sup>85</sup> wurde dargestellt, daß über den Zink-Finger des ETO-Anteils des Fusionsproteins die Corepressoren N-CoR und SIN3 binden und so zur Rekrutierung von HDACs führt.

---

<sup>84</sup> (Redner, RL et al., 1999: Chromatin remodeling and leukemia: new therapeutic paradigms.)

<sup>85</sup> (Gelmetti, V et al., 1998: Aberrant recruitment of the nuclear receptor corepressor-histone deacetylase complex by the acute myeloid leukemia fusion partner ETO.)



**Abbildung 4-1A** AML1 rekrutiert eine Coaktivator-Komplex, der Histone acetyliert und so die Transkription der Sequenzen erleichtert.

**4-1B** AML1-ETO bindet NcoR/mSin3 und darüber Histondeacetylasen. Über die Abspaltung der Acetyl-Gruppen kommt es zu einer stärkeren Verpackung der DNA und somit zur Repression der transkriptionellen Aktivität.<sup>86</sup>

Mittels verschiedenen chemischer Substanzen wie Trichostatin A (TSA) und Phenylbutyrat (PB) können die HDACs inhibiert werden und somit der Corepressor-Effekt und der resultierende Transkriptionsblock aufgehoben werden. Dieser Ansatz dient in verschiedenen Arbeiten als Grundlage für neue therapeutische Strategien. Lutterbach *et al.* haben die Aufhebung der repressiven AML1-ETO-Effekte durch die Substanz Trichostatin A gezeigt<sup>87</sup>. Amann *et al.* zeigten sogar weiterführende Effekte dieser Mechanismen auf den Zellzyklus<sup>88</sup>.

Analog zu diesen Arbeiten wurden die Zellen in den von uns beschriebenen Transfektions-Assays mit Trichostatin A behandelt. Was sich zeigte war, dass

---

<sup>86</sup> (Redner *et al.*, 1999)

<sup>87</sup> (Lutterbach, B *et al.*, 1998: ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, interacts with the N-CoR and mSin3 corepressors.)

<sup>88</sup> (Amann, JM *et al.*, 2001: ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, makes distinct contacts with multiple histone deacetylases and binds mSin3A through its oligomerization domain.)

auch unter dieser Substanz die repressiven Effekte von AML1-ETO auf die Transaktivierungskapazität von PU.1 erhalten bleiben. Der beschriebene Effekt scheint somit von Corepressoren unabhängig zu sein. In weiterführenden Experimenten konnten *Vangala et al.* zeigen, dass Mutanten von AML1-ETO, die aufgrund von Punktmutationen nicht mehr mit Ncor und mSin3A interagieren können<sup>89</sup>, dennoch effektiv die Transaktivierungskapazität von PU.1 blockieren<sup>90</sup>. In einer Arbeit von *Wang et al.* konnte nur eine partielle Aufhebung der Repression durch TSA und Phenylbutyrat (PB) gezeigt werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Rekrutierung von Corepressoren nicht den einzigen Mechanismus darstellt, über den AML1-ETO repressive Effekte vermittelt.

### **4.1.4 Physikalische Bindung zwischen AML1-ETO und PU.1 und kompetitive Verdrängung des Coaktivators c-Jun**

PU.1 zählt zu der Familie der ETS-Transkriptionsfaktoren, die in der Regulation von Tumor-assoziierten Genen in hämatopoetischen Zellen eine große Rolle spielen. Diese Transkriptionsfaktoren-Familie ist charakterisiert durch eine „winged-helix-turn-helix“ DNA-bindende Domäne mit einer Länge von 85bp, die sich im c-terminalen Bereich des Proteins findet<sup>91</sup> und der Interaktion mit Coaktivatoren wie z.B. c-Jun oder dem negativen Regulator GATA-1 dient. Daneben findet sich im N-terminalen Bereich eine Glutamin-reiche Region, die eine Rolle als transaktivierende Domäne spielt<sup>92</sup>; sowie eine zentrale PEST-Domäne, die wichtig für Protein-Protein-Interaktionen ist<sup>93</sup>. Für MEF, ein weiteres Mitglied der ETS-Familie von Transkriptionsfaktoren wurde bereits eine physikalische Interaktion mit AML1-ETO gezeigt, die zu einem Funktionsverlust des Transkriptionsfaktors am IL-3 Promotor führt. Dabei interagiert MEF über

---

<sup>89</sup> (Gelmetti et al., 1998)

<sup>90</sup> (Vangala, RK, 2003: AML1/ETO Downregulates the Transcription Factor PU.1 in Acute Myeloid Leukemia.)

<sup>91</sup> (Kodandapani, R et al., 1996: A new pattern for helix-turn-helix recognition revealed by the PU.1 ETS-domain-DNA complex.)

<sup>92</sup> (Klemsz, MJ & Maki, RA, 1996: Activation of transcription by PU.1 requires both acidic and glutamine domains.)

<sup>93</sup> (Pongubala, JM et al., 1992: PU.1 recruits a second nuclear factor to a site important for immunoglobulin kappa 3' enhancer activity.)

seine N-terminale Region mit der Runt-Homologie-Domäne vom AML1-ETO<sup>94</sup>. Die DNA-Bindungskapazität bleibt davon unbeeinträchtigt. Kodandapani et al. stellten in ihrer Arbeit die komplette Struktur eines PU.1-DNA Komplexes dar und identifizierten eine  $\beta 3/\beta 4$ -Region, die zwar innerhalb der DNA-bindenden Domäne liegt, dabei aber nicht direkt an DNA bindet, sondern der löslichen Umgebung präsentiert wird<sup>95</sup>. In der Arbeit von Behre et al. wurde gezeigt, dass c-Jun an dieser  $\beta 3\beta 4$ -Region bindet und PU.1 in JNK-unabhängiger Weise koaktiviert<sup>96</sup>.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde in der vorliegenden Arbeit eine mögliche physikalische Interaktion zwischen PU.1 und AML1-ETO postuliert und entsprechend untersucht.

In Coimmunopräzipitations-Studien konnte eine *in vivo*-Interaktion zwischen AML1-ETO und PU.1 gezeigt werden. Mittels transienter Transfektion stellten wir diese Interaktion in 293T-Zellen dar (vgl. 3.3.1), ebenso lässt sich diese Protein-Interaktion aber auch in Kasumi-Zellen nachweisen, die die Translokation t(8;21) tragen<sup>97</sup>. Analog wurden in GST-pull-down Experimenten die Bindung der Proteine aneinander in einem *in vitro* Versuch genauer analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass c-Jun aus seiner Bindung an PU.1 durch AML1-ETO kompetitiv verdrängt wird und somit seine Coaktivator-Funktion auf PU.1 nicht mehr ausüben kann. Anhand eines GST-Fusionsproteins der  $\beta 3\beta 4$ -Region konnte dargestellt werden, dass die Bindung von AML1-ETO an PU.1 ebenso wie die Bindung von c-Jun an dieser Region statt findet (vgl. 3.3.2). Obwohl es sich hierbei um eine Region handelt, die unmittelbar an der DNA-bindenden Domäne liegt, bleibt die DNA-Bindungskapazität von PU.1 voll erhalten, wie in weiterführenden Experimenten dargestellt werden konnte<sup>98</sup>.

---

<sup>94</sup> (Mao, S et al., 1999: Functional and physical interactions between AML1 proteins and an ETS protein, MEF: implications for the pathogenesis of t(8;21)-positive leukemias.)

<sup>95</sup> (Kodandapani et al., 1996)

<sup>96</sup> (Behre et al., 1999)

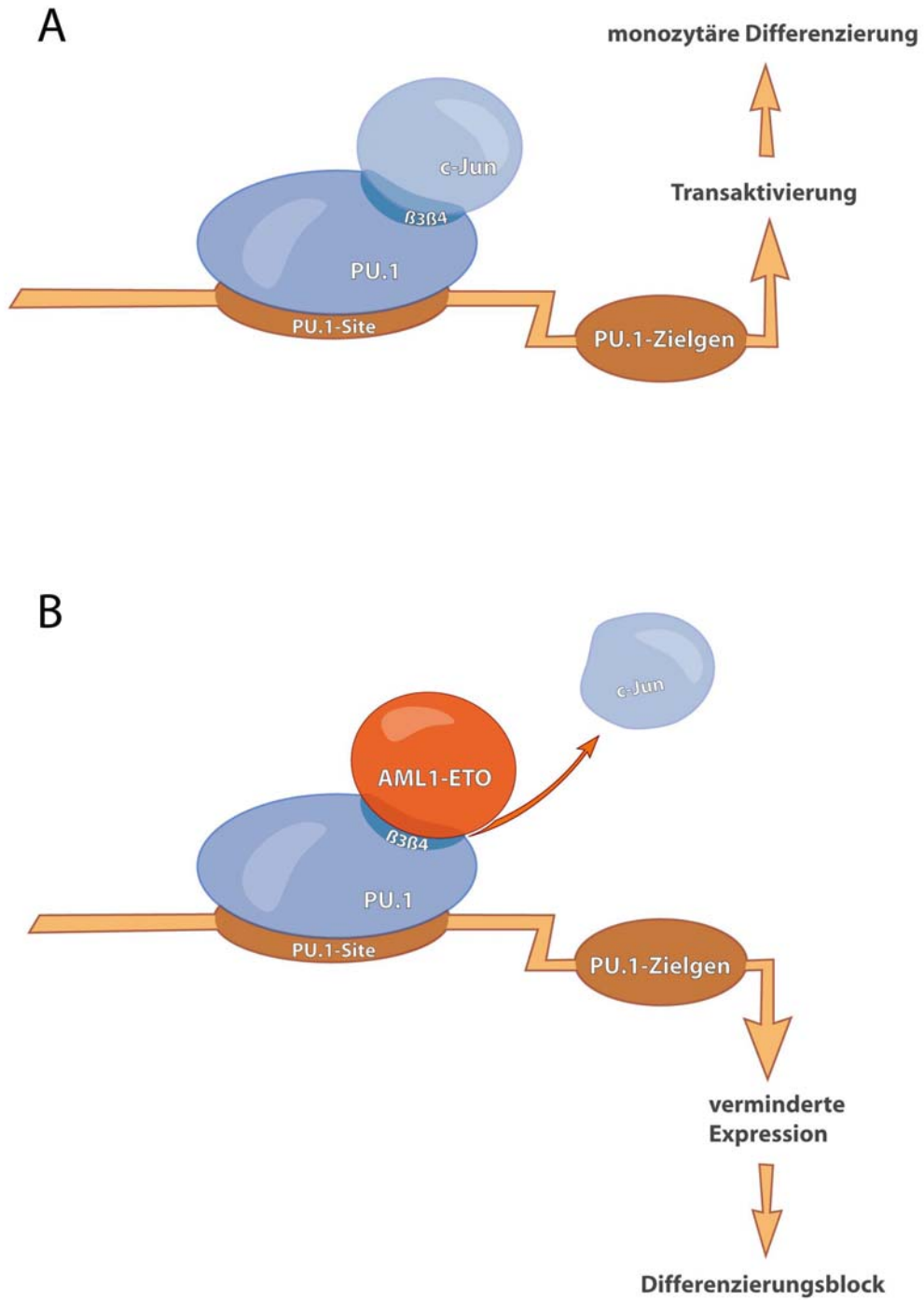
<sup>97</sup> (Vangala et al., 2003)

<sup>98</sup> (Vangala et al., 2003)

Diese Experimente zeigen also, dass AML1-ETO an der  $\beta 3\beta 4$ -Region der DNA-bindenden Domäne gebunden wird und dadurch c-Jun aus seiner Bindung an dieser Stelle verdrängt. C-Jun kann so seine Funktion als Coaktivator nicht mehr erfüllen. Stattdessen bindet AML1-ETO und reduziert so die Transaktivierungskapazität von PU.1 deutlich. Es kommt zu einer stark verminderten Expression von PU.1-Zielgenen, die für die myelomonozytäre Ausdifferenzierung sehr wichtig sind. Letzlich resultiert ein Blockade der normalen Zelldifferenzierung, die dann morphologisch als blastischer Zellklon nachweisbar ist.

In nachfolgender Abbildung wird der Mechanismus der normalen Transaktivierung durch PU.1 und seinen Coaktivator c-Jun sowie die veränderte Situation bei Vorhandensein des Fusionsproteins AML1-ETO schematisch dargestellt.





*Abbildung 4-2 Modellmechanismus AML1-ETO blockiert die Transaktivierungskapazität von PU.1 durch Verdrängung des Coaktivators c-Jun. Es resultiert eine verminderte Expression der Zielgene von PU.1 und somit eine Blockade der monozytären Ausdifferenzierung der Vorläuferzellen.*

## **4.2 Das Fusionsprotein AML1-ETO stört die physiologische Differenzierung innerhalb der myeloischen Zellreihe und trägt so zur Leukämieentstehung bei**

In dieser Arbeit vorgestellte Experimente wurden größtenteils an Promotor-Konstrukten für den M-CSF Rezeptor durchgeführt bzw. an minimalen Promotorkonstrukten mit PU.1 Bindungsstellen. Solche PU.1-Bindungsstellen finden sich jedoch in vielerlei regulatorischen Sequenzen der Wachstumsfaktoren und Oberflächenmarker die an der Hämatopoese beteiligt sind und dementsprechend gilt PU.1 als einer der Hauptregulatoren der Blutbildung. Bei fehlerhafter Funktion dieses wichtigen Transkriptionsfaktors – sei es aufgrund einer Mutation oder aufgrund funktioneller Störungen – kommt es zu einer Deregulation der physiologischen Hämatopoese und somit zur Leukämie-Entstehung.

Um die biologische Signifikanz des beschriebenen Mechanismus zu untermauern, dienten Experimente in myeloischen Zellreihen und an Patientenproben.

### **4.2.1 AML1-ETO blockiert die Transaktivierungskapazität von PU.1 in myeloischen Zellreihen**

Die initialen Versuche wurden in Fibroblasten-Kulturen durchgeführt, die neben anderen Besonderheiten von hämatopoetischen Zellen beispielsweise keine endogene Expression von AML1B und PU.1 aufweisen. Um die Gültigkeit der gemachten Beobachtungen auf hämatopoetische Zellen zu übertragen, wurden im nächsten Schritt Transfektions-Versuche an der myeloischen Zellreihe U937 durchgeführt. Verglichen wurde jeweils die Promotor-Aktivität mit und ohne Coexpression von AML1-ETO. Dabei zeigte sich erneut eine signifikante Einschränkung der transkriptionellen Aktivität durch das Fusionsprotein. Somit zeigt sich hier anschaulich, dass sich auch im physiologischen Setting der myeloischen Zelle der negative Effekt darstellen lässt. *Vangala et al.* untersuchten in weiterführenden Experimenten auch die morphologischen Auswirkungen auf myeloische Zellkulturen. Wird in HL60 Zellen PU.1 überexprimiert, so führt dies

zu einer Differenzierung in die myeloische Zellreihe; zur Evaluation wurde hier eine FACS Analyse der Oberflächenmarker CD11b und CD14 verwendet. Bei gleichzeitiger Expression von AML1-ETO war wiederum die Expression der Linien-spezifischen Oberflächenmarker deutlich vermindert, was letztlich ein guter Marker für einen Differenzierungsblock ist <sup>99</sup>.

### **4.2.2 Herunterregulation von PU.1-Zielgenen in t(8;21)-positiven Patientenproben**

Untersucht man t(8;21)-positive Patienten-Proben und vergleicht sie mit entsprechenden Proben der Subklasse M2 mit normalem Karyotyp so zeigen sich bezüglich der Expression bestimmter Zielgene und Oberflächenmarker signifikante Unterschiede. Vergleicht man die Expression des autoregulierten Transkriptionsfaktors PU.1 so findet man eine verminderte Expression in den t(8;21)-positiven Patienten Proben (vgl. 3.5). Von *Vangala et al.* konnte gezeigt werden, dass sich auch die Expression der o.g. typischen Oberflächen-Marker CD11b, CD14 sowie CD64 in Proben mit AML1-ETO deutlich verringert darstellt<sup>100</sup>. Die Expression dieser Marker ist ebenfalls durch PU.1 reguliert<sup>101, 102</sup>. Die Deregulation dieses wichtigen Transkriptionsfaktors hat somit weitreichende Folgen für die Hämatopoese und resultiert letztlich in einem Differenzierungsblock.

### **4.2.3 Deregulation verschiedener Transkriptionsfaktoren durch AML1-ETO**

Der Transkriptionsfaktor PU.1 gilt als einer der Hauptregulatoren der physiologischen Hämatopoese. Ist seine Funktion bzw. Transaktivierungskapazität auf entsprechende Promotoren eingeschränkt, so führt dies zu einer Störung der normalen Differenzierungsvorgänge. Aber auch

---

<sup>99</sup> (Vangala, 2003)

<sup>100</sup> (Vangala et al., 2003)

<sup>101</sup> (Olweus, J et al., 1996: Granulocytic and monocytic differentiation of CD34hi cells is associated with distinct changes in the expression of the PU.1-regulated molecules, CD64 and macrophage colony-stimulating factor receptor.)

<sup>102</sup> (Pahl, HL et al., 1993: The proto-oncogene PU.1 regulates expression of the myeloid-specific CD11b promoter.)

verschiedene andere Transkriptionsfaktoren innerhalb der Myelopoese werden von AML1-ETO stark beeinflusst.

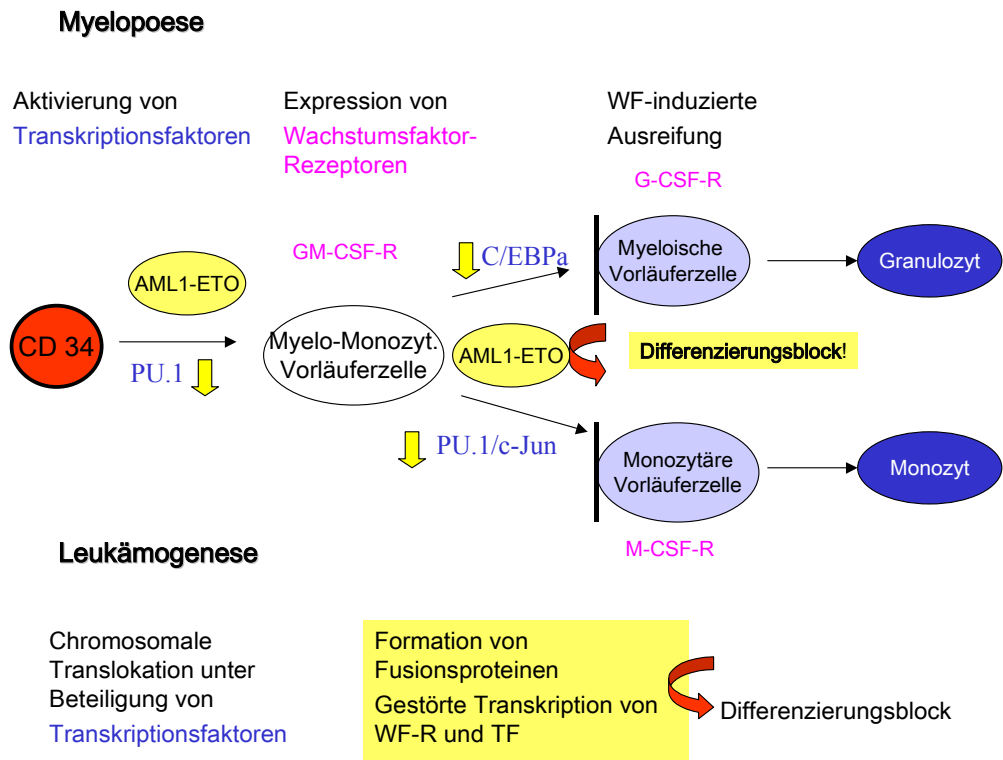
C/EBP $\alpha$  ist für die Differenzierung von Granulozyten von entscheidender Bedeutung. Auch hier stört AML1-ETO die normalen Differenzierungsvorgänge massiv. Zum einen beobachtet man in AML1-ETO-positiven Zellen verminderte Expression von CEBP $\alpha$ , die auf einer Störung der positiven Autoregulation dieses Proteins beruht<sup>103</sup>. Außerdem blockiert das Fusionsprotein CEBP $\alpha$ -abhängige Transkription über eine direkt benachbarte AML1-Bindestelle<sup>104</sup> und verhindert so granulozytäre Differenzierung. Zusätzlich erhöht AML1-ETO die Expression des Protoonkogens und Transkriptionsfaktors c-Jun, der durch Interaktion am Leucin-Zipper die DNA-Bindung und damit die Funktion von CEBP $\alpha$  blockiert<sup>105</sup>. Sowohl die Wirkung auf CEBP $\alpha$  also auch auf PU.1/c-Jun beruhen auf Protein-Protein-Interaktionen zwischen der *Runt*-Dommäne des Fusionsproteins AML1-ETO und diesen Transkriptionsfaktoren.

---

<sup>103</sup> (Pabst, T et al., 2001: AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia.)

<sup>104</sup> (Westendorf, JJ et al., 1998: The t(8;21) fusion product, AML-1-ETO, associates with C/EBP-alpha, inhibits C/EBP-alpha-dependent transcription, and blocks granulocytic differentiation.)

<sup>105</sup> (Rangatia, J et al., 2003: Elevated c-Jun expression in acute myeloid leukemias inhibits C/EBPalpha DNA binding via leucine zipper domain interaction.)



**Abbildung 4-3** Das leukämische Fusionsprotein AML1-ETO stört die physiologische Funktion von Transkriptionsfaktoren in der Hämatopoese und führt so zu einem Differenzierungsblock.

Interessant ist, dass sowohl die repressive Wirkung des Fusionsproteins auf PU.1 als auch auf CEBP $\alpha$  durch Überexpression des jeweiligen Transkriptionsfaktors überwunden werden kann; bei Versuchen in t(8;21)-positiven Kasumi-Zellen konnte so durch Überexpression von PU.1 ein Differenzierung in Richtung monozytärer Linie erreicht werden<sup>106</sup> bzw. eine Differenzierung zu Granulozyten bei Überexpression von CEBP $\alpha$ <sup>107</sup>. Diese Beobachtungen deuten drauf hin, dass AML1-ETO-vermittelte Effekte nicht „irreversibel“ sind.

<sup>106</sup> (Vangala et al., 2003)

<sup>107</sup> (Radomska, HS et al., 1998: CCAAT/enhancer binding protein alpha is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors.)

Moderne Mikroarray-Untersuchungen an AML1-ETO-exprimierenden U937-Zellen zeigten, daß die Regulation von verschiedenen Genen gestört ist, die an den „DNA-repair-Mechanismen“ beteiligt sind<sup>108</sup>. Dies könnte zu einer genetischen Instabilität führen und so die Entstehung von weiteren Mutationen begünstigen, die letztlich zum Vollbild der Leukämie führen.

Insgesamt geht man heute in der Pathogenese der Leukämie von einem Modell aus, in dem zur vollen Ausprägung des Krankheitsbildes mindestens zwei genetische Aberrationen zusammenwirken müssen. Veränderungen im Bereich der Transkriptionsfaktoren stören dabei die Differenzierung, während Alterationen im Bereich der Signaltransduktion, z.B. FLT3-Tandemduplikationen oder Ras-Mutationen, zu einer deregulierten Proliferation und Apoptoseinhibition führen. AML1-ETO alleine ist nicht in der Lage das Vollbild einer akuten myeloischen Leukämie zu induzieren<sup>109</sup>, greift aber über viele verschiedene Mechanismen in die Differenzierungsvorgänge der myeloischen Zellreihe ein und trägt so entscheidend zur Entstehung einer akuten myeloischen Leukämie bei. Die in dieser Arbeit beschriebenen Effekte aufgrund von Protein-Protein-Interaktion mit PU.1 führen zu einem Differenzierungsblock innerhalb der myeloischen Zellreihe. Gelingt es, die PU.1-Funktion wiederherzustellen, so beginnen die blastischen Zellen zu differenzieren. In weiterführenden Experimenten von *Vangala et al.* gelang es in AML1-ETO-positiven Kasumi-Zellen durch Überexpression von PU.1 eine monozytäre Differenzierung zu erreichen<sup>110</sup>.

Die akute myeloische Leukämie ist eine Erkrankung mit schlechter Prognose und die aktuellen Therapieregime sind mit hoher Toxizität verbunden. Ziel muss es daher sein, das verbesserte Verständnis der molekularen Pathomechanismen als Grundlage für eine spezifische, an der Biologie der Erkrankung orientierte Therapie zu nutzen. Eine zielgerichtete Therapie verspricht deutlich weniger

---

<sup>108</sup> (Alcalay et al., 2003)

<sup>109</sup> (Yuan, Y et al., 2001: AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations.)

<sup>110</sup> (Vangala et al., 2003)

Nebenwirkungen bei höherer Remissionsrate. Auch wenn derart spezifische Therapien heute noch nicht zur Verfügung stehen, so ermöglicht das gute Verständnis der Biologie der Erkrankung dennoch eine risikoadaptierte Auswahl des richtigen Therapieregimes.

## 5 Zusammenfassung

Die akute myeloische Leukämie ist eine klonale Erkrankung deren pathogenetische Korrelate ein Block in der Differenzierung der pluripotenten Stammzelle sowie eine Störung der Proliferation und Apoptose sind. Zytogenetische und v.a. molekularbiologische Methoden haben entscheidend dazu beigetragen, rekurrente chromosomale Translokationen innerhalb der leukämischen Zellen zu identifizieren. Die beteiligten Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren oder Proteine der Signaltransduktion, die für die Hämatopoese von großer Bedeutung sind. Die resultierenden Fusionsproteine führen zu einer Deregulation der transkriptionellen Vorgänge in der normalen Hämatopoese und tragen so zu einer Blockade der normalen Differenzierungsvorgänge bei. Es resultiert ein maligner Zellklon, der zwar stark proliferiert, die Fähigkeit zur Differenzierung jedoch verloren hat. Die Translokation t(8;21) findet sich in ca. 40% der Fälle einer AML M2 und kodiert für das Fusionsprotein AML1-ETO. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß PU.1, einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren der Myelopoese, durch AML1-ETO in seiner Funktion als positiver transkriptioneller Regulator behindert wird. In Promotorstudien wurde belegt, daß die Transaktivierungskapazität von PU.1 am M-CSF-Rezeptor-Promotor durch Coexpression von AML1-ETO deutlich eingeschränkt wird. Dieser Effekt ist von einer AML1-Bindungsstelle, an die AML1-ETO binden kann, unabhängig; auch an einem Minimalpromotor mit ausschließlich PU.1-Bindungsstellen lässt sich der Effekt nachweisen. Eine physikalische Protein-Protein-Interaktion zwischen PU.1 und AML1-ETO konnte *in vivo* mittels Coimmunopräzipitation und *in vitro* über einen GST-pulldown-Assay nachgewiesen werden. C-Jun, ein Transkriptionsfaktor der als Coaktivator von PU.1 fungiert, wird aus seiner Bindung an der  $\beta 3\beta 4$ -Domäne von PU.1 verdrängt, so daß die kooperative Transaktivierung am Promotor ausbleibt. PU.1-Bindungsstellen finden sich in vielen Promotor-Sequenzen von hämatopoetischen Oberflächenmarkern, Wachstumsfaktoren-Rezeptoren, Zytokinen und



Transkriptionsfaktoren. Auch am PU.1-Promotor finden sich diese Bindungsstellen, über die PU.1 in der normalen Hämatopoese eine positive Autoregulation unterhält. In t(8;21)-positiven Zellen wird dieses positive Feedback unterbrochen und wir konnten sowohl in Patientenproben als auch in U937-Zellen mit Zink-induzierbarer Expression von AML1-ETO reduzierte PU.1-Expression auf RNA-Niveau nachweisen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß AML1-ETO über seine repressive Wirkung auf die Transkriptionskapazität des wichtigen myeloischen Transkriptionsfaktors PU.1 an vielen Stellen der Myelopoese eingreift und so entscheidend zur Entstehung des Differenzierungsblocks im leukämischen Zellklon beiträgt.

## 6 Literaturverzeichnis

Alcalay, M., Meani, N., Gelmetti, V., Fantozzi, A., Fagioli, M., Orleth, A. et al. (2003). Acute myeloid leukemia fusion proteins deregulate genes involved in stem cell maintenance and DNA repair. *J.Clin.Invest*, 112, 1751-1761.

Alcalay, M., Orleth, A., Sebastiani, C., Meani, N., Chiaradonna, F., Casciari, C. et al. (2001). Common themes in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Oncogene*, 20, 5680-5694.

Amann, J. M., Nip, J., Strom, D. K., Lutterbach, B., Harada, H., Lenny, N. et al. (2001). ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, makes distinct contacts with multiple histone deacetylases and binds mSin3A through its oligomerization domain. *Mol.Cell Biol.*, 21, 6470-6483.

Andersen, M. K., Johansson, B., Larsen, S. O., & Pedersen-Bjergaard, J. (1998). Chromosomal abnormalities in secondary MDS and AML. Relationship to drugs and radiation with specific emphasis on the balanced rearrangements. *Haematologica*, 83, 483-488.

Anderson, K. L., Smith, K. A., Connors, K., McKercher, S. R., Maki, R. A., & Torbett, B. E. (1998). Myeloid development is selectively disrupted in PU.1 null mice. *Blood*, 91, 3702-3710.

Anderson, K. L., Smith, K. A., Pio, F., Torbett, B. E., & Maki, R. A. (1998). Neutrophils deficient in PU.1 do not terminally differentiate or become functionally competent. *Blood*, 92, 1576-1585.

Behre, G., Whitmarsh, A. J., Coghlan, M. P., Hoang, T., Carpenter, C. L., Zhang, D. E. et al. (1999). c-Jun is a JNK-independent coactivator of the PU.1 transcription factor. *J.Biol.Chem.*, 274, 4939-4946.

Behre, G., Zhang, P., Zhang, D. E., & Tenen, D. G. (1999). Analysis of the modulation of transcriptional activity in myelopoiesis and leukemogenesis. *Methods*, 17, 231-237.

Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. A., Gralnick, H. R. et al. (1985). Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann.Intern.Med.*, 103, 620-625.

Bitter, M. A., Le Beau, M. M., Rowley, J. D., Larson, R. A., Golomb, H. M., & Vardiman, J. W. (1987). Associations between morphology, karyotype, and clinical features in myeloid leukemias. *Hum.Pathol.*, 18, 211-225.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.*, *72*, 248-254.

Brunning, R., Matutes, R., Harris, N., & et al. (2001). Acute myeloid leukaemia. In E.Jaffe, N. Harris, H. Stein, & et al. (Eds.), *World Health Organization classification of tumors: pathology and genetics of hematopoietic and lymphoid tissues* (pp. 75-188).

Buske, C. & Humphries, R. K. (2000). Homeobox genes in leukemogenesis. *Int.J.Hematol.*, *71*, 301-308.

Chen, H. M., Zhang, P., Voso, M. T., Hohaus, S., Gonzalez, D. A., Glass, C. K. et al. (1995). Neutrophils and monocytes express high levels of PU.1 (Spi-1) but not Spi-B. *Blood*, *85*, 2918-2928.

Christ, O., Feuring-Buske, M., Hiddemann, W., & Buske, C. (2007). [Pathobiology of acute myeloid leukemia]. *Med.Klin.(Munich)*, *102*, 290-295.

Cross, M. A., Heyworth, C. M., Murrell, A. M., Bockamp, E. O., Dexter, T. M., & Green, A. R. (1994). Expression of lineage restricted transcription factors precedes lineage specific differentiation in a multipotent haemopoietic progenitor cell line. *Oncogene*, *9*, 3013-3016.

Darrow, A. L., Rickles, R. J., & Strickland, S. (1990). Maintenance and use of F9 teratocarcinoma cells. *Methods Enzymol.*, *190*, 110-117.

Elsasser, A., Franzen, M., Kohlmann, A., Weisser, M., Schnittger, S., Schoch, C. et al. (2003). The fusion protein AML1-ETO in acute myeloid leukemia with translocation t(8;21) induces c-jun protein expression via the proximal AP-1 site of the c-jun promoter in an indirect, JNK-dependent manner. *Oncogene*, *22*, 5646-5657.

Falini, B., Mecucci, C., Tiacci, E., Alcalay, M., Rosati, R., Pasqualucci, L. et al. (2005). Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N.Engl.J.Med.*, *352*, 254-266.

Feuring-Buske, M., Hiddemann, W., & Buske, C. (2002). [Pathogenesis and biology of leukemias]. *Internist (Berl)*, *43*, 1179-1189.

Frank, R., Zhang, J., Uchida, H., Meyers, S., Hiebert, S. W., & Nimer, S. D. (1995). The AML1/ETO fusion protein blocks transactivation of the GM-CSF promoter by AML1B. *Oncogene*, *11*, 2667-2674.

Frank, R. C., Sun, X., Berguido, F. J., Jakubowiak, A., & Nimer, S. D. (1999). The t(8;21) fusion protein, AML1/ETO, transforms NIH3T3 cells and activates AP-1. *Oncogene*, *18*, 1701-1710.

Gelmetti, V., Zhang, J., Fanelli, M., Minucci, S., Pelicci, P. G., & Lazar, M. A. (1998). Aberrant recruitment of the nuclear receptor corepressor-histone deacetylase

complex by the acute myeloid leukemia fusion partner ETO. *Mol.Cell Biol.*, 18, 7185-7191.

Gilliland, D. G. & Griffin, J. D. (2002). The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*, 100, 1532-1542.

Haferlach, T., Schnittger, S., Kern, W., Hiddemann, W., & Schoch, C. (2004). Genetic classification of acute myeloid leukemia (AML). *Ann.Hematol.*, 83 Suppl 1, S97-100.

Haferlach, T. & Schoch, C. (2002). [Modern techniques in leukemia diagnosis]. *Internist (Berl)*, 43, 1190, 1193-1190, 1202.

Haferlach, T. & Schoch, C. (2002). [WHO classification of acute myeloid leukaemia (AML) and the myelodysplastic syndrome (MDS)]. *Dtsch.Med.Wochenschr.*, 127, 447-450.

Haferlach, T., Schoch, C., Löffler, H., Gassmann, W., Kern, W., Schnittger, S. et al. (2003). Morphologic dysplasia in de novo acute myeloid leukemia (AML) is related to unfavorable cytogenetics but has no independent prognostic relevance under the conditions of intensive induction therapy: results of a multiparameter analysis from the German AML Cooperative Group studies. *J.Clin.Oncol.*, 21, 256-265.

Heim S. & Mittelman F. (1995). *Cancer Cytogenetics*. (2nd ed.) New York: Wiley-Liss.

Hochhaus, A., Lin, F., Reiter, A., Skladny, H., Mason, P. J., van Rhee, F. et al. (1996). Quantification of residual disease in chronic myelogenous leukemia patients on interferon-alpha therapy by competitive polymerase chain reaction. *Blood*, 87, 1549-1555.

Hromas, R., Orazi, A., Neiman, R. S., Maki, R., Van Beveran, C., Moore, J. et al. (1993). Hematopoietic lineage- and stage-restricted expression of the ETS oncogene family member PU.1. *Blood*, 82, 2998-3004.

JENSEN, F. C., GIRARDI, A. J., GILDEN, R. V., & KOPROWSKI, H. (1964). INFECTION OF HUMAN AND SIMIAN TISSUE CULTURES WITH ROUS SARCOMA VIRUS. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 52, 53-59.

Jin, C., Li, H., Ugai, H., Murata, T., & Yokoyama, K. K. (2002). Transcriptional regulation of the c-jun gene by AP-1 repressor protein JDP2 during the differentiation of F9 cells. *Nucleic Acids Res.Suppl*, 97-98.

Kern, W., Schoch, C., Haferlach, T., & Schnittger, S. (2005). Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Crit Rev.Oncol.Hematol.*, 56, 283-309.

Klemsz, M. J. & Maki, R. A. (1996). Activation of transcription by PU.1 requires both acidic and glutamine domains. *Mol.Cell Biol.*, 16, 390-397.

Kodandapani, R., Pio, F., Ni, C. Z., Piccialli, G., Klemsz, M., McKercher, S. et al. (1996). A new pattern for helix-turn-helix recognition revealed by the PU.1 ETS-domain-DNA complex. *Nature*, *380*, 456-460.

Levanon, D., Glusman, G., Bangsow, T., Ben Asher, E., Male, D. A., Avidan, N. et al. (2001). Architecture and anatomy of the genomic locus encoding the human leukemia-associated transcription factor RUNX1/AML1. *Gene*, *262*, 23-33.

Look, A. T. (1997b). Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science*, *278*, 1059-1064.

Look, A. T. (1997c). Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science*, *278*, 1059-1064.

Look, A. T. (1997a). Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science*, *278*, 1059-1064.

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

Lutterbach, B., Westendorf, J. J., Linggi, B., Patten, A., Moniwa, M., Davie, J. R. et al. (1998). ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, interacts with the N-CoR and mSin3 corepressors. *Mol.Cell Biol.*, *18*, 7176-7184.

Mao, S., Frank, R. C., Zhang, J., Miyazaki, Y., & Nimer, S. D. (1999). Functional and physical interactions between AML1 proteins and an ETS protein, MEF: implications for the pathogenesis of t(8;21)-positive leukemias. *Mol.Cell Biol.*, *19*, 3635-3644.

Marcucci, G., Caligiuri, M. A., & Bloomfield, C. D. (2003). Core binding factor (CBF) acute myeloid leukemia: is molecular monitoring by RT-PCR useful clinically? *Eur.J.Haematol.*, *71*, 143-154.

McKercher, S. R., Torbett, B. E., Anderson, K. L., Henkel, G. W., Vestal, D. J., Baribault, H. et al. (1996). Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J.*, *15*, 5647-5658.

Meyers, S., Downing, J. R., & Hiebert, S. W. (1993). Identification of AML-1 and the (8;21) translocation protein (AML-1/ETO) as sequence-specific DNA-binding proteins: the runt homology domain is required for DNA binding and protein-protein interactions. *Mol.Cell Biol.*, *13*, 6336-6345.

Meyers, S., Lenny, N., & Hiebert, S. W. (1995). The t(8;21) fusion protein interferes with AML-1B-dependent transcriptional activation. *Mol.Cell Biol.*, *15*, 1974-1982.

Mueller, B. U., Pabst, T., Osato, M., Asou, N., Johansen, L. M., Minden, M. D. et al. (2003). Heterozygous PU.1 mutations are associated with acute myeloid leukemia. *Blood*, *101*, 2074.

Nerlov, C. & Graf, T. (1998). PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Genes Dev.*, 12, 2403-2412.

Nordeen, S. K. (1988). Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. *Biotechniques*, 6, 454-458.

Nucifora, G. & Rowley, J. D. (1995). AML1 and the 8;21 and 3;21 translocations in acute and chronic myeloid leukemia. *Blood*, 86, 1-14.

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

Olweus, J., Thompson, P. A., & Lund-Johansen, F. (1996). Granulocytic and monocytic differentiation of CD34hi cells is associated with distinct changes in the expression of the PU.1-regulated molecules, CD64 and macrophage colony-stimulating factor receptor. *Blood*, 88, 3741-3754.

Pabst, T., Mueller, B. U., Harakawa, N., Schoch, C., Haferlach, T., Behre, G. et al. (2001). AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia. *Nat.Med.*, 7, 444-451.

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

Pahl, H. L., Scheibe, R. J., Zhang, D. E., Chen, H. M., Galson, D. L., Maki, R. A. et al. (1993). The proto-oncogene PU.1 regulates expression of the myeloid-specific CD11b promoter. *J.Biol.Chem.*, 268, 5014-5020.

Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L., & Baltimore, D. (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 90, 8392-8396.

Petrovick, M. S., Hiebert, S. W., Friedman, A. D., Hetherington, C. J., Tenen, D. G., & Zhang, D. E. (1998). Multiple functional domains of AML1: PU.1 and C/EBPalpha synergize with different regions of AML1. *Mol.Cell Biol.*, 18, 3915-3925.

Pongubala, J. M., Nagulapalli, S., Klemsz, M. J., McKercher, S. R., Maki, R. A., & Atchison, M. L. (1992). PU.1 recruits a second nuclear factor to a site important for immunoglobulin kappa 3' enhancer activity. *Mol.Cell Biol.*, 12, 368-378.

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

Rangatia, J., Vangala, R. K., Singh, S. M., Peer Zada, A. A., Elsasser, A., Kohlmann, A. et al. (2003). Elevated c-Jun expression in acute myeloid leukemias inhibits

C/EBPalpha DNA binding via leucine zipper domain interaction. *Oncogene*, 22, 4760-4764.

Redner, R. L., Wang, J., & Liu, J. M. (1999). Chromatin remodeling and leukemia: new therapeutic paradigms. *Blood*, 94, 417-428.

Rhoades, K. L., Hetherington, C. J., Rowley, J. D., Hiebert, S. W., Nucifora, G., Tenen, D. G. et al. (1996). Synergistic up-regulation of the myeloid-specific promoter for the macrophage colony-stimulating factor receptor by AML1 and the t(8;21) fusion protein may contribute to leukemogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 93, 11895-11900.

Rowley, J. D. (1973). Identificaton of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia. *Ann.Genet.*, 16, 109-112.

Schnittger, S., Schoch, C., Dugas, M., Kern, W., Staib, P., Wuchter, C. et al. (2002). Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood*, 100, 59-66.

Schoch, C., Kern, W., Kohlmann, A., Hiddemann, W., Schnittger, S., & Haferlach, T. (2005). Acute myeloid leukemia with a complex aberrant karyotype is a distinct biological entity characterized by genomic imbalances and a specific gene expression profile. *Genes Chromosomes.Cancer*, 43, 227-238.

Speck, N. A., Stacy, T., Wang, Q., North, T., Gu, T. L., Miller, J. et al. (1999). Core-binding factor: a central player in hematopoiesis and leukemia. *Cancer Res.*, 59, 1789s-1793s.

Spiekermann, K., Dirschinger, R. J., Schwab, R., Bagrintseva, K., Faber, F., Buske, C. et al. (2003). The protein tyrosine kinase inhibitor SU5614 inhibits FLT3 and induces growth arrest and apoptosis in AML-derived cell lines expressing a constitutively activated FLT3. *Blood*, 101, 1494-1504.

Sundstrom, C. & Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int.J.Cancer*, 17, 565-577.

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

Trujillo, J. M., Cork, A., Ahearn, M. J., Youness, E. L., & McCredie, K. B. (1979). Hematologic and cytologic characterization of 8/21 translocation acute granulocytic leukemia. *Blood*, 53, 695-706.

Vangala, R. K. (2003). *AML1/ETO Downregulates the Transcription Factor PU.1 in Acute Myeloid Leukemia*.

Vangala, R. K., Heiss-Neumann, M. S., Rangatia, J. S., Singh, S. M., Schoch, C., Tenen, D. G. et al. (2003). The myeloid master regulator transcription factor PU.1 is inactivated by AML1-ETO in t(8;21) myeloid leukemia. *Blood*, 101, 270-277.

Voso, M. T., Burn, T. C., Wulf, G., Lim, B., Leone, G., & Tenen, D. G. (1994). Inhibition of hematopoiesis by competitive binding of transcription factor PU.1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, *91*, 7932-7936.

Warrell, R. P., Jr., He, L. Z., Richon, V., Calleja, E., & Pandolfi, P. P. (1998). Therapeutic targeting of transcription in acute promyelocytic leukemia by use of an inhibitor of histone deacetylase. *J.Natl.Cancer Inst.*, *90*, 1621-1625.

Westendorf, J. J., Yamamoto, C. M., Lenny, N., Downing, J. R., Selsted, M. E., & Hiebert, S. W. (1998). The t(8;21) fusion product, AML1-ETO, associates with C/EBP-alpha, inhibits C/EBP-alpha-dependent transcription, and blocks granulocytic differentiation. *Mol.Cell Biol.*, *18*, 322-333.

Yergeau, D. A., Hetherington, C. J., Wang, Q., Zhang, P., Sharpe, A. H., Binder, M. et al. (1997). Embryonic lethality and impairment of haematopoiesis in mice heterozygous for an AML1-ETO fusion gene. *Nat.Genet.*, *15*, 303-306.

Yuan, Y., Zhou, L., Miyamoto, T., Iwasaki, H., Harakawa, N., Hetherington, C. J. et al. (2001). AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, *98*, 10398-10403.

Zhang, D. E., Hetherington, C. J., Chen, H. M., & Tenen, D. G. (1994a). The macrophage transcription factor PU.1 directs tissue-specific expression of the macrophage colony-stimulating factor receptor. *Mol.Cell Biol.*, *14*, 373-381.

Zhang, D. E., Hetherington, C. J., Chen, H. M., & Tenen, D. G. (1994b). The macrophage transcription factor PU.1 directs tissue-specific expression of the macrophage colony-stimulating factor receptor. *Mol.Cell Biol.*, *14*, 373-381.

Zhang, D. E., Hohaus, S., Voso, M. T., Chen, H. M., Smith, L. T., Hetherington, C. J. et al. (1996). Function of PU.1 (Spi-1), C/EBP, and AML1 in early myelopoiesis: regulation of multiple myeloid CSF receptor promoters. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*, *211*, 137-147.

Zhang, P., Behre, G., Pan, J., Iwama, A., Wara-Aswapati, N., Radomska, H. S. et al. (1999). Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, *96*, 8705-8710.



## 7 Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
AE	AML1-ETO
AK	Antikörper
AML	akute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
Bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CBF	Core binding factor
CD	cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFU	Colony forming unit
del	Deletion
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat,
ETO	Eight-twenty-one

## 7 Abkürzungsverzeichnis

---

FAB French American British

FBS Fetale bovine serum

g Gramm

G6PD Glucose-6P-hosphat-Dehydrogenase

GST Glutathion-S-Transferase

HDAC Histon Deacetylase

i.v.t. in-vitro-translatiert

IL Interleukin

inv Inversion

IPTG Thiogalactopyranosid

JNK Jun N-terminal kinase

kDa Kilo-Dalton

LAR Luciferase Assay Reagent

LB lysogeny broth

LDH Lactatdehydrogenase

μ mikro

M-CSF Monozyten-Colony Stimulating Factor

## 7 Abkürzungsverzeichnis

---

mRNA messenger RNA

n nano

NE Zellkernlysat

NHR Nervy homology region

PBS Phosphatpuffer

PCR Polymerase Ketten Reaktion

PML Promyelozyten-Leukämie-Gen

RAR Retinsäurerezeptor

RHD Runt Domäne

RNA Ribonukleinsäure

RNasin Ribonukleaseinhibitor

Rpm Rounds-per-minute

RPMI Roswell Park Memorial Institute Nährmedium

RT Reverse Transkription

SDS Natriumdodecylsulfat

t time

t( ) Translokation

TB Trisborat

TBS Tris-buffered saline

TE Tris EDTA

## 7 Abkürzungsverzeichnis

---

TPA	Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	Trichostatin A
U	Units
V	Volt
WHO	World Health Organisation
WT	Wildtyp
ZnSO <sub>4</sub>	Zink(II)-sulfat

## 8 Danksagungen

Herrn Prof. Dr. med. W. Hiddemann darf ich besonders für die Überlassung des interessanten Themas und die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit danken.

Ein herzliches Dankeschön an Herrn PD Dr. med. Gerhard Behre für die Möglichkeit, in einem internationalen Team junger Wissenschaftler zu lernen und zu arbeiten, und seine nie endende Energie, mit der er uns angetrieben hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt an dieser Stelle Rajani K. Vangala mit dem zusammen ich dieses hochinteressante Thema so intensiv bearbeiten durfte und der mir immer mit großem Engagement zur Seite stand.

Herzlichen Dank auch an alle anderen Mitglieder der Arbeitsgruppe, die jederzeit gerne für technische Fragen und wissenschaftliche Diskussion zur Verfügung standen. Besonderer Dank hier an Annika Elsässer, Janki Rangatia und Sandra Gordon, die mir eine große Hilfe in der technischen Umsetzung waren.

Dr. C. Schoch, Dr. S. Schnittger (Labor für Leukämiediagnostik) und Dr. K. Spiekermann (MPI Biochemie) danke ich sehr für die Überlassung der Patientenproben.

Prof. Dan Tenen und seinem Team, v.a. T. Lodie, L. Johanson und E. Duprez, darf ich für eine sehr intensive Zeit in den Labors des Harvard Institute of Medicine danken, die unendlich viel Inspiration für meine weitere wissenschaftliche Arbeit erbrachte.

Ganz besonders lieben Dank an Michael Franzen für seine Anregungen und die lebhafteste Diskussion während der Erstellung des Manuskriptes; ein besonderes Dankeschön hier auch an Dusan Prevalsek und Annika Elsässer. Außerdem an Caro Dorp für die Hilfe bei den graphischen Darstellungen.

Ein großes Dankeschön meinen Eltern, die mich während meines ganzen Studiums und Berufsweges mit Liebe und Fürsorge unterstützt haben.

Nicht zuletzt möchte ich meinem lieben Mann Thomas für seine große Unterstützung, unendliche Geduld und Liebe während aller Phasen dieser Promotion von Herzen danken.

## 9 Lebenslauf

### PERSÖNLICHES

#### *Marion Susanne Heiß-Neumann*

Geb. am 11. September 1973 in Straubing als Tochter von Johann und Hildegard Heiß

Verheiratet mit Dipl.Ing. Thomas Neumann

2 Kinder: Paul Philip, geb. 24.02.2001

Felix Elias, geb. 11.11.2006

### SCHULE UND BERUFSAUSBILDUNG

1980 – 1984	Grundschule in Vilsbiburg und Roßbach/Ndby.
1984 – 1993	Karl-von-Closen Gymnasium, Eggenfelden
1993 – 1995	Ausbildung zur Arzthelferin, Dr. Karin Jousen, Praxis für HNO, Phoniatrie und Pädaudiologie, München

### STUDIUM

1996 – 2003	<u>Studium der Humanmedizin, LMU München</u>
05/99	Beginn der Mitarbeit in KKG Leukämie, Med III/Hämatol., Labor Dr. Behre
03-04/00	2-monatiger Studienaufenthalt in Boston/USA Havard Institute of Medicine, Labor Prof. D. Tenen und Beth Israel Medical Center, Dept. of Hematology
04/02 – 03/03	<i>Praktisches Jahr</i> Medizinische Klinik II, LMU, Großhadern Chirurgische Klinik, LMU, Großhadern HNO-Klinik, LMU, Innenstadt
05/03	<i>III.Staatsexamen</i> Abschluss des Studiums mit Gesamtnote GUT

### BERUF

Seit 01/04	Assistenzärztin/Weiterbildung Innere Medizin, Internistische Klinik Dr. Müller, München-Thalkirchen
09/06 – 12/07	Mutterschutz und Elternzeit
seit 01/08	Fortsetzung der Facharztausbildung, Klinik Dr. Müller

## 10 Erklärung nach §2

Ich erkläre, dass die an der Ludwig-Maximilians-Universität eingereichte  
Dissertation mit dem Titel

**Das Fusionsprotein AML1-ETO inhibiert die PU.1-abhängige Transkription  
und führt bei der akuten myeloischen Leukämie mit Translokation t(8;21)  
zum Differenzierungsblock**

in der Medizinischen Klinik und Poliklinik III . Großhadern unter Betreuung von

**Herrn Professor Dr. med. W. Hiddemann**

mit der Unterstützung durch

**Herrn Privatdozent Dr. med. G. Behre**

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei Abfassung der Dissertation keine  
anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Teile dieser Dissertation wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Vangala, R. K., Heiss-Neumann, M. S., Rangatia, J. S., Singh, S. M.,  
Schoch, C., Tenen, D. G. et al. (2003). **The myeloid master regulator  
transcription factor PU.1 is inactivated by AML1-ETO in t(8;21) myeloid  
leukemia.** *Blood*, 101, 270-277.

München, November 2007