

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
der Philipps-Universität Marburg
Abteilung für Hämatologie, Onkologie und Immunologie
Geschäftsführender Direktor:
Univ.-Professor Dr. med. Andreas Neubauer

siRNA basierter Screen zur Identifikation neuer Imatinib - Resistenzmechanismen bei chronischer myeloischer Leukämie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Philippe Johannes Kostrewa
aus Haan

Marburg, 9. Januar 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
17.07.2014

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Prof. Dr. A. Burchert

Korreferent: Prof. Dr. B. Schmeck

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Humanmedizin (Dr. med.)

Philippe Johannes Kostrewa

9. Januar 2014

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Die chronische myeloische Leukämie (CML)	3
1.2	Molekulargenetik der CML	4
1.3	Therapie	6
1.3.1	Tyrosinkinaseinhibitoren	6
1.3.2	Interferon-alpha	7
1.3.3	Stammzelltransplantation	7
1.4	Resistenzmechanismen unter Kinaseinhibitortherapie	7
1.5	shRNA Library Screen	9
1.6	Prinzip der RNA-Interferenz	10
1.6.1	si/shRNA RNAi	10
1.6.2	miRNA basierte RNAi	11
1.6.3	Off-target Effekte bei RNAi	11
1.7	Fragestellung	13
2	Material	15
2.1	Chemikalien, Enzyme	15
2.1.1	Chemikalien	15
2.1.2	Enzyme	16
2.2	Zellkulturmedien und Antibiotika	16
2.3	Geräte, Software	16
2.3.1	Geräte	16
2.3.2	Software	17
2.4	Zelllinien	17
2.5	Mikroorganismen	18
2.6	Puffer und Lösungen	18
2.7	Antikörper	19
2.8	Kits	19
2.9	Oligonukleotide	19
2.10	Vektoren	19
2.11	Sonstiges	19
3	Methoden	23
3.1	Molekularbiologische Methoden	23
3.1.1	Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA und Plasmidamplifikation	23

3.1.2	Isolation der Plasmid-DNA aus Bakterien	24
3.1.3	Isolation genomischer DNA	24
3.1.4	Isolation von RNA	24
3.1.5	Sequenz-spezifische Hydrolyse von DNA (Restriktionsverdau)	25
3.1.6	cDNA-Synthese	26
3.1.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
3.1.8	TOPO2.1 TA Cloning®	27
3.1.9	pRS-Vektorsystem und Herstellung von shRNA-Vektoren	28
3.2	Zellbiologische Methoden	30
3.2.1	Zellkultur und IM Behandlung	30
3.2.2	Transfektion von Plasmid-DNA in humane Zellen mittels <i>AMAXA™</i>	30
3.3	Durchflusszytometrie (FACS)	31
3.3.1	Messung der Transfektionseffizienz mittels GFP-FACS	31
3.3.2	Messung der Zellviabilität mittels FACS	31
3.3.3	pCrkL-Färbung	31
4	Ergebnisse	32
4.1	Vorarbeiten zum Screen	32
4.1.1	Erstellung von Dosis-Testkurven	32
4.1.2	Transfektion der Zelllinie und Überprüfung der Effizienz	32
4.2	Durchführung des shRNA-Screens	33
4.3	Charakterisierung Imatinib-resistenter Klone	34
4.3.1	Rückgewinnung und Bestimmung der shRNA-Sequenz	34
4.3.2	Erstellung von Wachstumskurven im Vergleich zu Kontrollen	35
4.3.3	Hemmung von p-CrkL als indirekter Marker der BCR-ABL Funktion	35
4.4	Validierung der Sequenzen für TRERF1 durch Retransfektion der wt-Zellen mit neuen Vektoren	37
5	Diskussion	39
5.1	Transduktionswege der shRNA-Library in K562 Zielzellen	39
5.2	TRERF-1 Verlust als möglicher Resistenzmechanismus bei CML	40
5.3	EZH1 Verlust als möglicher Resistenzmechanismus bei CML	40
5.4	BCL-2 like 11 (BCL2L11) Verlust - ein bekannter Resistenzmechanismus bei CML	42
5.5	Seizure-Related 6 Homolog (Mouse)-Like 2 (SEZ6L2) - ein neues Target bei CML?	42
5.6	Bewertung der Ergebnisse in Hinblick auf mögliche „off-target“ Effekte	43
6	Zusammenfassung	44
7	Liste akademischer Lehrer	61
8	Danksagungen	62

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Die chronische myeloische Leukämie (CML)

Die chronische myeloische Leukämie (CML) zählt zu den myeloproliferativen Erkrankungen. Sie wurde durch John Hughes Bennett, Robert Virchow und David Craigie unabhängig von einander 1845 erstmalig beschrieben.^{6,21,104} Sie hat einen Anteil von 15 - 20% an allen Leukämien des Erwachsenenalters mit einer Inzidenz von 1 - 2 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern pro Jahr. Der Anteil männlicher Patienten ist leicht erhöht. Das mediane Erkrankungsalter ist in Studienkollektiven 50 Jahre. Tatsächlich liegt es etwa 10 Jahre darüber. Der einzig bekannte Risikofaktor ist ionisierende Strahlung.^{26,70} Die kausale genetische Aberration ist die Translokation $t(9;22)(q34;q11)$, bei der es zur Fusion von Anteilen des „break point cluster region“ Gens (*BCR*) auf Chromosom 9 mit Sequenzen des „abelson tyrosinkinase gen“ (*ABL*) auf Chromosom 22 kommt.^{73,85} Der zytogenetische Nachweis des hierdurch entstehenden und nach dem Entdeckungsort benannten Philadelphia-Chromosoms (Ph^+) oder des *BCR-ABL* Transskripts ist für die Diagnosestellung einer CML notwendig.

Der spontane klinische Verlauf der CML ohne Behandlung ist durch den Progress von einer indolenten chronischen Phase (CP), über eine akzelerierte Phase (AP), in die Blastenkrise (BC, „blast crisis“) gekennzeichnet (vergl. Tabelle 1.1). Die Übergänge zwischen den einzelnen Phasen sind fließend. Bei Erstdiagnose sind 85% aller Patienten im Stadium der CP. Sie zeigen kaum spezifische klinische Symptome und fallen bei Routineuntersuchungen oder im Rahmen akuter Erkrankungen auf. Die Symptome sind Splenomegalie, Hepatomegalie, Abgeschlagenheit und Gewichtsverlust.⁸⁷ Im peripheren Blut findet sich eine Leuko- und Thrombozytose. Im Differentialblutbild zeigt sich eine Granulozytose mit Linksverschiebung, bestehend hauptsächlich aus segmentkernigen Granulozyten und Myelozyten. Die Granulozyten sind morphologisch normal, weisen jedoch zytochemische Veränderungen auf. Bei 90% der Patienten ist eine absolute Baso-

und Eosinophilie nachweisbar. Im Knochenmark erkennt man eine granulozytäre Hyperplasie. Paratrabekulär zeigt sich ein verbreitertes Gebiet mit unreifen Neutrophilen. Intertrabekulär ist eine Zone reifer Neutrophiler nachweisbar. Die Erythropoesenester sind in Zahl und Größe vermindert. Die Megakaryozyten haben hypolobulierte Kerne, kleiner als normal, sind jedoch keine Mikromegakaryozyten. Vereinzelt können Pseudo-Gaucher Zellen und meerblaue Histiocyten auftreten. Wenige Patienten werden in der BC diagnostiziert. Sie entspricht in diesem Fall dem Bild einer akuten Leukämie mit lymphatischer oder myeloischer Differenzierung.²⁶

Tabelle 1.1: **Stadien der CML nach WHO Definition**¹⁰³

	CP	AP	BC
Blasten	<10%	10-19% im PB o. KM	≥ 20% im PB o. KM
Basophile	Basophilie	≥20% im PB	
Thrombozyten	normal bis leicht erhöht	<100.000, >1.000.000	
	BCR-ABL1 pos.	Splenomegalie, Leukozytose, zytogenetische Evolution	Extramedullärer Befall, Nester im Knochenmark

Peripheres Blut (PB), Knochenmark (KM)

1.2 Molekulargenetik der CML

Das Ph-Chromosom ist die rekurrente, kausale chromosomale Aberration der CML. Sie wurde erstmals im Jahre 1960 bei CML Patienten beschrieben.⁷³ Janet Rowley zeigte 1973, dass es auf dem Philadelphia-Chromosom nicht nur zur Deletion des langen Arms des Chromosoms 22, sondern auch zu einer reziproken Translokation zwischen Chromosom 9 und Chromosom 22 kommt.⁸⁵ Durch die Translokation $t(9;22)(q34;q11)$ entsteht das Fusionsgen *BCR-ABL*, welches für das Fusionsprotein BCR-ABL kodiert⁵ (vgl. Abb. 1.1). Durch die Fusion der beiden Genabschnitte kommt es zur Entstehung einer konstitutiv aktivierten Tyrosinkinase mit transformierenden Eigenschaften⁶³ und zur Beeinflussung von proliferationsfördernden und antiapoptotischen Signalwegen (vgl. Abb. 1.2).

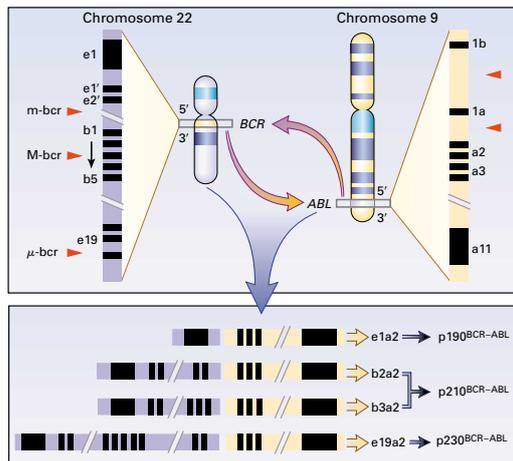


Abbildung 1.1: In Abhängigkeit vom Bruchpunkt und Spleißvariante entstehen drei unterschiedlich schwere Formen von BCR-ABL: p185 BCR-ABL, p210 BCR-ABL und p230 BCR-ABL.⁸³ Liegt der Bruchpunkt in Exon 13 oder 14 (Exon b2 oder b3) in *BCR*, so entsteht bei Fusion mit Exon a2 auf *ABL1* ein Fusionsgen (e13a2, e14a2 bzw. b2a2, b3a2) für ein 210 kD Protein, p210 BCR-ABL1. Weniger häufig ist e19a2 mit einem 230 kD Produkt (p230 BCR-ABL1). Das p190 BCR-ABL1 entsteht bei der Translokation von Exon 1 und a2.²⁶ Abbildung aus Faderl et al. 1999.

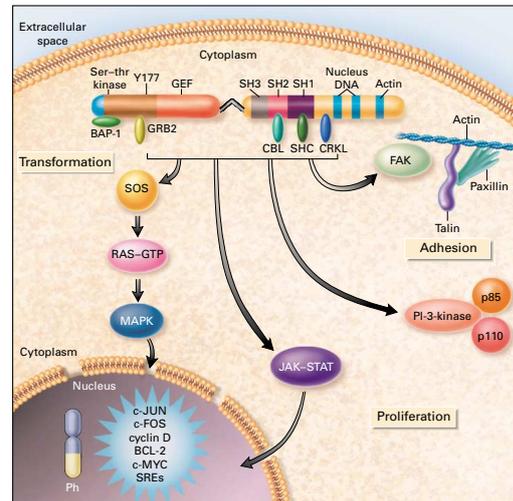


Abbildung 1.2: Durch seine konstitutiv aktive Tyrosinkinase beeinflusst BCR-ABL proliferationsfördernde und antiapoptotische Signalwege (RAS, PI3K, JAK2/STAT5).^{20,47} Die RAS Aktivierung erfolgt über einen GRB2 („Growth factor receptor-bound protein 2“)- oder SHC Adapter.^{20,34,77,80,88,95} Die Aktivierung von JAK/STAT5 erfolgt mit Hilfe der „Src homology (SH)2“ Domäne und die Prolin-reiche Bindungsstelle der SH3 Domäne. JAK/STAT5 ist Teil der Transformation.⁷² PI3K wird durch BCR-ABL über die Rekrutierung von GRB2 und GAB2 an das autophosphorylierte Y177 von BCR aktiviert.⁸⁶ Die Apoptose wird im Signalweg oberhalb des mitochondrialen Cytochrom-c und der Caspaseaktivierung gehemmt.¹ Abbildung aus Faderl et al. 1999.

1.3 Therapie

1.3.1 Tyrosinkinaseinhibitoren

1996 beschrieben Druker et al. einen Tyrosinkinaseinhibitor (TKI), der selektiv die Kinasaktivität von ABL durch Anlagerung in der ATP-Bindungstasche hemmt ohne gesunde Zellen zu beeinträchtigen.²² In der IRIS-Studie wurde 2003 Imatinib Mesylat (IM) mit dem damaligen Standard (Interferon-alpha [IFNa] + Cytarabin) verglichen.⁷⁴ IM war deutlich effektiver als IFNa und mit weniger Nebenwirkungen assoziiert. Die Ergebnisse der IRIS-Studie führten dazu, dass IM zur Erstlinientherapie der CML in der CP wurde^{23,37,41} (Siehe Abb. 1.3).

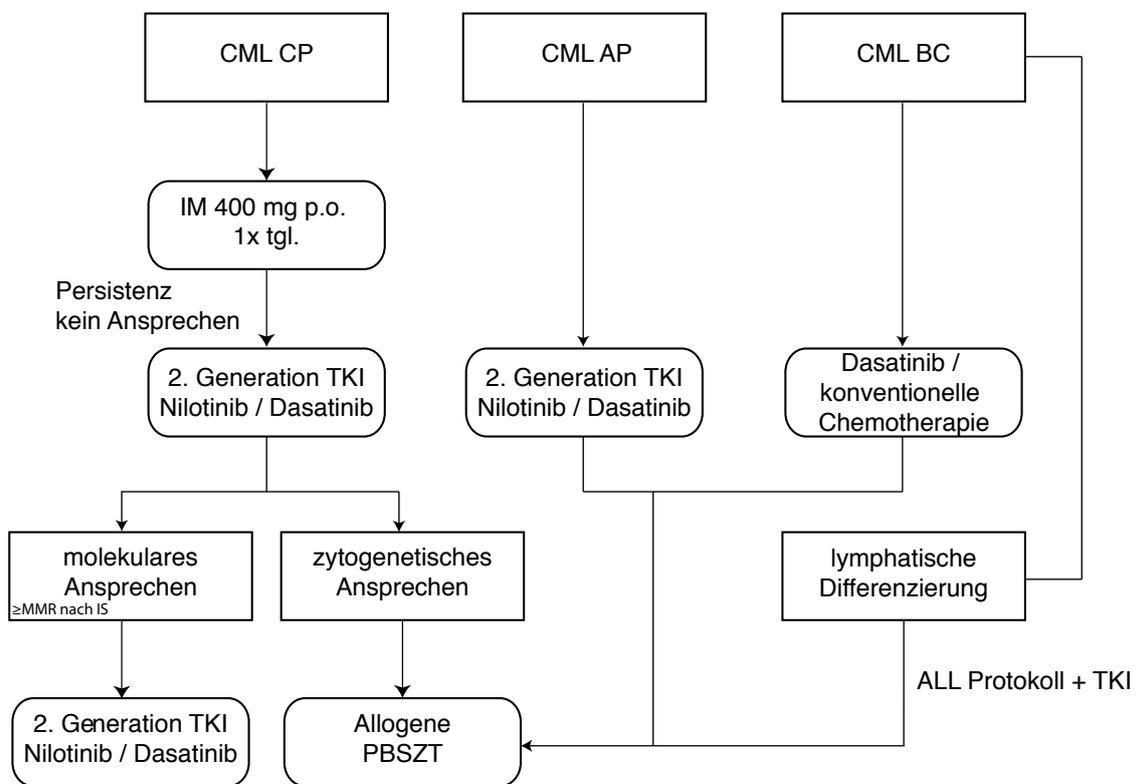


Abbildung 1.3: Therapie der CML nach Stadien. Patienten in der CP erhalten als Erstlinientherapie IM. Bei Persistenz oder fehlendem Ansprechen erfolgt die Umstellung auf einen Zweitgenerations-TKI. Zeigt sich hier ein molekulares Ansprechen (\geq Majorer molekularer Remission: BCR/ABL-Ratio nach IS $\leq 0,1\%$), so wird die Therapie bis zum Progress fortgeführt. Wird lediglich ein zytogenetisches Ansprechen erreicht, so ist eine PBSZT zu evaluieren. Patienten in AP erhalten einen Zweitgenerations-TKI. Die PBSZT wird dann ebenfalls nach molekularem oder zytogenetischem Ansprechen evaluiert.¹² Patienten in BC werden wie eine akute Leukämie entsprechend der Differenzierung (AML/ALL) therapiert und nach Erreichen einer Remission der PBSZT zugeführt.⁴⁰

1.3.2 Interferon-alpha

Seit 1981 war IFN α Therapiestandard für nicht transplantierbare Patienten. Dies änderte sich mit der Entwicklung von IM. Mit dieser Substanz wurde bei ca. 80% der Patienten ein hämatologisches Ansprechen erreicht. Bei ca. 13 - 27% zeigte sich eine komplette zytogenetische Remission.^{10,51,98} Das 10-Jahres Überleben lag bei 72 - 78%.^{10,51} Während die allogene Stammzelltransplantation der IFN α Therapie quoad vitam in den ersten 18 Monaten unterlegen ist, überleben nach 56 Monaten mehr Patienten in der Transplantationsgruppe die CML-Erkrankung.^{28,39} Das Gesamtüberleben ist in der Transplantationsgruppe im Median mit 5,5 Jahren signifikant höher als in der IFN α -Gruppe. IFN α induziert auf vielfältige Weise antileukämische Effekte. Es fördert die Reifung von Monozyten zu antigenpräsentierenden Zellen (APCs), führt zu T-Zell-Aktivierung und verhindert die Apoptose aktivierter T-Zellen.¹⁴ Weiterhin konnte gezeigt werden, dass IFN α leukämiespezifische T-Zellen induziert, die z.B. gegen das leukämieassoziierte Antigen Proteinase 3 (PR3) bei HLA-A0201 positiven Patienten gerichtet sind.^{25,49,69} Somit wirkt IFN α mechanistisch anders als Tyrosinkinaseinhibitoren wie IM, was erklären könnte, weshalb ein Absetzen von IFN α bei persistierender Resterkrankung möglich ist, unter IM allerdings regelhaft zu einem Rezidiv der Erkrankung führt.^{13,25,49,79}

1.3.3 Stammzelltransplantation

Die allogene Stammzelltransplantation gilt nach Lehrbuchmeinung weiterhin als die einzige kurative Therapiemaßnahme der CML. Aufgrund der erhöhten transplantationsassoziierten Mortalität (TRM) und der guten Wirksamkeit von IM ist sie in der Praxis allerdings stark in den Hintergrund getreten. Die Indikation zur Stammzelltransplantation bei CML-Patienten besteht daher heute nur noch bei fortgeschrittener Krankheitsphase (auch TKI naive Patienten), Resistenz auf IM oder einen Zweitlinien-TKI, ggf. bei Patienten im Alter unter 20 Jahren und bei Behandlungswunsch des Patienten. Ziel ist es, vor Transplantation mindestens eine komplette zytogenetische Remission zu erreichen.¹²

1.4 Resistenzmechanismen unter Kinaseinhibitorthherapie

Resistenz gegenüber IM stellt ein klinisch relevantes Problem dar. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch nur teilweise bekannt. Nach Kriterien des „European Leukemia Network“ (ELN) liegt eine IM-Resistenz bei Nichterreichen von bestimmten Meilensteinen unter Therapie vor. Auch das Versagen einer Therapie nach Erreichen eines initialen Ansprechens gilt als Resistenz² (vgl. Tabelle 1.2). Man unterscheidet zwischen

primärer (initial refraktäre Erkrankung), sekundärer (Verlust eines erreichten hämatologischen oder zytogenetischen Ansprechens), BCR-ABL-abhängiger und unabhängiger Resistenz.^{81,82}

Tabelle 1.2: **Optimales, suboptimales Ansprechen und Resistenz auf IM nach Therapiedauer**

Therapiedauer	Erwünschtes Therapieziel	suboptimales Ansprechen	Resistenz
3 Monate	Komplette hämatologische Remission, minores zytogenetisches Ansprechen ($\text{Ph}^+ \leq 65\%$)	Kein zytogenetisches Ansprechen ($\text{Ph}^+ > 95\%$)	Keine komplette hämatologische Remission
6 Monate	Partielles zytogenetisches Ansprechen ($\text{Ph}^+ \leq 35\%$)	Kein partielles zytogenetisches Ansprechen ($\text{Ph}^+ > 35\%$)	Kein zytogenetisches Ansprechen ($\text{Ph}^+ > 95\%$)
12 Monate	Komplettes zytogenetisches Ansprechen ($\text{Ph}^+ 0\%$)	Partielles zytogenetisches Ansprechen ($\text{Ph}^+ 1-35\%$)	Kein partielles zytogenetisches Ansprechen ($\text{Ph}^+ > 35\%$)
18 Monate	Majore molekulare Remission (MMR)	keine majore molekulare Remission ($\text{BCR/ABL/control Ratio} > 0.1 \text{ IS}$)	Keine komplette zytogenetische Remission ($\text{Ph}^+ \geq 1\%$)
Jeder Zeit	Verlust einer majoren molekularen Remission BCR-ABL Mutation mit Sensitivität auf IM	Remissionsverlust (hämatologisch, zytogenetisch) BCR-ABL Mutation ohne Sensitivität auf IM zusätzliche Chromosomale Aberration in einem Ph^+ Klon	

Modifiziert nach Burchert et al. 2011.¹² IS: International Standard. Ph^+ : Philadelphia-Chromosom positive Metaphasen. Komplette hämatologische Remission: Leukozyten $< 10 \text{ G/l}$, Thrombozyten $< 450 \text{ G/l}$, keine Linksverschiebung im Differenzialblutbild, $< 5\%$ Basophilie, Normalisierung der Milzgröße. Komplettes zytogenetisches Ansprechen: $0\% \text{ Ph}^+$. Partielles zytogenetisches Ansprechen: $1-35\% \text{ Ph}^+$. Minores zytogenetisches Ansprechen: $36-65\% \text{ Ph}^+$. Minimales zytogenetisches Ansprechen: $66-95\% \text{ Ph}^+$. Kein zytogenetisches Ansprechen: $> 95\% \text{ Ph}^+$. Komplette molekulare Remission: kein Nachweis von BCR/ABL in einer Nested-PCR. Majore molekulare Remission: BCR/ABL-Ratio nach IS $\leq 0,1\%$.

Zu den BCR-ABL abhängigen Mechanismen gehören Punktmutationen in der BCR-ABL-Thyrosinkinasedomäne (TKD), Überexpression von *BCR-ABL*^{35,60,65} und die Expression von Transportproteinen in der Zellmembran.¹⁷

Im klinischen Alltag stellen Punktmutationen der BCR-ABL-TKD die am besten charakterisierte Ursache für Resistenz dar. IM blockiert die ATP-Bindungstasche der ABL-Kinasedomäne, indem es an diese in der inaktiven Konformation bindet.³⁵ Resistenz erzeugende Mutationen sind meist mit sterischen Veränderungen der ATP-Bindungstasche

verbunden. Bei der Mutation T315I z.B. kommt es zum Austausch von Threonin zu Isoleucin in der Nukleotidbindungsstelle von ABL, welches sonst eine Wasserstoffbrücke mit IM bildet. Dies führt zu einer sterischen Hemmung der IM Bindung durch den Isoleucinrest und damit zu einer kompletten IM Resistenz.^{50, 62, 91, 99, 100, 108, 109}

Bei BCR-ABL unabhängigen Mechanismen erlangt die Zelle eine Resistenz gegenüber IM, obwohl die Kinaseaktivität von BCR-ABL durch IM adäquat gehemmt ist. Hierzu zählt die Aktivierung alternativer Signalwege. Zum Beispiel zeigte Wang et al. *in vivo* und *in vitro*, dass eine Autostimulation mit GM-CSF zu einer BCR-ABL unabhängigen Aktivierung des JAK2-STAT5 Signalweges führt und Resistenz induziert.¹⁰⁷

Eine Sonderform von IM-Resistenz ist die Persistenz von Ph⁺ Stammzellen.⁵³ Es konnte gezeigt werden, dass CD34⁺ Zellen eine „intrinsische Resistenz“ gegenüber IM^{18, 36, 42} und neuen TKI aufweisen.⁵⁴ Es werden unterschiedliche Mechanismen als Ursache für die CML-Persistenz angenommen. Hierzu gehören anfangs BCR-ABL-TKD Mutationen, BCR-ABL Überexpression und TKI Influx/Efflux Phänomene. Seit einigen Jahren besteht allerdings eine wachsende Evidenz, dass die Persistenzmechanismen der CML BCR-ABL unabhängig ist.^{19, 57}

1.5 shRNA Library Screen

Zur Untersuchung komplexer Resistenzphänomene beschrieben Brummelkamp et al. 2002 ein System zur stabilen Expression von „short interfering RNAs“ (siRNAs) in Säugerzellen.¹¹

Sie hatten die pSUPER Expressionskassette in einen selbst inaktivierenden pMSCV-puro Vektor kloniert. Der sogenannte pRETRO-SUPER Vektor (pRS) fand dann in der von Berns et al. vorgestellten *NKI-Library* Verwendung.⁸ In den beschriebenen Vektor wurden sh-Inserts („short hairpin inserts“) für 7914 verschiedene humane Gene kloniert, sodass bei je drei verschiedenen sh-Sequenzen pro Gen 23742 unterschiedliche Konstrukte generiert wurden. Nach Literaturangaben besitzen 30% der Vektoren in der Library eine „knock-down“ Effizienz von 70%. 70% der Library enthalten mindestens eine shRNA mit mehr als 70% Knock-down-Effizienz.⁷ Die Funktionalität des System wurde anhand eines Versuchs zur Resistenz gegenüber Trastuzumab gezeigt.^{8, 9}

Die Library kann entweder mittels retroviraler Infektion oder einfacher Transfektion in eine Ziellinie eingebracht werden. Allerdings ist für die virale Infektion die Expression des murinen ecotropen Rezeptors (EcoR) auf den Zellen erforderlich. Die transfizierten Zellen werden nach Selektion dem eigentlichen Screeningversuch unterzogen. Die überlebenden Zellen werden danach auf Expression des Vektors hin untersucht. Hierzu wird genomische DNA aus den Klonen extrahiert, mittels PCR das sh-Insert des Vektors ampli-

fiziert und in einen neuen Vektor rekloniert. Der Lokus des Inserts wird dann sequenziert um das sh-Insert zu bestimmen. Alternativ kann auch ein sogenannter „barcode-screen“ durchgeführt werden. Hierbei werden die sh-Sequenzen mittels Microarray identifiziert.

1.6 Prinzip der RNA-Interferenz

RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet einen hoch konservierten Mechanismus zur Translationsregulation bei Pro- und Eukaryonten. Er wurde von Fire et al. 1998 erstmals in *C. Elegans* beschrieben.²⁷ Dabei wird ein einzelsträngiges RNA Molekül an einen Proteinkomplex gebunden, welcher dann an eine durch die gebundene RNA definierte Stelle in einer mRNA bindet. Diese wird dann verdaut (vgl. Abb. 1.4). Mittlerweile sind viele verschiedene Wege in verschiedenen Organismen für RNAi beschrieben (piRNA, miRNA, etc.). Im Weiteren wird zunächst auf den für das Experiment relevanten Mechanismus der siRNA und shRNA eingegangen. Der Mechanismus der miRNA, welcher in großen Teilen ähnlich dem der siRNA ist, wird aufgrund seiner Bedeutung für „off-target“ Effekte am Ende des Abschnitts kurz beschrieben.

1.6.1 si/shRNA RNAi

SiRNAs oder shRNAs lassen sich auf unterschiedlichen Wegen in eine Zielzelle einbringen. Sie können per Transfektion, Elektroporation oder als retroviraler Vektor in die Zelle gelangen. Gemeinsames Kennzeichen ist, dass es sich um doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA) handelt. shRNAs besitzen im Gegensatz zu siRNAs eine Haarnadelstruktur. Die transduzierten oder durch virale Infektion eingebrachten Vektoren transkribieren in den Zellkern. Dort kommt es zur Expression und Transkription der entsprechenden RNA-Sequenz (vgl. Abb. 1.4). Zunächst entsteht hierbei eine sogenannte pri-shRNA. Diese wird von DROSHA zu pre-shRNA umgewandelt. Über das Kernmembranprotein Exportin-5 erfolgt dann der Transfer in das Zytosol. Hier findet dann der Verdau durch DICER und die weitere Umwandlung in eine funktionelle siRNA statt.⁹⁴ siRNAs werden von DICER, einem Protein der RNaseIII-Familie, erkannt und zu 21 oder 22 Basen langen dsRNA Fragmenten mit 3'-Überhängen von zwei Basenpaaren an jedem Strang verdaut.⁴³ DICER besitzt unter anderem eine PAZ-Domäne (Die Proteine PIWI, ARGONAUT und ZWILLE weisen diesbezüglich eine Homologie auf). Diese bindet an das 3'-Ende der dsRNA. Mit Hilfe seiner RNaseIII-Domänen schneidet DICER die gebundene RNA nach 25 Nukleotiden (nt).⁶⁴ Das Produkt weist jeweils am 5'-Ende eine Phosphat- und am 3'-Ende einen 2nt Überhang mit einer Hydroxylgruppe auf. Die dsRNA zusammen mit DICER, TRBP (HIV-1 transactivation responsive element (TRA) RNA-binding protein) und einem Protein der Argonaut Familie bilden den „RISC loading complex“

(RLC). Um eine Beladung der Argonautproteine mit verdauter unspezifischer RNA zu vermeiden, werden nur RNAs mit einem 2nt 3'-Überhang und Hydroxylgruppe von der PAZ-Domäne des Argonautproteins gebunden. Für die Degradation von mRNA in der Bindung mit AGO ist die Phosphatgruppe am 5'-Ende ein notwendiges Erkennungsmerkmal der richtigen RNA.⁷⁸ Ist der Transfer erfolgreich, so wird der so genannte „passenger strand“ vom Leitstrang, oder auch „guide strand“ getrennt. Dieser weist am 5'-Ende eine geringere thermodynamische Stabilität des Doppelstranges auf und wird bevorzugt geladen.^{52,90} Danach bindet der Protein-RNA-Komplex an eine durch die Sequenz des Leitstranges vorgegebene Stelle in einer mRNA. Diese wird durch den RISC degradiert und ins Zytosol freigegeben. Der RISC kann dann erneut eine mRNA binden.

1.6.2 miRNA basierte RNAi

miRNAs sind, ebenso wie sh/siRNAs, nicht kodierende RNA-Moleküle mit einer Länge von ca. 22 Basenpaaren und sind an der posttranskriptionellen Genregulation durch Bindung an eine komplementäre Sequenz im 3'-UTR („untranslated region“) beteiligt. Sie wurden bei *C. Elegans* im Rahmen der Regulation postembryonaler Proteine erstmals beschrieben.⁶¹

Im Zellkern werden sie als mehrere Kilobasen große pri-miRNAs durch Polymerase II generiert. Posttranskriptionell erfolgt die Umwandlung in 70 Basen lange „loop-stem“ Vorläufer durch DROSHA zusammen mit DGCR8 (Pasha bei Wirbellosen) und Transport aus dem Zellkern durch Exportin-5. Anschließend werden sie vom DICER-TRBP-Komplex zu einem dsRNA Strang verarbeitet. Die Bildung des RISC erfolgt analog zur si/shRNA.⁹⁴

Der größte Unterschied zur siRNA ist das Bindungsverhalten und ihre Spezifität hinsichtlich der Zielsequenz. Die Bindung an die mRNA erfolgt nicht an eine völlig komplementäre Sequenz. Es ist lediglich die sogenannte „seed region“ am 5'-Ende der miRNA vollständig komplementär.^{46,94} Das Bindungsverhalten wie bei einer miRNA kann bei siRNAs als Ursache für einen „off-target“ Effekt auftreten. Nach Bindung des miRNA/RISC Komplexes kommt es entweder zum Abbau der mRNA oder zur Suppression der Translation.

1.6.3 Off-target Effekte bei RNAi

Die „off-target“ Effekte lassen sich in (sequenz-)spezifische und unspezifische Effekte einteilen.

Spezifische „off-target“ Effekte sind siRNA induzierte sequenzabhängige Interaktionen bei teilweise komplementären Sequenzen am 3'-UTR des Transkripts und werden

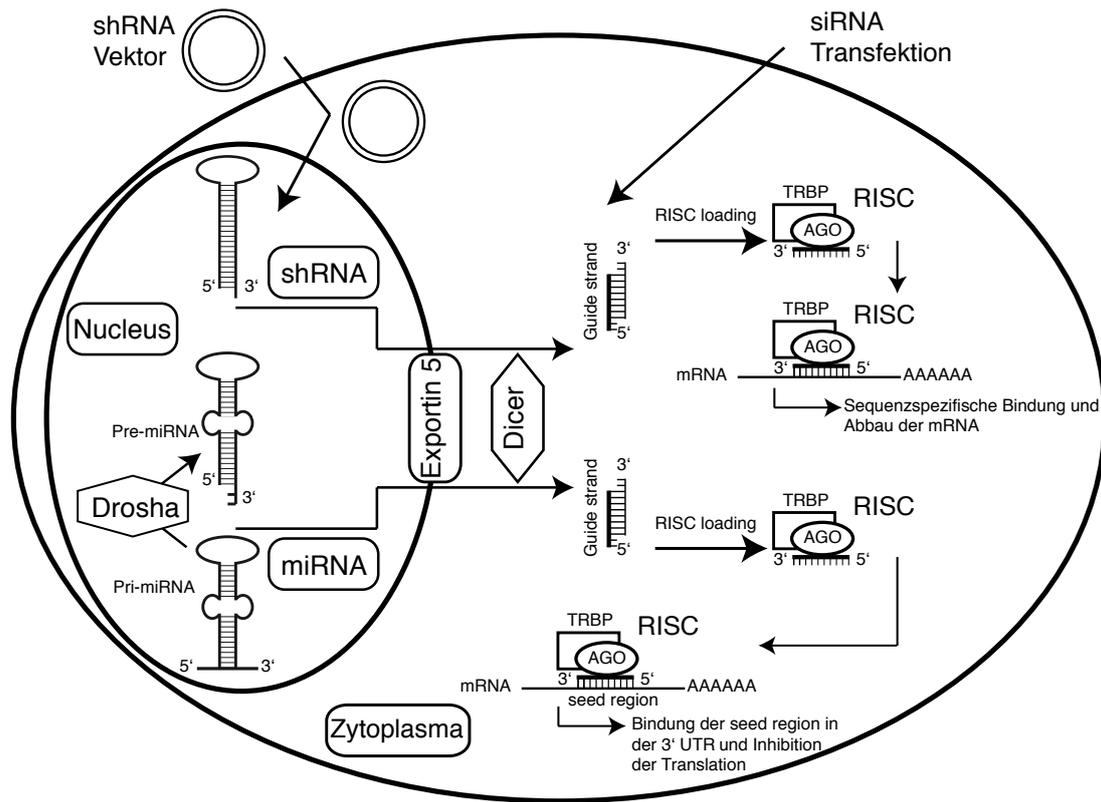


Abbildung 1.4: Mechanismus der RNA-Interferenz, adaptiert nach Singh et al. 2011⁹⁴

von mehreren Autoren als „miRNA like off-target effects“ bezeichnet.⁴⁵ Hierbei sind Regionen des 3'-UTR einer mRNA komplementär zur „seed region“ (Position 2-7 oder 2-8)^{93,94} der siRNA am 5'-Ende des „guide strand“. Dies tritt sowohl bei siRNA als auch bei shRNA Experimenten auf.⁹³ Das Phänomen ist tatsächlich für den Phänotyp des Experimentes relevant^{45,46} und als Problematik in Zusammenhang mit RNAi Screens beschrieben. Hierbei waren die „Top-Hits“ nicht durch einen spezifischen RNAi Effekt, sondern eine miRNA-like Interaktion mit der 3'-UTR entstanden.⁹³ Off-target Effekte können auch durch den „passenger strand“ verursacht werden.⁹⁴

Unspezifische „off-target“ Effekte umfassen die Immunstimulation und Aktivierung der unspezifischen Abwehr *in vivo* und *in vitro* über z.B. Toll-like Rezeptoren (TLRs). Toxische Effekte durch das Einbringen fremder RNA zählt ebenfalls dazu. Diese sind bei siRNA jedoch stärker ist als bei shRNA. Gleiches gilt für den immunstimulatorischen Effekt. Die begrenzte Transportkapazität von Exportin-5 aus dem Nucleus und des RISC zählt ebenso zu den unspezifischen „off-target“ Effekten. Hier kann es zu einer Sättigung der Enzyme und Enzymkomplexe und somit zu einer veränderten Wirkung sowohl der exogen eingebrachten als auch der endogenen RNAi kommen, was am Ende zu einem

veränderten Phänotyp führt.^{93,94}

Vermeidung von „off-target“ Effekten

MiRNA ähnliche „off-target“ Effekte können durch mehrere Maßnahmen verringert werden. Zum Einen mittels chemischer Modifikation der RNA durch Anhängen einer 2'-O-Methylgruppe am „guide strand“ und in Position eins und zwei des „passenger strand“. Weiterhin kann man eine konzentrationsabhängige Abnahme des Effektes bei geringeren Konzentrationen der siRNA beobachten. Es ist möglich, mehrere unterschiedliche siRNAs gegen das gleiche Ziel in einer Konzentration kleiner zehn Nanomolar einzusetzen.^{15,46} Faktoren, welche die falsch negative Rate bei RNAi basierten Screens beeinflussen, sind die Halbwertszeit und die für die Funktion notwendige intrazelluläre Konzentration des zu inhibierenden Proteins und die funktionelle Redundanz des zugrunde liegenden Mechanismus.⁹³

Bestätigung eines tatsächlichen „on-target“ Effektes

Die einfachste Methode ohne den Mechanismus zu wechseln, ist der Versuch, mit einer oder besser mehreren siRNA für das gewählte Ziel den Phänotyp zu reproduzieren. Gelingt dies, kann man davon ausgehen, dass es sich nicht um ein falsch positives Ergebnis oder einen „off-target“ Effekt handelt.^{46,93}

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, ein Konstrukt für einen konditionellen „knock-down“ mit einem induzierbaren Vektor zu generieren. Sofern verfügbar, kann man das gefundene Ziel auch mit einem „small-molecule Inhibitor“ beeinflussen und so seinen Phänotyp überprüfen.⁹³ Alternativ ist ein Ansatz mit einem „rescue“ Experiment mit Reexpression des eigentlichen Gens möglich. Dies geschieht durch entweder durch Einbringen einer cDNA ohne 3'-UTR (zur Überprüfung des miRNA ähnlichen „off-target“ Effektes) oder durch die Expression eines nicht inhibierbaren Gens auf einem Vektor oder BAC („bacterial artificial chromosome“). Letzteres bietet im Gegensatz zur einfachen Expression über einen Vektor eine bessere Regulation der Transkription und vermeidet die Überexpression des eingebrachten Gens.^{46,93}

1.7 Fragestellung

Die Resistenz auf TKI in AP und BC ist ein klinisch relevantes aber mechanistisch nur zum Teil verstandenes Problem. Nur ca. 5-20% der Patienten in fortgeschrittenen Phasen können in diesem Stadium durch eine allogene Stammzelltransplantation geheilt werden.¹² Das Verständnis von Mechanismen der TKI-Resistenz ist von entscheidender

Bedeutung für die Entwicklung neuer Therapien. Daher wird im im Rahmen dieser Arbeit versucht durch einen shRNA-Library Screen neue Gene zu identifizieren, deren Verlust eine TKI-Resistenz vermitteln kann.

Kapitel 2

Material

2.1 Chemikalien, Enzyme

2.1.1 Chemikalien

1 kbp O'Gene Ruler Fermentas, Deutschland

6x Orange Loading Dye Solution Fermentas, Deutschland

Agar Roth, Karlsruhe

Agarose Roth, Karlsruhe

Ethanol 100% Merck, Darmstadt

Ethidiumbromid Roth, Karlsruhe

Hefeextrakt Roth, Karlsruhe

Imatinib NovartisPharma (Basel, Schweiz)

Isopropanol 100% Merck, Darmstadt

Natriumchlorid Roth, Karlsruhe

Nilotinib NovartisPharma (Basel, Schweiz)

Propidiumiodid Sigma, St. Louis, MO, USA

RNase Inhibitor Promega, Madison, Wisconsin, USA

Trypton Roth, Karlsruhe

2.1.2 Enzyme

BglIII Fermentas, Deutschland

DNase 1 Qiagen, Hilden

EcoRI Fermentas, Deutschland

HindIII Fermentas, Deutschland

Proteinase K Qiagen, Hilden

RNAse A Qiagen, Hilden

Scal Fermentas, Deutschland

T4 Ligase Invitrogen, Darmstadt

2.2 Zellkulturmedien und Antibiotika

Ampicillin Roth, Karlsruhe

FCS Gibco-BRL, Karlsruhe

Penicillin/Streptomycin Biochrom KG, Berlin

Puromycin Sigma-Aldrich, Steinheim

RMPI 1640 Gibco-BRL, Karlsruhe

2.3 Geräte, Software

2.3.1 Geräte

AMAXA Amaxa GmbH, Köln

Brutschrank B5060 Heraeus, Hanau

Brutschrank Kelvitron Heraeus, Hanau

danLAF VFB1806 Scanbur, Dänemark

Fluovert Inversionsmikroskop Leitz, Wetzlar

Gelelektrophoresekammer BioRad, München

Heizblock Thermostat plus Eppendorf AG, Hamburg

Innova 4000 Schüttler New Brunswick scientific, Enfield, CT, USA

LSRII Durchflusszytometer BD Bioscience, San Jose, CA, USA

Mastercycler epgradient s Eppendorf AG, Hamburg

Photometer GeneQuant II Pharmacia Biotech

Wasserbad E15 Haake

Willovert Zellkulturmikroskop Hundt, Wetzlar

Zentrifuge 5417 R Eppendorf AG, Hamburg

Zentrifuge 5810 R Eppendorf AG, Hamburg

Zentrifuge Typ 23 Heraeus, Hanau

2.3.2 Software

FACSDiva™ Version 6.1.3 für Microsoft Windows, BD Bioscience, Californien USA

FlowJo™ Version 8.7.1 für Apple Macintosh, Tree Star Inc., Oregon USA

GraphPadPrism Version 5 für Microsoft Windows, GraphPad Software Inc., Californien, USA

2.4 Zelllinien

K562 BCR-ABL positive Zellen von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig).

Morphologie: Runde große, einzelne Zellen in Suspension.

Kultur: Halten bei $0.1 - 0.5 \times 10^6$ Zellen/mL; Splitten 1:3 bis 1:5 alle drei Tage; aussähen mit ca. $0.3 - 0.5 \times 10^6$ Zellen/mL. Kultur in RPMI 1640 + 10% FCS, bei 37°C unter 5% CO₂. Verdopplungszeit 30-40 Stunden.

Oberflächeneigenschaften: CD3 -, CD13 (+), CD15 +, CD19 -, CD33 +, CD 71 +, CD 235a +.

Zytogenetik: Human hypotriploid karyotype without sharp mode - 61-68<3n>XX, -X, -3, +7, -13, -18, +3mar, del(9)(p11/13), der(14)t(14;?)(p11;?), der(17)t(17;?)(p11/13;?),

der(?18)t(15;?18)(q21;?q12), del(X)(p22) - two markers appear from FISH to have arisen from Ph.

Molekulargenetik: BCR-ABL1 (e14-a2)

MCF-7 Zelllinie eines Adenokarzinoms der Mamma, Positivkontrolle für TRERF1; Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig)

Jurkat Zelllinie aus einer T-Zell Leukämie; Positivkontrolle EZH1, Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig)

2.5 Mikroorganismen

E. Coli HB101 TaKaRa, Japan

E. Coli TOP10 Invitrogen, Darmstadt

Library Efficiency DH5 alpha Competent Cells Invitrogen, Darmstadt

2.6 Puffer und Lösungen

BD Pharmingen Stain Buffer BD Biosciences, Heidelberg

BD Phosflow Perm Buffer III BD Biosciences, Heidelberg

FIX Buffer I BD Biosciences, Heidelberg

LB-Agar: LB-Medium mit 15g Agar pro 1000mL

LB-Medium: 10g NaCl, 10g Trypton, 5g Hefeextrakt, 1000mL Wasser (pH 7,4)

LB-Amp-Agar oder Medium: LB-Medium/Agar mit 100µG/mL Ampicillin

PBS Gibco, Auckland, Neuseeland

S.O.C. Fertig-Medium: Hefeextrakt 0,5% (w/v) (5 g/L), Trypton 2% (w/v) (20 g/L), Natriumchlorid 10 mM (0.6 g/L), Kaliumchlorid 2.5 mM (0.2 g/L), Magnesiumchlorid 10 mM, Magnesiumsulfat 10 mM, Glucose 20 mM, Invitrogen, Darmstadt

T4 Ligase Puffer Invitrogen, Darmstadt

Tango 2x Puffer Fermentas, Deutschland

2.7 Antikörper

anti-phospho-CrkL (Y207) Cell Singaling Technologies, Beverly, MA, USA

FITC goat anti-rabbit Antikörper BD Biosciences, Heidelberg

2.8 Kits

Nucleofector V Kit Amaxa GmbH, Köln

QIA-Quick PCR Purification Kit Qiagen, Hilden

QIAamp DNA mini Kit Qiagen, Hilden

Qiagen Omniscript RT Kit Qiagen, Hilden

Qiagen Plasmid Maxi Kit Qiagen, Hilden

TOPO2.1 TA Cloning Invitrogen, Darmstadt

2.9 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide von MWG-Biotech, Ebersberg

2.10 Vektoren

pRS Library NKI Niederlande, Leihgabe AG Prof. M. Eilers, Julius-Maximilians-Universität Würzburg

pRS-scramble Leihgabe von AG Prof. M. Eilers, Julius-Maximilians-Universität Würzburg

pRS-ski-GFP Leihgabe AG Prof. A. Neubauer, Philipps-Universität Marburg

pSUPER.retro.puro Vektor OligoEngine Seattle, WA, USA

pCR™ 2.1 TOPO® Vector Invitrogen, Darmstadt

2.11 Sonstiges

Steriler Zellkulturbedarf Greiner Bio-One GmbH, Solingen

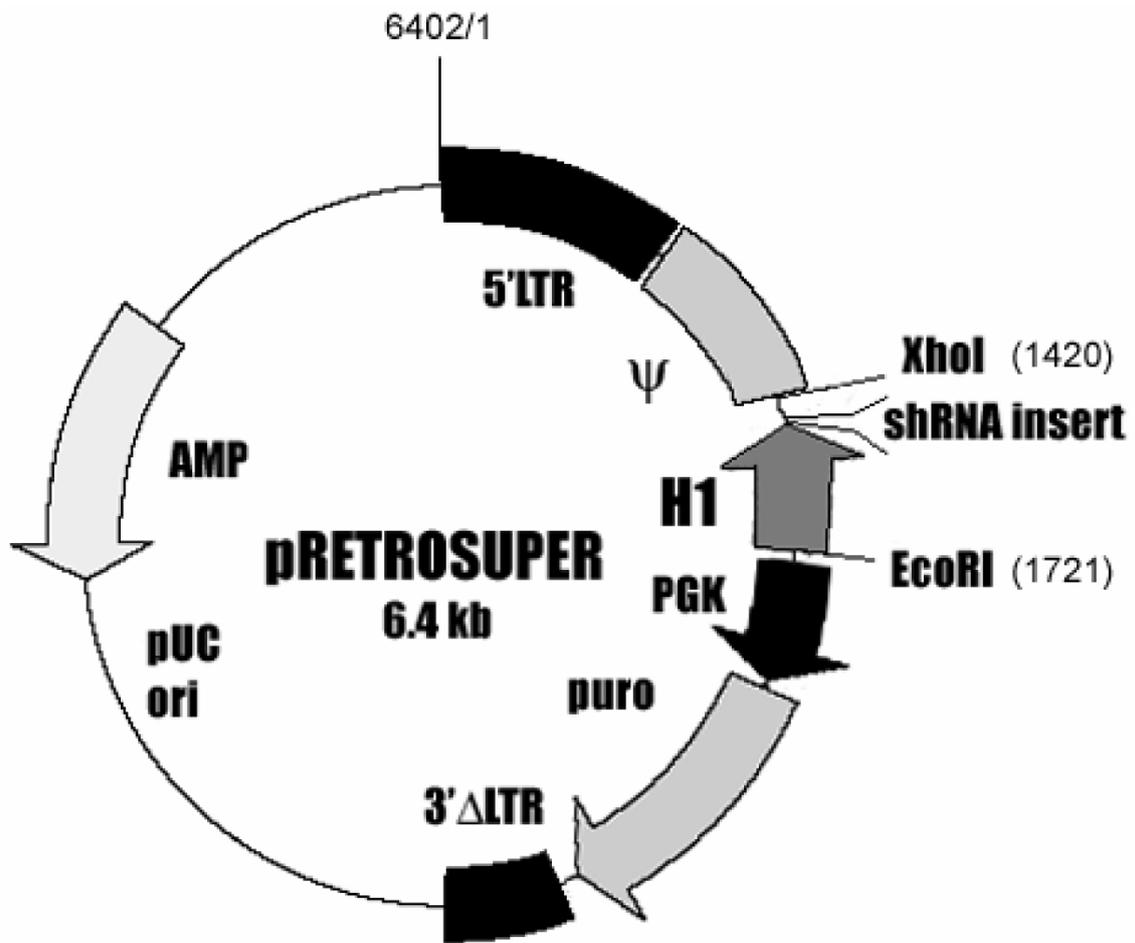


Abbildung 2.1: pRS Library Vektorkarte



pSUPER RNAi System™

VECTOR: pSUPER.retro.puro
CATALOG#: VEC-PRT-0001/0002

Length: 6349 bp

Key Sites

BglIII: 1447
HindIII: 1441
EcoRI: 1668
Sall: 1426
XhoI: 1420

Vector Features

PGK promoter: 1669-2177
Puro ORF: 2202-2801
H1 promoter: 1420-1668
Ampicillin resistance ORF: 4558-5415
3' delta LTR: 2931-3224
5' LTR: 1-515 (homologous to other MSCV LTR)

Sequencing primer 5'-GGAAGCCTTGGCTTTTG-3' binding site: 1241-1257

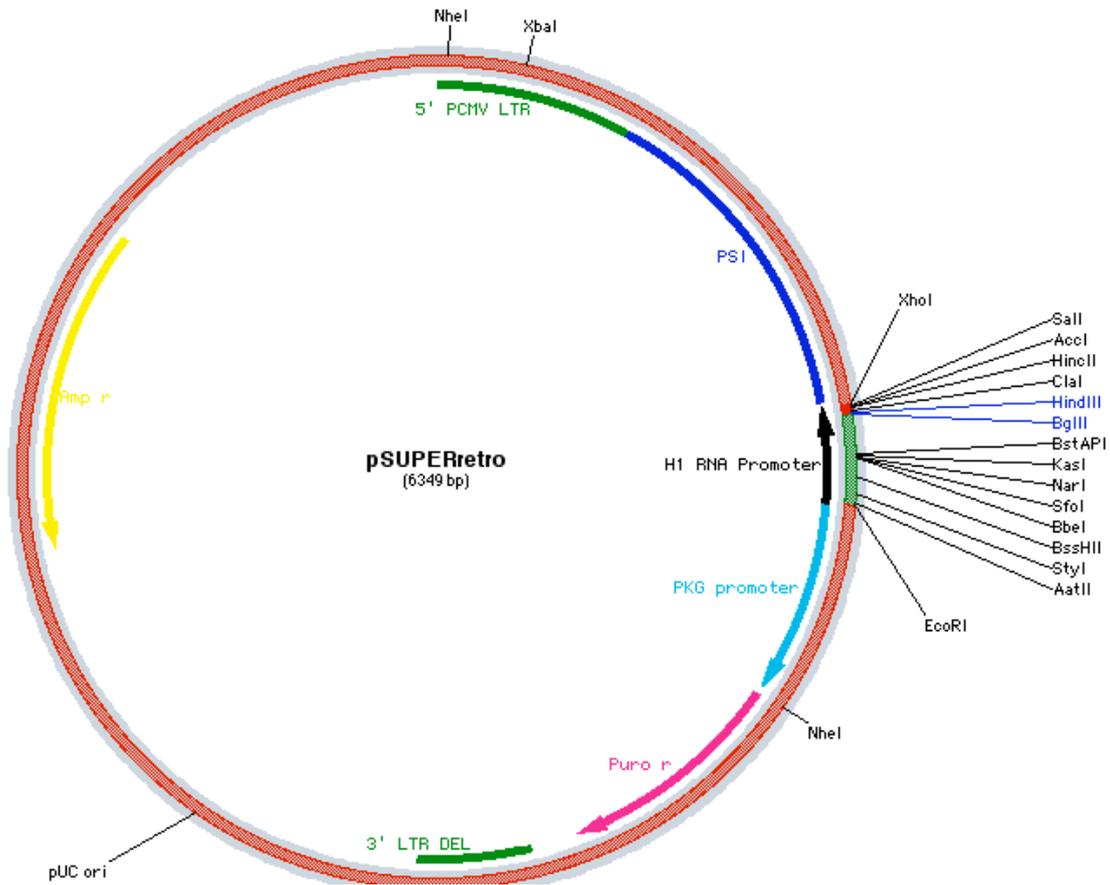
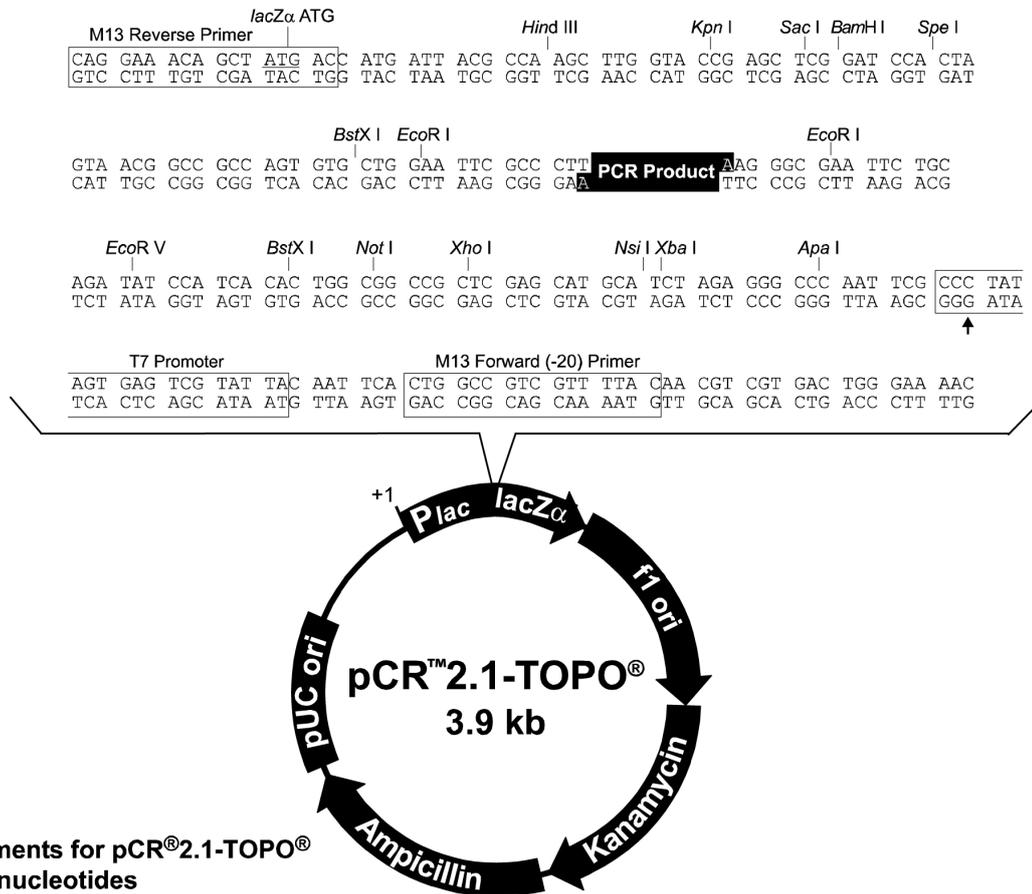


Abbildung 2.2: pSUPER.retro.puro Vektorkarte



Comments for pCR[®]2.1-TOPO[®]
3931 nucleotides

LacZα fragment: bases 1-547
 M13 reverse priming site: bases 205-221
 Multiple cloning site: bases 234-357
 T7 promoter/priming site: bases 364-383
 M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406
 f1 origin: bases 548-985
 Kanamycin resistance ORF: bases 1319-2113
 Ampicillin resistance ORF: bases 2131-2991
 pUC origin: bases 3136-3809

Abbildung 2.3: pCR[™]2.1 TOPO[®] Vektorkarte

Kapitel 3

Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA und Plasmidamplifikation

Zur Amplifikation der Library wurden *Library Efficiency*[®] *DH5 α* [™] *Competent Cells* von Invitrogen verwendet. Die Transformation erfolgte nach Herstellerprotokoll. Hierzu wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, 100 μ l der Suspension in vorgekühlte 1,5ml Eppendorf Cups aliquotiert, 100 ng DNA Lösung hinzugefügt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock über 45 Sekunden bei 42°C im Wasserbad, gefolgt von weiteren zwei Minuten Inkubation auf Eis. Nach Zugabe von 0,9ml S.O.C-Medium wurde der Kulturansatz eine Stunde bei 37°C bei 227 U/min. im Schüttler inkubiert. 100 μ l der Vorkultur wurden mit 500 μ l S.O.C-Medium auf einer 13,5cm LB-Amp-Platte aufgebracht und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Amplifikation der Plasmide pRS-ski-GFP und pRS-scramble erfolgte wie oben beschrieben. Nach Inkubation über Nacht wurden mit einer sterilen Pipettenspitze zwei bis drei gut abgrenzbare Kolonien gepickt und 200ml LB-Amp-Medium in 500ml Erlenmeierkolben damit beimpft. Die Kultur wurde über Nacht im Schüttler bei 37°C und 227 U/min. inkubiert.

Plasmide aus dem TOPO Cloning Versuch wurden über Nacht auf LB-Amp-Platten kultiviert. Die Kolonien wurden gepickt, erneut in 3ml LB-Amp-Medium über Nacht kultiviert und die genomische DNA extrahiert. Diese wurde mit Natriumacetat gefällt und mit Ethanol getrocknet.

3.1.2 Isolation der Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte mit *Qiagen Plasmid Maxi Kit* nach Herstellerprotokoll.

Für die Isolation der *NKI Library* Plasmide wurden die Kolonien auf den LB-Amp-Platten mit einem sterilen „cell-scraper“ gelöst und mit 10-15ml LB-Medium von der Platte gewaschen. Für die Isolation der Plasmide pRS-ski-GFP und pRS-scramble wurden die LB-Übernachtskulturen in 50ml Falcons aliquotiert. Die Bakteriensuspension wurde bei 6000 U/min. für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Um das Pellet zu lysieren wurde es mit 10ml Puffer P1 (enthält RNase A) resuspendiert, mit 10ml Puffer P2 gemischt, fünf Minuten bei RT inkubiert, 10ml Puffer P3 (4°C) zugegeben, geschüttelt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Die Lysate wurden durch Zentrifugation bei 20000 U/min. für 30 Minuten bei 4°C geklärt, der Überstand wurde erneut für 15 Minuten zentrifugiert. Zum Binden, Waschen und Eluieren der DNA wurde pro Ansatz (50ml Falcon) eine QIAGEN-Säule mit 10ml Puffer QBT beschickt. Der Überstand wurde zur Bindung der DNA auf die Silika-Säulen gegeben, mit Puffer QC gewaschen und mit Puffer QF eluiert. Das Eluat wurde aufgefangen, die DNA mit Isopropanol (100%) gefällt und bei 15000 U/min. für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und die DNA mit 5ml Ethanol 70% gewaschen, erneut zentrifugiert und das Pellet an der Luft getrocknet. Anschließend wurde es in 100 - 300µl doppelt destilliertem Wasser resuspendiert und bei -20°C gelagert.

3.1.3 Isolation genomischer DNA

Die Isolation von genomischer DNA aus Zellen erfolgte mit *QIAamp DNA mini kit™* nach Herstellerprotokoll.

Es wurden Zellen aus den Versuchsansätzen oder aus der Zellkultur entnommen, pelletiert, in 200µl PBS resuspendiert, in ein 1,5ml Eppendorf Cup überführt und mit je 20µl Proteinase K (Qiagen) über zehn Minuten im Heizblock bei 56°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 200µl Ethanol 100% zugegeben, die DNA auf einer Silikasäule gebunden und nach Waschen mit 500µl Puffer AW1 (Waschpuffer 1) und AW2 (Waschpuffer 2) in 150µl (100-200µl) doppelt destilliertem Wasser eluiert. Die gewonnene DNA wurde bei -20°C gelagert.

3.1.4 Isolation von RNA

Die Isolation von RNA erfolgte mit *Qiagen RNeasy® Micro Kit* nach Herstellerprotokoll.

Hierzu wurden ca. 2×10^6 Zellen aus Versuchsansätzen oder Zellkultur pelletiert, mit PBS gewaschen, pelletiert und mit 600µl Puffer RLT bei Raumtemperatur lysiert. Das

Lysat wurde auf einen Zell-Shredder (lila Säule) gegeben, zentrifugiert und danach der Shredder verworfen und 600 μ l Ethanol 70% zum Lysat gegeben. Die RNA wurde auf eine Silikasäule gebunden und mit Puffer einmal gewaschen. Um eine DNA freie RNA-Lösung zu erhalten, erfolgte ein Verdau mit DNase 1 (Qiagen). Hierzu wurden pro Ansatz 15 μ l DNase 1 Stammlösung mit 105 μ l Puffer RDD gemischt, 120 μ l auf jede Säule gegeben und im Wasserbad bei 30°C 15 Minuten inkubiert. Danach folgten zwei Waschschrte mit Puffer RW1 und RPE. Die RNA wurde mit zweimal 30 μ l RNase freiem Wasser eluiert. Die Konzentration der gewonnen RNA wurde photometrisch bestimmt und bei -80°C gelagert.

3.1.5 Sequenz-spezifische Hydrolyse von DNA (Restriktionsverdau)

Vor Transfektion der *NKI Library* und der Kontroll-Vektoren pRS-scramble wurden diese durch Restriktionsverdau mit Scal (Fermentas) linearisiert. Dies sollte eine bessere Integration in das Genom der Zielzellen (K562) ermöglichen. Scal schneidet DNA sequenzspezifisch an folgender Stelle:

AGT - ACT
TCA - TGA

Tabelle 3.1: Reaktionsansatz Restriktionsverdau von 300 μ g DNA

Komponente	Volumen
Scal Enzym (10 U/ μ l)	30 μ l
10x Puffer für Scal	40 μ l
ddH ₂ O	30 μ l
DNA (1 μ g/ μ l)	300 μ l
Gesamtvolumen:	400 μ l

Der Reaktionsansatz wurde in einem 1,5ml Eppendorf Cup zusammengefügt und über Nacht bei 37°C im Heizblock inkubiert. Nach dem Verdau erfolgte eine Aufreinigung des Produktes.

Aufreinigung des Produktes und Überprüfung mittels Gelelektrophorese: Das Produkt des Restriktionsverdau wurde mit *QIAquick PCR Purification Kit* nach Herstellerprotokoll gereinigt.

Hierzu wurde das fünffache Volumen des Puffers PB zur DNA Probe gegeben, gemischt und auf einer QIAquick Säule gebunden, mit 750 μ l PE Puffer gewaschen, durch

abzentrifugieren getrocknet und mit 50 μ l destilliertem Wasser eluiert. Nach der Aufreinigung wurde die Konzentration der DNA photometrisch bestimmt, der Restriktionsverdau mittels Gelelektrophorese überprüft und das Produkt bei -20°C gelagert. Das lineare Produkt von ca. 6400bp stellt sich in der Gelelektrophorese (1.5% Agarose-Gel mit 10 μ l Ethidiumbromid pro 100ml Gel, Ladepuffer: 1 μ l 6x Orange Loading Dye Solution (Fermentas), 1kbp DNA Leiter *O'GeneRulerTM* (Fermentas) (10 μ l)) als eine, ungeschnittener Vektor als zwei oder drei Banden dar, welche verschiedene Verschlingungsstufen (coiled und supercoiled) repräsentieren. Dies bedeutet, dass mehrere Vektoren ineinander verschlungen sind und ein größeres Fragment bilden.

3.1.6 cDNA-Synthese

Die Synthese von komplementärer DNA (cDNA) erfolgte mit reverser Transkriptase (RT) aus isolierter RNA mit einem *Qiagen Omniscript RT* Kit. Die RNA wurde auf Eis aufgetaut und mit RNase freiem Wasser in einem 1,5ml Eppendorf Cup auf 1 μ g/12 μ l eingestellt. Bei zu geringen RNA Konzentrationen wurden 12 μ l RNA Stammlösung verwendet. Es wurden 8 μ l des Mastermix (Tabelle 3.2) hinzugegeben. Der Ansatz wurde 60 Minuten bei 37°C im Heizblock inkubiert.

Tabelle 3.2: Mastermix RT-Reaktion

Komponente	Volumen	Endkonzentration
10X RT Puffer	2 μ l	1x
dNTP Mix (5 mM pro dNTP)	2 μ l	0,5mM je dNTP
Hexamer Primer (10 μ M)	2 μ l	1 μ M
RNase Inhibitor (10 Units/ μ l) (Tab. 3.3)	1 μ l	10 Units (pro 20 μ l Ansatz)
Omniscript Reverse Transcriptase	1 μ l	4 Units (pro 20 μ l Ansatz)
RNase freies Wasser	variabel	
RNA-Template	variabel	1 μ g
Gesamtvolumen	20 μ l	

Tabelle 3.3: RNase Inhibitor (Promega)

Komponente	Volumen	Endkonzentration
RNase Inhibitor (40 μ U/ μ l)	0,5 μ l	10U/ μ l
10X RT Puffer	0,15 μ l	1x
RNase freies Wasser	1,35 μ l	-

3.1.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation eines bestimmten DNA Abschnittes. Somit lässt sich zum Beispiel die Expression eines bestimmten Genes auf mRNA Ebene oder das Vorhandensein eines bestimmten DNA Fragmentes in genomischer DNA (pRS-Vektor) in Kombination mit einer Gelelektrophorese nachweisen.

Für die PCR-Versuche wurden je 2µl DNA-Lösung mit 23µl Mastermix (Tabelle 3.4) in einem 250µl PCR-Tube mit dem entsprechenden Cyclerprogramm (Tabelle 3.5) inkubiert.

Tabelle 3.4: **PCR-Mastermix**

Komponente	Volumen
doppelt destilliertes Wasser	18µl
10x PCR Puffer	2,5µl
forward Primer	1µl
reverse Primer	1µl
dNTP Mix (10mM)	1µl
Taq-Polymerase (Units)	0,2µl

Tabelle 3.5: **PCR Cyclerprogramm**

Temp.	Zeit	Zyklenzahl	Primersequenz
95°C	2 min.		
94°C	15 sek.		
55°C	30 sek.	30	β-Actin forward: 5'-CCTTCCTGGGCATGGAGTCCT-3' reverse: 5'-AATCTCATCTTGTTTTCTGCG-3'
62°C	30 sek.	30	pRS forward: 5'-CCCTTGAACCTCCTCGTTTCGACC-3' reverse: 5'-GAGACGTGCTACTTCCATTTGTC-3'
63°C	30 sek.	40	TRERF1 forward: 5'-CCCCAGAACCAGGCCCCCAACTCAG-3' reverse: 5'-CAGGCAAGCCCAGACCATCCCGTGTATC-3'
59.8°C	30 sek.	40	EZH1 forward: 5'-TGGCCAGTGTTGCTTATCGCTTCA-3' reverse: 5'-TACCCGCCACACCCTTTCTACTC-3'
72°C	30 sek.		
72°C	5 min.		
4°C	Ende		

3.1.8 TOPO2.1 TA Cloning®

Das TOPO2.1 TA Cloning® ist ein kommerzielles System zur direkten Klonierung von Taq-Polymerase amplifizierten PCR Produkten in einen Plasmidvektor. Das PCR-Produkt

aus einer PCR auf das sh-Insert des pRS-Vektors wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten, aufgereinigt und $2\mu\text{l}$ der DNA Lösung mit $0,5\mu\text{l}$ Vektor und $0,5\mu\text{l}$ Puffer in einem Eppendorfcup bei 16°C im Heizblock über Nacht inkubiert. Mit dem Produkt wurden dann HB101 E.coli wie oben beschrieben transformiert und kultiviert. Die Region des sh-Inserts wurde bei MWG sequenziert.

3.1.9 pRS-Vektorsystem und Herstellung von shRNA-Vektoren

shRNA Designs gegen TRERF1

Es wurden drei unterschiedliche shRNA Designs zur Retransfektion in K562 erstellt.

Sequenz 1: Gizard [pSUPER.retro.puro HindIII layout]

```
GATC CCC aacatgtttgagttggccagg TTCAAGAGA cctggccaactcaaacatgtt TTTTTA
GGG ttqtacaaactcaaccqqtcc AAGTTCTCT qqaccqqttaqattttgtacaa AAAAAT TCGA
```

(a) Sequenz 1: Gizard (Mol Cell Biol, June 2005)

Sequenz 2: Dharmacon [pSUPER.retro.puro HindIII layout]

```
GATC CCC ggagaatgctgaaggaaga TTCAAGAGA tttccttcagcattctcc TTTTTA
GGG cctcttacqacttccttct AAGTTCTCT aaaaqaaqtcqtaaaqaa AAAAAT TCGA
```

(b) Sequenz 2: Dharmacon Homepage

Sequenz 3: NKI Original [pSUPER.retro.puro HindIII layout]

```
GATC CCC taagacaccgctgtaagc TTCAAGAGA gttaccagcgggtgtctta TTTTTA
GGG attctgtqqcaccattc AAGTTCTCT cqaatqqtcccacaqaat AAAAAT TCGA
```

(c) Sequenz 3: NKI Original Sequenz

Abbildung 3.1: shRNA Designs gegen TRERF1

Annealing der Oligos

Die lyophilisierten Oligos wurden in nukleasefreiem Wasser gelöst und eine Endkonzentration von 3 mg/ml eingestellt. Je $1\mu\text{l}$ Oligolösung wurde mit $48\mu\text{l}$ Annealingpuffer in einem Eppendorfcup im PCR Cycler zunächst auf 90°C erhitzt und anschließend schrittweise abgekühlt. Hierbei wurden die einzelnen Oligonukleotide zunächst getrennt und dann während des Abkühlens komplementär zusammengelagert. Um unspezifische Bindungen zu verhindern geschah dies langsam und schrittweise.

Tabelle 3.6: **Annealing Programm für PCR-Cycler**

Temperatur in °C	90	70	65	55	45	37	10	4
Zeit in Minuten	4	10	5	5	5	5	5	Hold

Linearisierung des Vektors

Vor der Ligation wurde der Vektor durch Restriktionsverdau mit Bgl II (Fermentas) und Hind III (Fermentas) in Tango 2x Puffer linearisiert. Der Ansatz wurde mit 1 μ g DNA für 1.5 Stunden bei 37°C inkubiert, 20 Minuten bei 65°C inaktiviert. Danach erfolgte der Auftrag auf ein 1%iges Agarosegel, Extraktion der Bande, Aufreinigung mittels *QIA-quick PCR Purification Kit* nach Herstellerprotokoll und Normalisierung der DNA Lösung zwischen 0.2 und 0.5 mg/ml.

Ligation der Oligos in den linearisierten Vektor

Der Ligationsansatz wurde bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert (Tabelle 3.7). Vor Transformation erfolgte ein erneuter Restriktionsverdau mit BglIII über 30 Minuten bei 37°C zur Reduktion falsch positiver Kolonien. Bei korrekter Ligation wurde die BglIII Schnittstelle im Vektor zerstört. Es wurde eine Negativkontrolle mit leerem Vektor mitgeführt.

Tabelle 3.7: **Ligationsansatz für pSUPER.retro.puro shRNA**

2 μ l	Oligos
1 μ l	T4 Ligasepuffer
1 μ l	pSUPER.retro.puro Vektor linearisiert
5 μ l	Nukleasefreies Wasser
1 μ l	T4 Ligase
<hr/>	
10 μ l	Gesamtvolumen

Transformation von E. coli

Nach Ligation und Restriktionsverdau mit BglIII erfolgte die Transformation von E.coli TOP 10 mit dem Ligationsansatz und Isolation der Plasmide wie oben beschrieben.

Überprüfung des Inserts

Zur Überprüfung der korrekten Klonierung der Plasmide erfolgte der Restriktionsverdau mit EcoRI und HindIII. Positive Kolonien ergaben ein Fragment mit 281 Basenpaaren;

negative Klone ergaben ein Produkt mit ca. 227 Basenpaaren (z.B. Supercoil ca. 227 oder 248 Basenpaare). Positive Klone wurden zur Bestätigung des Inserts zusätzlich sequenziert.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Zellkultur und IM Behandlung

Die Zellen wurden während der Kultivierung und der Versuche stets in einem Inkubator (Begasungsbrutschrank) B5060 von Heraeus bei 37°C und 5% CO₂ in RPMI-1640 (Gibco) mit 10% FCS und 1% Penicillin, Streptomycin inkubiert. K562 wurden bei einer Zelldichte von 1.0-1.5 x 10⁶ Zellen/ml oder spätestens alle drei Tage passagiert.

Behandlung von K562 mit IM K562 und entsprechend transfizierte Zellen und Klone aus dem Screeningversuch wurden mit IM in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. Hierzu wurden, soweit nicht anders genannt, 0.1 x 10⁶ Zellen in 2ml KM mit entsprechenden Konzentrationen IM oder Wasser als Kontrolle über 24, 48 und 72 Stunden inkubiert und die Viabilität mittels FACS bestimmt.

Screening Versuch Der Versuch zur IM-Resistenz wurde analog dem von Bubnoff et al. publizierten zellbasierten IM-Resistenz-Assay durchgeführt.^{105,106} Dieser wurde in modifizierter Form in unserem Labor verwendet.⁵⁷ Für die mit sh-library transfizierten K562-Zellen wurden drei Ansätze und entsprechende Kontrollen mit scrambled-shRNA durchgeführt. Jeder Ansatz wurde in einer 96-well Platte mit 0,024 x 10⁶ Zellen in je 200µl RPMI-1640 durchgeführt. Die IM Konzentration betrug 750nM. Verdunstetes Kulturmedium wurde regelmäßig ersetzt und über einen Zeitraum von drei Wochen die Bildung von Kolonien unter dem Mikroskop beurteilt. Proliferierende Klone wurden selektiert und weiter untersucht.

3.2.2 Transfektion von Plasmid-DNA in humane Zellen mittels **AMAXA™**

Für den Screen und die Retransfektion mit den neu konstruierten Vektoren wurden K562-wt Zellen mit durch Verdau mit Scal linearisierten pRS-Human-Library und pRS-scrambel Vektoren transfiziert. Die Effizienz der Transfektion wurde durch einen parallelen Transfektionsversuch mit einem pRS-ski-GFP Vektor und anschließende FACS Messung, sowie fluoreszenzmikroskopisch kontrolliert. Hierzu wurden 2 x 10⁶ Zellen mit je 4µg DNA

nach Herstellerprotokoll (Programm F003, Nucleofector V Lösung) mit AMAXA® transfiziert und unter 0,5µg/ml Puromycin selektioniert. Nach einer Woche Selektion wurde die Integration der Vektoren mittels PCR aus genomischer DNA überprüft.

3.3 Durchflusszytometrie (FACS)

3.3.1 Messung der Transfektionseffizienz mittels GFP-FACS

Um die Transfektionseffizienz abschätzen zu können, erfolgte bei allen Transfektionen ein Parallelversuch mit Transfektion des pRS-ski-GFP Vektors. 72 Stunden nach Transfektion wurden 1×10^6 Zellen aus der Kultur entnommen, pelletiert und in PBS resuspendiert. Es erfolgte die Messung der GFP positiven Zellen (FITC positiv) anteilig an allen vitalen Zellen auf dem LSR II. Die Auswertung der Daten erfolgte mit FlowJo.

3.3.2 Messung der Zellviabilität mittels FACS

Zur Bestimmung des Anteils lebender Zellen an der Gesamtpopulation wurde jeweils die gesamte Menge an Zellen des jeweiligen Inhibitionsansatzes abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und in 500µl PBS resuspendiert und anschließend „sidescatter“ (SSC) gegen „forward scatter“ (FSC) auf dem LSRII gemessen. Zellen mit geringem FSC und hohem SCC wurden hierbei als nicht lebend definiert.

3.3.3 pCrkL-Färbung

Intrazellulär dient p-CrkL als Marker für die BCR-ABL Kinaseaktivität. 2×10^6 K562 wurden über 6 Stunden mit 3µM IM und 300nM NI in Kulturmedium inkubiert, abzentrifugiert, in PBS gewaschen, pelletiert und anschließend bei 37°C für 10 Minuten in Fix Buffer I fixiert oder für 30' auf Eis in 1ml BD Phosflow Perm Buffer III bei sofortiger Analyse der Zellen permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen mit BD Pharmingen Stain Buffer und Resuspension in 100µl BD Pharmingen Stain Buffer wurden 2,5µl anti-phospho-CrkL zugegeben und für 30' bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurde erneut zweimal mit BD Pharmingen Stain Buffer gewaschen, 3µl FITC goat anti-rabbit-AK zugegeben und für 15 Minuten bei RT im Dunkeln inkubieren. Nach erneutem Waschen und Resuspension in 500µl BD Pharmingen Stain Buffer erfolgte die Messung auf dem LSRII und Auswertung mit FlowJo.

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Vorarbeiten zum Screen

4.1.1 Erstellung von Dosis-Testkurven

Vor Beginn des Screeningversuches musste diejenige Konzentration ermittelt werden, bei der die meisten Zellen absterben und noch keine konzentrationsunabhängige Toxizität eintritt. Hierzu wurden 0.1×10^6 K562-wt Zellen in 2 mL RPMI-1640 mit 500, 750, 1000 und 4000 nM IM über 24, 48 und 72 Stunden inkubiert und die Viabilität mittels FACS bestimmt. Ab einer Konzentration von 1000 nM IM war keine Steigerung des Absterbens zu erkennen, sodass 750 nM als Konzentration für den Screen gewählt wurde.

4.1.2 Transfektion der Zelllinie und Überprüfung der Effizienz

Für den Screen wurden K562-wt Zellen mit durch Verdau mit Scal linearisierten pRS-Human-Library und pRS-scramble (pRS-scr) Vektoren transfiziert. Die Effizienz der Transfektion wurde durch einen parallelen Transfektionsversuch mit einem pRS-ski-GFP Vektor und anschließender FACS Messung, sowie fluoreszenzmikroskopisch kontrolliert. Hierzu wurden 2×10^6 Zellen mit je $4 \mu\text{g}$ DNA nach Herstellerprotokoll mit AMAXA[®] transfiziert. Anschließend erfolgte eine Selektion unter $0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ Puromycin. Nach einer Woche Selektion wurde die Integration der Vektoren mittels PCR aus genomischer DNA überprüft. Die Transfektionseffizienz lag in der FACS-Messung bei 22.3%. Durch eine etwas geringere Effizienz sollte das Risiko einer Doppeltransfektion einzelner Zellen verringert werden.

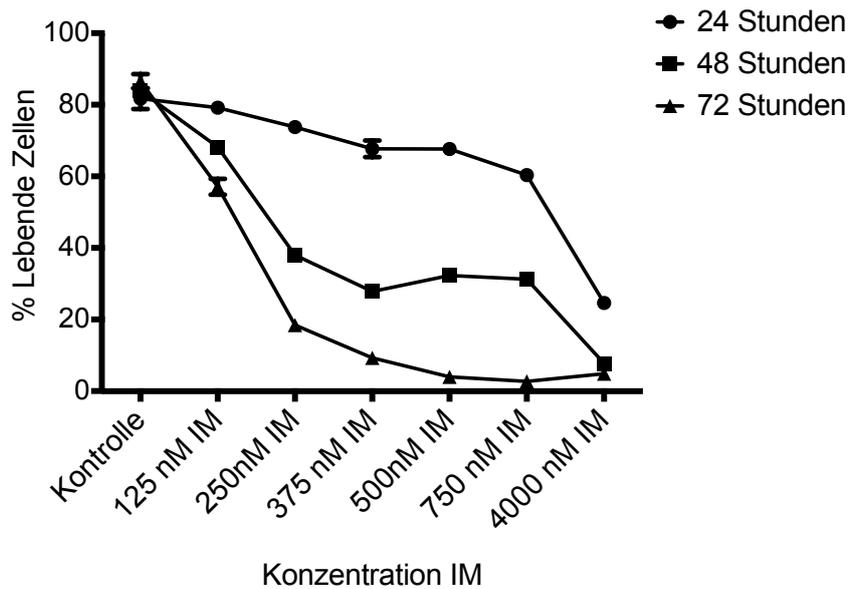


Abbildung 4.1: Vor Durchführung des Screens wurde die minimale Konzentration für ein möglichst hohes Absterben der Zellen nach 72 Stunden ermittelt. K562-wt wurden mit aufsteigender Konzentration von IM über 24, 48 und 72 Stunden behandelt.

4.2 Durchführung des shRNA-Screens

Es erfolgten zwei Ansätze für die Durchführung des Screens. Ansatz A sah eine Inkubation von 2.4×10^6 Zellen in 20mL RPMI-1640 mit 750 nM IM für 24, 72 und 96 h in Kulturflaschen vor. Genomische DNA wurde isoliert und zurückgestellt, um bei Verfügbarkeit einen Barcode-Array, wie von Brummelkamp et al. in Nature beschrieben durchzuführen. Für Ansatz B wurden in 96well-Platten je 24.000 Zellen pro well in 200 μ l RPMI-1640 mit 0.75 μ M IM für 3 Wochen inkubiert. Für die Ansätze mit pRS-human-library transfizierten Zellen erfolgten drei Versuchsansätze, für pRS-scr transfizierte und wt-Zellen erfolgte je ein Ansatz. Nach drei Wochen Inkubation fanden sich im Kontrollansatz mit K562-scr zwei Klone und in den K562-library Ansätzen 15. Diese wurden in 12-well Platten mit RPMI-1640 inkubiert. Hier zeigte sich für drei Klone (D4, F3, A10) des K562-library Ansatzes ein weiteres Wachstum. Diese Klone wurden weiter kultiviert und untersucht.

4.3 Charakterisierung Imatinib-resistenter Klone

4.3.1 Rückgewinnung und Bestimmung der shRNA-Sequenz

Im ersten Schritt zur Charakterisierung der Klone wurde der integrierte pRS-Vektor mittels PCR aus genomischer DNA nachgewiesen. Dies gelang in den Klonen D4 (Abb. 4.2) und F3 (Abb. 4.3). Im Klon A10 ließ sich kein pRS-Vektor nachweisen. Die gewonnenen PCR-Produkte, welche die Region des sh-Inserts überspannt, wurden in pCR2.1[®]-TOPO[®] Vektoren kloniert und in HB101 E. coli expandiert. Von jedem Ansatz wurden Kolonien gepickt und über Nacht erneut kultiviert. Danach erfolgte die Isolation und Sequenzierung der Plasmide.

Die Bestimmung der homologen Sequenzen zu den sh-Inserts erfolgte mit Hilfe des BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) Programms „*nucleotide blast*“ auf der Homepage des *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*. Hierbei ergaben sich für die drei eingeschickten Plasmide des Klons D4 Homologien für den Homo sapiens transcriptional regulating factor 1 (TRERF1). Von neun eingeschickten Plasmiden des Klons F3 war eine Sequenz nicht verwertbar, eine Sequenz ergab Homologien zu Homo sapiens BCL2-like 11 (apoptosis facilitator) (BCL2L11) transcript variant 1, eine zu Homo sapiens seizure related 6 homolog (mouse)-like 2 (SEZ6L2), transcript variant 2 und sechs zu Homo sapiens enhancer of zeste homolog 1 (Drosophila) (EZH1) (Tabelle 4.1).

Zur weiteren Untersuchung wurden EZH1 (F3) und TRERF1 (D4) herangezogen, da sie in drei und mehr Proben nachweisbar waren.

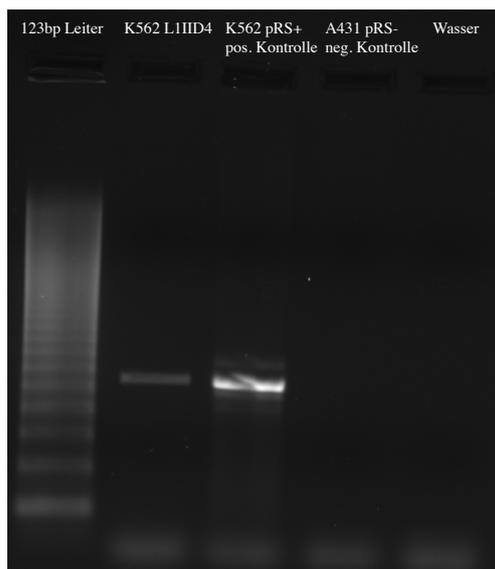


Abbildung 4.2: pRS PCR aus genomischer DNA des Klons D4

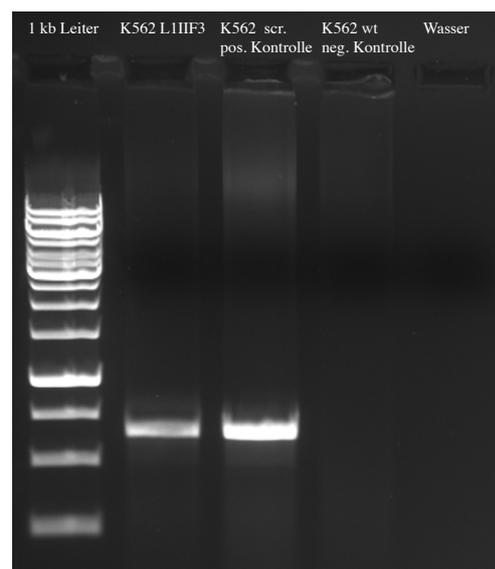


Abbildung 4.3: pRS PCR aus genomischer DNA des Klons F3

4.3.2 Erstellung von Wachstumskurven im Vergleich zu Kontrollen

Um zu zeigen, dass die Klone D4 (TRERF1) und F3 (EZH1) im Vergleich zu K562-wt oder K562-scr IM resistent waren, wurden sie mit unterschiedlichen Konzentrationen über 24, 48 und 72 Stunden behandelt. Hierbei zeigte sich, dass D4 (TRERF1) und F3 (EZH1) im Vergleich zu K562-wt oder -scr weniger empfindlich auf IM reagierten (Siehe Abb. 4.4).

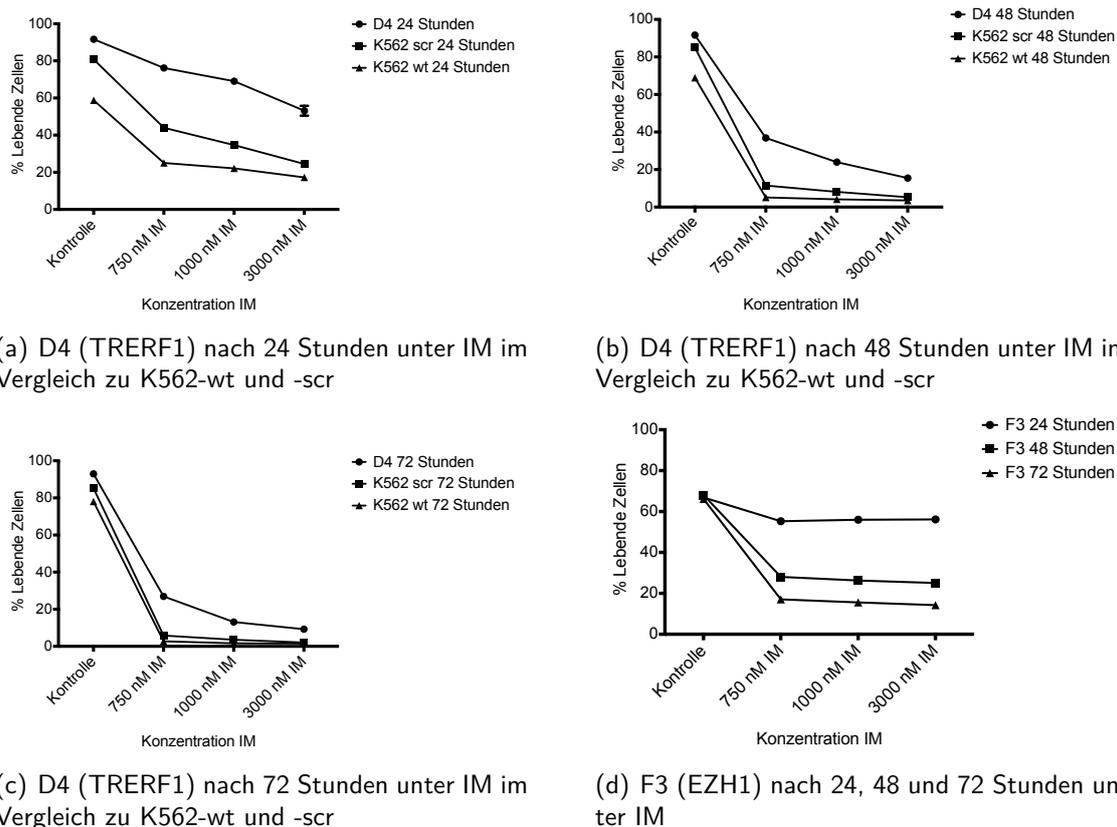
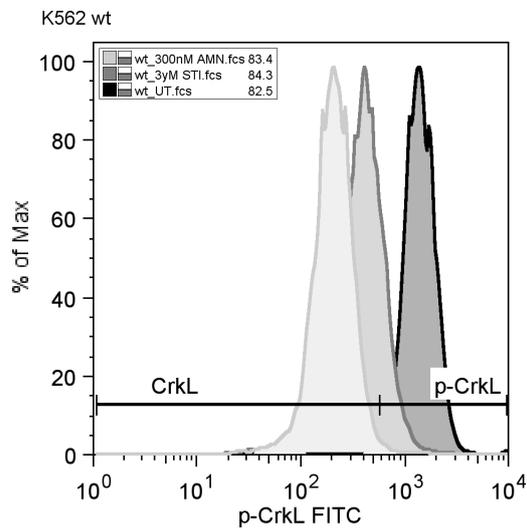


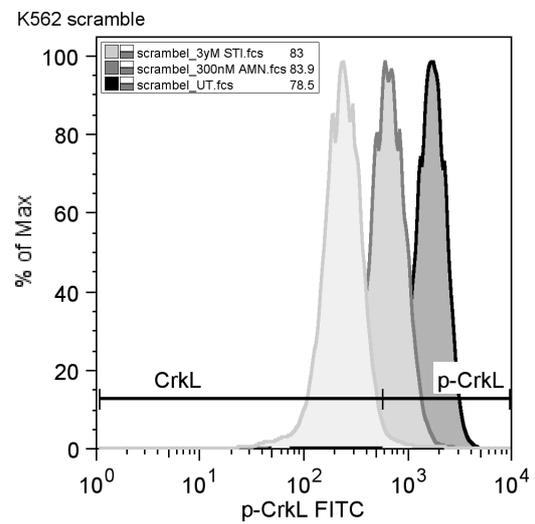
Abbildung 4.4: Wachstum der primären Klone unter IM

4.3.3 Hemmung von p-CrkL als indirekter Marker der BCR-ABL Funktion

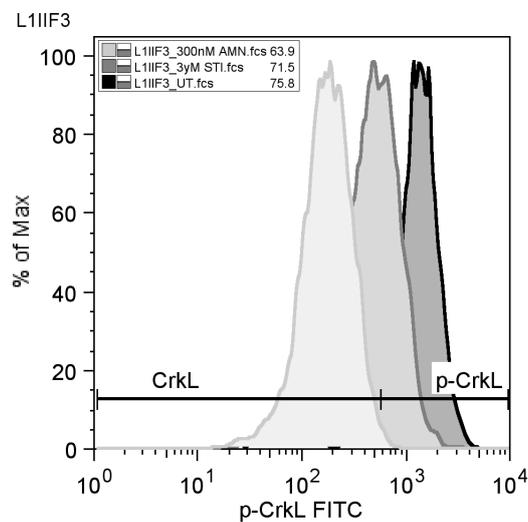
Um zu klären, ob eine BCR-ABL abhängige Resistenz vorliegt, wurde p-CrkL als indirekter Marker für die BCR-ABL Kinaseaktivität nach Exposition mit IM und NI gemessen. Hier zeigte sich eine Abnahme von p-CrkL und somit eine Dephosphorylierung von BCR-ABL. Eine BCR-ABL unabhängige IM- und NI-Resistenz konnte exemplarisch für den Klone D4 (TRERF1) gezeigt werden (Abb. 4.5).



(a) p-CrkL in K562-wt in Abhängigkeit von IM und NI gegenüber einer unbehandelten Kontrolle



(b) p-CrkL in K562-scr in Abhängigkeit von IM und NI gegenüber einer unbehandelten Kontrolle

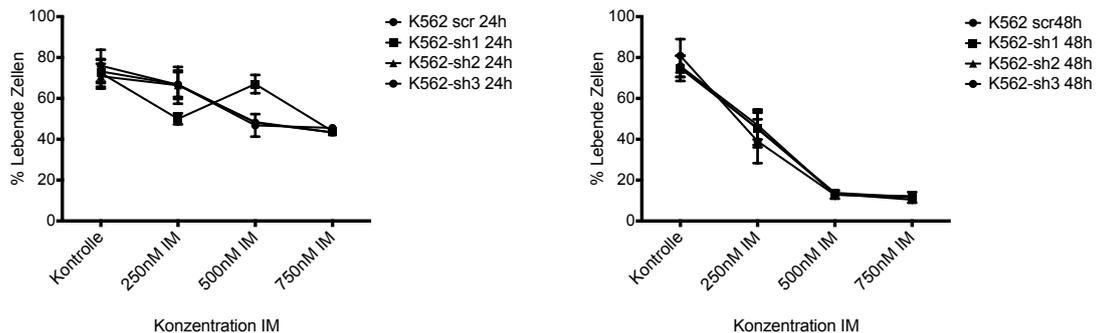


(c) p-CrkL in F3 (EZH1) in Abhängigkeit von IM und NI gegenüber einer unbehandelten Kontrolle

Abbildung 4.5: Hemmung von p-CrkL als Marker der BCR-ABL Kinaseaktivität bei K562-wt, -scr und F3 (EZH1) mit IM und NI gemessen gegen eine unbehandelte Kontrolle.

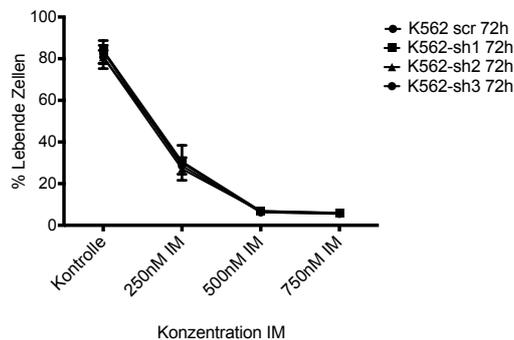
4.4 Validierung der Sequenzen für TRERF1 durch Re-transfektion der wt-Zellen mit neuen Vektoren

Die Gene EZH1 und TRERF1 werden in K562-Zellen exprimiert (Datenbank *BioGPS*).⁹⁷ Um zu verifizieren, dass das Ausschalten der gefundenen Gene eine Resistenz gegen IM vermittelt, wurden je drei pRS-Vektoren mit sh-Inserts gegen TRERF1 generiert. Hierbei wurden jeweils die Originalsequenz aus der NKI-Library (sh3), respektive dem isolierten Klon verwendet und zwei neue Inserts generiert. Für TRERF1 wurde eine Sequenz aus einer Arbeit von Gizard (sh1) übernommen³³ und eine Sequenz von der Firma Dharmacon generiert (sh2). Alle drei Inserts wurden in den pSUPER.retro.puro-Vektor kloniert und in K562-wt Zellen mittels AMAXA[®] nach Herstellerprotokoll transfiziert, nach Selektion mit Puromycin wurde die Transfektionseffizienz kontrolliert und die Integration des Vektors mittels PCR in den transfizierten Zellen nachgewiesen. Die generierten Zelllinien K562-sh1, 2 und 3 wurden mit IM inkubiert und das Überleben im Vergleich zu K562-scr gemessen (Abb. 4.6). Eine Resistenzentwicklung durch die spezifischen TRERF1-shRNAs sh1, 2 und 3 konnte nicht erbracht werden.



(a) Überleben von K562-scr, -sh1, -sh2 und -sh3 nach Inkubation mit IM über 24 Stunden

(b) Überleben von K562-scr, -sh1, -sh2 und -sh3 nach Inkubation mit IM über 48 Stunden



(c) Überleben von K562-scr, -sh1, -sh2 und -sh3 nach Inkubation mit IM über 72 Stunden

Abbildung 4.6: Überleben von K562-scr, -sh1, 2 und 3 nach Inkubation mit IM für 24 Stunden (a), 48 Stunden (b) und 72 Stunden (c).

Tabelle 4.1: **sh-Sequenzen der überlebenden Zellklone**

Klon	Sequenz	BLAST Ergebnis
F3 - 1	5'-TGGAAGTTTGTGTGAATG-3'	Homo sapiens BCL2-like 11 (apoptosis facilitator) (BCL2L11), transcript variant 1, mRNA, NM_138621
	5'-CATTCCCAACAACATCCA-3'	keine Übereinstimmung aller 19 Basen mit einem Transkript
F3 - 2	5'-GATAACTCTTCCACACAAG-3'	Homo sapiens enhancer of zeste homolog 1 (Drosophila) (EZH1), mRNA, NM_001991
	5'-CTTGTGTGGAAGAGTTATC-3'	Homo sapiens enhancer of zeste homolog 1 (Drosophila) (EZH1), mRNA, NM_001991
F3 - 3	5'-CCTGAAGGAGGAGGAGATA-3'	Homo sapiens seizure related 6 homolog (mouse)-like 2 (SEZ6L2), transcript variant 2, mRNA, NM_201575
	5'-TATCTCCTCCTCCTTCAGG-3'	Homo sapiens seizure related 6 homolog (mouse)-like 2 (SEZ6L2), transcript variant 2, mRNA, NM_201575
F 3 - 4	5'-GATAACTCTTCCACACAAG-3'	Homo sapiens enhancer of zeste homolog 1 (Drosophila) (EZH1), mRNA, NM_001991
	5'-CTTGTGTGGAAGAGTTATC-3'	Homo sapiens enhancer of zeste homolog 1 (Drosophila) (EZH1), mRNA, NM_001991
F3 - 5	5'-CCTGAAGGAGGAGGAGATA-3'	Homo sapiens seizure related 6 homolog (mouse)-like 2 (SEZ6L2), transcript variant 2, mRNA, NM_201575
	5'-TATCTCCTCCTCCTTCAGG-3'	Homo sapiens seizure related 6 homolog (mouse)-like 2 (SEZ6L2), transcript variant 2, mRNA, NM_201575
F3 - 6	5'-GATAACTCTTCCACACAAG-3'	Homo sapiens enhancer of zeste homolog 1 (Drosophila) (EZH1), mRNA, NM_001991
	5'-CTTGTGTGGAAGAGTTATC-3'	Homo sapiens enhancer of zeste homolog 1 (Drosophila) (EZH1), mRNA, NM_001991
F3 - 7	nicht korrekt sequenziert	
F3 - 8	5'-GATAACTCTTCCACACAAG-3'	Homo sapiens enhancer of zeste homolog 1 (Drosophila) (EZH1), mRNA, NM_001991
	5'-CTTGTGTGGAAGAGTTATC-3'	Homo sapiens enhancer of zeste homolog 1 (Drosophila) (EZH1), mRNA, NM_001991
F3 - 9	5'-GATAACTCTTCCACACAAG-3'	Homo sapiens enhancer of zeste homolog 1 (Drosophila) (EZH1), mRNA, NM_001991
	5'-CTTGTGTGGAAGAGTTATC-3'	Homo sapiens enhancer of zeste homolog 1 (Drosophila) (EZH1), mRNA, NM_001991
D4 - 1	5'-GCTTCTCAGCGGTGCTTA-3'	
	5'-TAAGACACCGCTGTAAGC-3'	Homo sapiens transcriptional regulating factor 1 (TRERF1), mRNA, NM_033502
D4 - 2	5'-GCTTCTCAGCGGTGCTTA-3'	
	5'-TAAGACACCGCTGTAAGC-3'	Homo sapiens transcriptional regulating factor 1 (TRERF1), mRNA, NM_033502
D4 - 3	5'-GCTTCTCAGCGGTGCTTA-3'	
	5'-TAAGACACCGCTGTAAGC-3'	Homo sapiens transcriptional regulating factor 1 (TRERF1), mRNA, NM_033502

Kapitel 5

Diskussion

Die Resistenzen gegenüber TKI sind ein in Teilen noch ungeklärtes klinisch relevantes Problem. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, durch den Einsatz einer shRNA Library neue Gene zu identifizieren, deren Verlust eine Resistenz vermittelt.

5.1 Transduktionswege der shRNA-Library in K562 Zielzellen

Es wurde die von Bernards et al. entwickelte NKI shRNA-Library verwendet. Sie gehört zu den ersten großen shRNA-Bibliotheken und basiert auf einem retroviralen MSCV (Murine Stem Cell Virus) „backbone“, welcher mittels Transfektion oder Infektion in die Wirtszelle eingebracht werden kann.⁷

Die Infektion der Zielzellen mittels eines Virus erfordert die Verwendung einer sogenannten Verpackungs-Zelllinie, welche die Virusbestandteile liefert. Hierbei muss die Tropie des Virus berücksichtigt werden. Für eine humane Zelllinie eignen sich am besten humane Retroviren (z.B. Lentiviren). Jedoch verfügte unser Labor über keine entsprechende Verpackungszelllinie und nicht die nötige Sicherheitsstufe. Zudem ist die NKI-Library nicht für eine lentivirale Infektion konstruiert. Daher wurde zunächst ein murines Retrovirus verwendet und die Zielzellen mit einem murinen ecotropen Rezeptor (EcoR) transfiziert. Hierbei zeigte sich in den Vorversuchen eine schwere Alteration des Zielzellphänotyps und nur eine geringe Infektionseffizienz bei Suspensionszellen. Aufgrund dieser Erfahrungen erfolgte die Transfektion der Library in die Zielzellen mittels Elektroporation.

5.2 TRERF-1 Verlust als möglicher Resistenzmechanismus bei CML

Im Screen wurde der Verlust von TRERF-1 (TReP-132, Transcriptional Regulation Protein of 132 kDa) als möglicher resistenzvermittelnder Faktor gefunden. Es handelt sich um ein Gen auf Chromosom 6, welches für einen Transkriptionsfaktor kodiert.³⁰ Es wurde primär im Zusammenhang mit Steroidhormonsynthese beschrieben und agiert hier als Coaktivator von SF-1 im Komplex mit CBP/p300.³² Es ist an der Expressionsregulation verschiedener Gene der Steroidsynthese³¹ über eine Interaktion durch ein LXXLL Motiv beteiligt. TRERF-1 erhöht die Expression von p21 und p27 über eine Promotorinteraktion mit SP-1 und ist damit auch bei der Zellzyklusregulation involviert. Es verringert die Kinaseaktivitäten von G1 Cyclin/CDK Komplexen und die Menge an phosphoryliertem RB, was zu einem Zellzyklusarrest am G1 - S Übergang führt.³³ BCR-ABL inhibiert die Expression von p27 über den PI3K/AKT Signalweg. Die Inhibition mit von BCR-ABL mit IM führt zu einer Zunahme von p27 in den Zellen und hemmt den Übergang in die S-Phase.²⁹ Ein Ausschalten von TRERF-1 mittels siRNA führt zu einem vermehrten Anteil an Zellen in der S-Phase³³ (Abb.:5.1 A). Zellen, die in ihrem Wachstum durch IM gehemmt würden, könnten durch den Verlust von TRERF-1 und einer somit verringerten Expression von p27 und 21 in die S-Phase übergehen und den IM vermittelten Arrest aufheben (Abb.:5.1 B). Der isolierte Klon zeigte eine inkomplette Resistenz gegenüber IM (Abb.:4.4). Eine erneute Transfektion von K562-wt mit drei verschiedenen sh-RNA Vektoren gegen TRERF-1 konnte den Resistenzeffekt nicht reproduzieren. Eine Zellzyklusbeeinflussung war ebenfalls nicht konstant reproduzierbar.

5.3 EZH1 Verlust als möglicher Resistenzmechanismus bei CML

Der Verlust von EZH1 (Enhancer of Zeste Homolog 1), einem Gen der Polycomp Gruppe (PcG) wurde im Screen als möglicher resistenzvermittelnder Faktor gefunden.

Gene und Proteine dieser Gruppe sind an der epigenetischen Regulation in der Entwicklung durch Methylierung des Histon H3 am Lysin-Rest 27 (H3K27) beteiligt.⁵⁹ EZH1 findet sich im Mausmodell verstärkt in den späteren Stadien der Entwicklung. Es wird vor allem in Niere, Hirn und Skelettmuskulatur exprimiert,⁵⁹ wobei es hauptsächlich im Zellkern lokalisiert ist.⁶⁶ Die PcG Proteine funktionieren in Komplexen. Am besten charakterisiert sind der Polycomp Repressive Complex (PRC) 1 und 2. PRC1 besteht aus mehr als 10 Untereinheiten einschließlich des Onkoproteins BMI1.⁷⁶ PcG Gene des PRC2

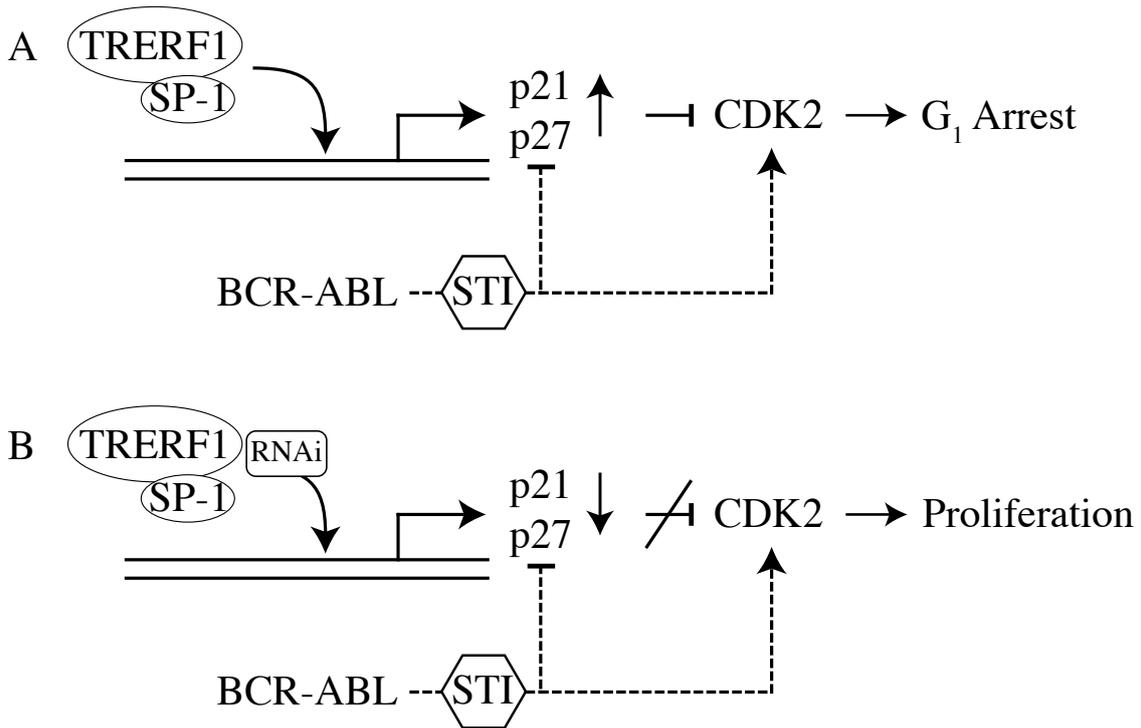


Abbildung 5.1: **A:** TRERF-1 erhöht die Expression von p21 und p27 über eine Promotorinteraktion mit SP-1.³³ Es verringert die Kinaseaktivitäten von G1 Cyclin/CDK Komplexen und die Menge an phosphoryliertem RB, was zu einem Zellzyklusarrest am G1 - S Übergang führt. BCR-ABL inhibiert die Expression von p27 über den PI3K/AKT Signalweg. Die Inhibition von BCR-ABL führt zu einer Zunahme von p27 in den Zellen und hemmt Übergang in die S-Phase.²⁹ **B:** Ein Ausschalten von TRERF-1 mittels siRNA führt zu einem vermehrten Anteil an Zellen in der S-Phase und Proliferation.³³ Dies wäre ein mögliches Modell für einen Resistenzmechanismus in K562.

Komplexes werden über den pRB/E2F Signalweg reguliert. PRC2 ist kleiner und besteht aus EZH1 oder 2,⁹² EED (embryonic ectoderm development), SUZ 12 (supressor of Zeste 12 homolog) und dem Histonbindungsprotein RbAp46. Die Interaktion mit RbAp48 wird über SUZ12 vermittelt.⁶⁶

Die EZH2 und EZH1 Zielgene überlappen. EZH1 reguliert nur eine Subgruppe der EZH2 Gene. 30% der EZH1 Zielgene stehen im Zusammenhang mit Zellkern- und Entwicklungsfunktionen.⁶⁶ Eine Resistenzvermittlung wäre hier über eine fehlende Repression zellzyklusregulierender Gene denkbar. Dieser Zusammenhang ist für CML und EZH1 bislang nicht beschrieben worden. Entgegen der eigenen Hypothese, dass ein Verlust von EZH1 als Bestandteil des PRC2 zu Resistenz führt, zeigten Mochizuki-Kashio et al. in ihrer Arbeit, dass die Inhibition des PRC2 Komplexes zu einer Reaktivierung von proapoptischen Genen und somit zur Apoptose von K562 Zellen führen kann.⁶⁷ Es

ist jedoch zu bemerken, dass von den Kollegen kein besonderes Augenmerk auf EZH1 gelegt wurde. Für EZH2 konnte gezeigt werden, dass ein Verlust von EZH2 (und/oder PRAME) in K562 zu einer Reexpression von TRAIL und somit zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber IM führt.¹⁶ In einer neueren Arbeit war EZH2 beim myelodysplastischen Syndrom als Risikofaktor für ein kürzeres Überleben beschrieben worden.⁴

5.4 BCL-2 like 11 (BCL2L11) Verlust - ein bekannter Resistenzmechanismus bei CML

Bcl2-like Protein 11 (Bim, Bcl-2 interacting mediator of cell death) wurde ebenfalls im Screen gefunden. Es gehört zur Bcl-2 Familie, welche Apoptose regelt. Es gibt drei BIM Isoformen (BIM_{EL} , BIM_L , BIM_S) mit unterschiedlicher Potenz der Apoptoseinduktion. BIM kann durch bestimmte Mitglieder der Bcl-2 Subfamilie ($Bcl-x_L$, Bcl-w) gehemmt werden. Die Überexpression von *BIM* führt zum Absterben der Zellen über einen Caspase abhängigen Signalweg.⁷⁵

Die Expression wird unter anderem von FoxO3a reguliert. In *BCR-ABL* positiven Zellen führt eine Phosphorylierung von FoxO3a über den PI3-K Signalweg zu einem Abbau und somit zur Repression von *BIM*, damit zum Überleben der Zelle. Durch die Hemmung von BCR-ABL durch IM wird FoxO3a nicht mehr phosphoryliert und es kommt zur Expression von *BIM* durch Bindung von FoxO3a über ein FHRE an den *BIM* Promoter.²⁴

Die Repression von *BIM in vitro* mittels siRNA führt zu einer Resistenzentwicklung BCR-ABL abhängiger Zellen gegenüber IM.^{24,58} Es konnte gezeigt werden, dass eine verminderte Expression von *BIM* durch epigenetische Regulation für ein schlechteres Ansprechen von CML-Patienten auf IM verantwortlich sein kann.⁴⁸

5.5 Seizure-Related 6 Homolog (Mouse)-Like 2 (SEZ6L2) - ein neues Target bei CML?

Seizure-Related 6 Homolog (Mouse)-Like 2 (SEZ6L2) kodiert für ein Oberflächenprotein. Das Gen ist auf dem Chromosom 16p11.2 lokalisiert. Es wird angenommen, dass es Kandidatengene für Erkrankungen des autistischen Formenkreises (autism spectrum disorders [ASD]) beinhaltet. Es gibt jedoch keinen direkten Hinweis für einen Zusammenhang von SEZ6L2 mit ASD.^{3,56} In einem anderen Zusammenhang wurde eine erhöhte Expression von SEZ6L2 bei Malignomen der Lunge gefunden. Es wird als möglicher neuer prognostischer Marker beschrieben.⁴⁴ Eine andere Arbeitsgruppe beschreibt das Protein als möglicher Marker zur Differenzierung von Pankreaszellen in unterschiedlichen Ent-

wicklungsstufen.³⁸ Ein Zusammenhang mit Leukämie oder CML ist jedoch bislang nicht nachgewiesen. Wir gehen daher bei fehlendem Zusammenhang mit onkogenen Eigenschaften, Zellzyklusregulation oder Apoptose von einem falsch positiven Ergebnis aus.

5.6 Bewertung der Ergebnisse in Hinblick auf mögliche „off-target“ Effekte

Zur weiteren Validierung der Ergebnisse wäre der Nachweis des Phänotyps durch mehrere unabhängige shRNAs, Nachweis des „knock-down“ auf Protein und mRNA Ebene in Korrelation mit dem Phänotyp und die Rekonstitution nach „Rescue“ mit BAC (Bacterial Artificial Chromosome) oder Reexpression auf einem Plasmid zu fordern. Für TRERF-1 wurden drei unabhängige shRNA-Vektoren (Original Sequenz, Sequenz nach Gizard et al.,³³ Dharmacon) kloniert um den spezifischen Effekt *in vitro* zu reproduzieren. Nach erfolgreicher Transfektion von K562-wt mit den entsprechenden Vektoren war jedoch kein spezifischer Phänotyp abgrenzbar. Ebenso konnte das beobachtete Resistenzphänomen durch keinen der konstruierten Vektoren reproduziert werden. Es wäre nach den Publikationen von Gizard eine Beeinflussung des Zellzyklus zu erwarten gewesen.³³ Als mögliche Ursache für dieses Phänomen kommt fehlende Expression von TRERF-1 in K562-wt in Frage. Als Zweites ist zu diskutieren, ob die generierten Konstrukte überhaupt funktionsfähig sind. Hierfür wäre eine Transfektion von MCF-7 als TRERF-1 exprimierende Zelllinie ein geeigneter Versuch gewesen.

Die Frage, ob es sich bei den gefundenen Genen tatsächlich um echte „Hits“ oder nur zufällig verteilte Ereignisse handelt, lässt sich aufgrund der erhobenen Daten nicht abschließend klären. Für BCL-2 like ist tatsächlich ein Zusammenhang mit IM Resistenz beschrieben, was impliziert, dass es sich um ein richtig-positives Ergebnis handelt. Bei TRERF-1 und EZH1 bleibt es unschlüssig, da nach Literaturlage theoretisch ein Resistenzmechanismus zu konstruieren ist, welcher sich *in vitro* nicht reproduzieren lässt. SEZ6L2 kann man aufgrund der Literatur als falsch positives Ergebnis einordnen.

Kapitel 6

Zusammenfassung

Resistenz gegenüber IM stellt ein klinisches relevantes und in den zugrunde liegenden Mechanismen bislang nur teilweise verstandenes Problem dar. Um weitere mögliche Ursachen für eine Resistenzentwicklung zu finden, bedienten wir uns eines shRNA basierten Screen mit der von Brummelkamp et al. 2002 etablierten NKI-Library. K562-wt wurden mit der Library und Kontroll-Vektoren transfiziert und mit 750 nM IM drei Wochen inkubiert. Es konnten insgesamt vier Gene isoliert werden:

Transcriptional regulating factor 1 (TRERF1), ein Transkriptionsfaktor,³⁰ der primär im Zusammenhang mit Steroidhormonsynthese^{31,32} und Tamoxifenresistenz bei Mammakarzinom beschrieben ist.^{101,102} Über die vermehrte Expression von p21 und p27 führt es zu einem Zellzyklusarrest am G1 - S Übergang.³³ Die Inhibition mit von BCR-ABL mit IM führt über die Zunahme von p27 zur Hemmung des Übergangs in die S-Phase.²⁹ Der Verlust von TRERF-1 und der so verringerten Expression von p27 und 21 könnte damit den Übergang in die S-Phase ermöglichen und den IM vermittelten Arrest aufheben. Eine erneute Transfektion von K562-wt mit drei verschiedenen sh-RNA Vektoren gegen TRERF-1 konnte den Resistenzeffekt und eine Zellzyklusbeeinflussung nicht konstant reproduzieren.

BCL2-like Protein 11 (Bim, Bcl-2 interacting mediator of cell death), ein Protein der Bcl-2 Familie, welches Apoptose regelt. Der Verlust von *BCL-2 like* ist *in vitro* als Resistenzmechanismus gegenüber IM beschrieben.^{24,58} Ebenso ist *in vivo* gezeigt worden, dass eine durch epigenetische Regulation verminderte Expression von *BIM* ein schlechteres Ansprechen von CML-Patienten auf IM verursachen kann.⁴⁸

Seizure-Related 6 Homolog (Mouse)-Like 2 (SEZ6L2) ist ein Oberflächenprotein, dessen Gen auf dem Chromosom 16p11.2 lokalisiert ist und von welchem angenommen wird, dass es Kandidatengene für Erkrankungen des autistischen Formenkreises (autism spectrum disorders [ASD]) beinhaltet. Einen direkten Hinweis für einen Zusammenhang von SEZ6L2 mit ASD gibt es jedoch nicht.^{3,56} In einer einzigen Arbeit wurde bei Maligno-

men der Lunge ein möglicher Zusammenhang zwischen erhöhter Expression von SEZ6L2 und Einfluss auf die Prognose beschrieben.⁴⁴ Ein Verbindung mit Leukämie oder CML konnte nach der aktuellen Literaturevidenz nicht hergestellt werden.

Homo sapiens Enhancer of Zeste Homolog 1 (Drosophila) (EZH1) ist ein Gen der Polycomb Gruppe (PcG). Proteine dieser Gruppe sind an der epigenetischen Regulation in der Embryonalentwicklung durch Methylierung des Histon H3 am Lysin-Rest 27 (H3K27) beteiligt.⁵⁹ Eine Resistenzvermittlung wäre hier über eine fehlende Repression zellzyklus-regulierender Gene denkbar. Dieser Zusammenhang ist für CML und EZH1 bislang nicht beschrieben worden. Entgegen der eigenen Hypothese zeigten Mochizuki-Kashio et al., dass die Inhibition des PRC2 Komplexes zu einer Reaktivierung von proapoptotischen Genen und somit zur Apoptose von K562 Zellen führen kann.⁶⁷ Eine andere Arbeit zeigt, dass der Verlust von EZH2 (und/oder PRAME) in K562 zu einer Reexpression von TRAIL und somit zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber IM führt.¹⁶ EZH1 wurde jedoch nicht eigens berücksichtigt. Vor dem Hintergrund, dass sich die Zielgene von EZH1 und 2 nur überlappen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten und Organen exprimiert werden, lässt dies keine eindeutige Schlussfolgerung zu.^{66,67,71,84,96} In der jüngeren Vergangenheit wurden EZH1 und EZH2 als therapeutischer Angriffspunkt bei Lymphomen und in der hämatopoetischen Stammzellentwicklung beschrieben.^{55,89}

Die Frage, ob es sich bei den gefundenen Genen tatsächlich um echte Hits oder nur zufällig verteilte Ereignisse handelt, lässt sich aufgrund der erhobenen Daten nicht abschließend klären. Für BCL-2 like Protein 11 ist tatsächlich ein Zusammenhang mit IM Resistenz beschrieben, was impliziert, dass es sich um ein richtig-positives Ergebnis handelt. Bei TRERF-1 und EZH1 bleibt es offen, da nach Literaturlage theoretisch ein Resistenzmechanismus zu konstruieren ist, welcher sich *in vitro* leider nicht rekonstruieren lässt. Für SEZ6L2 muss man bei fehlendem Zusammenhang mit onkogenen Eigenschaften, Zellzyklusregulation oder Apoptose in der Literatur von einem falsch positiven Ergebnis ausgehen.

Ausblick: Als möglicher Ausweg aus den Problemen der Resistenzentwicklung und Persistenz der CML bietet sich ein immunologischer Ansatz durch Kombination von IM und IFNa an. IFNa induziert verschiedene antileukämische Effekte: Reifung von Monozyten zu antigenpräsentierenden Zellen (APCs), T-Zell-Aktivierung und Verhinderung von Apoptose aktivierter T-Zellen.¹⁴ Weiterhin induziert es die Bildung von Leukämie spezifischen T-Zellen gegen ein Nonapeptid (PR-1) des leukämieassoziierte Antigen Proteinase 3 bei HLA-A0201 positiven Patienten (PR-1 spezifische T-Zellen).^{25,49,68,69} Durch diesen Effekt ist ein Absetzen von IM bei Kombinationstherapie bei persistierender Resterkrankung möglich, wie in einer eigenen Arbeit gezeigt werden konnte¹³ (vgl. Abb. 6.1).

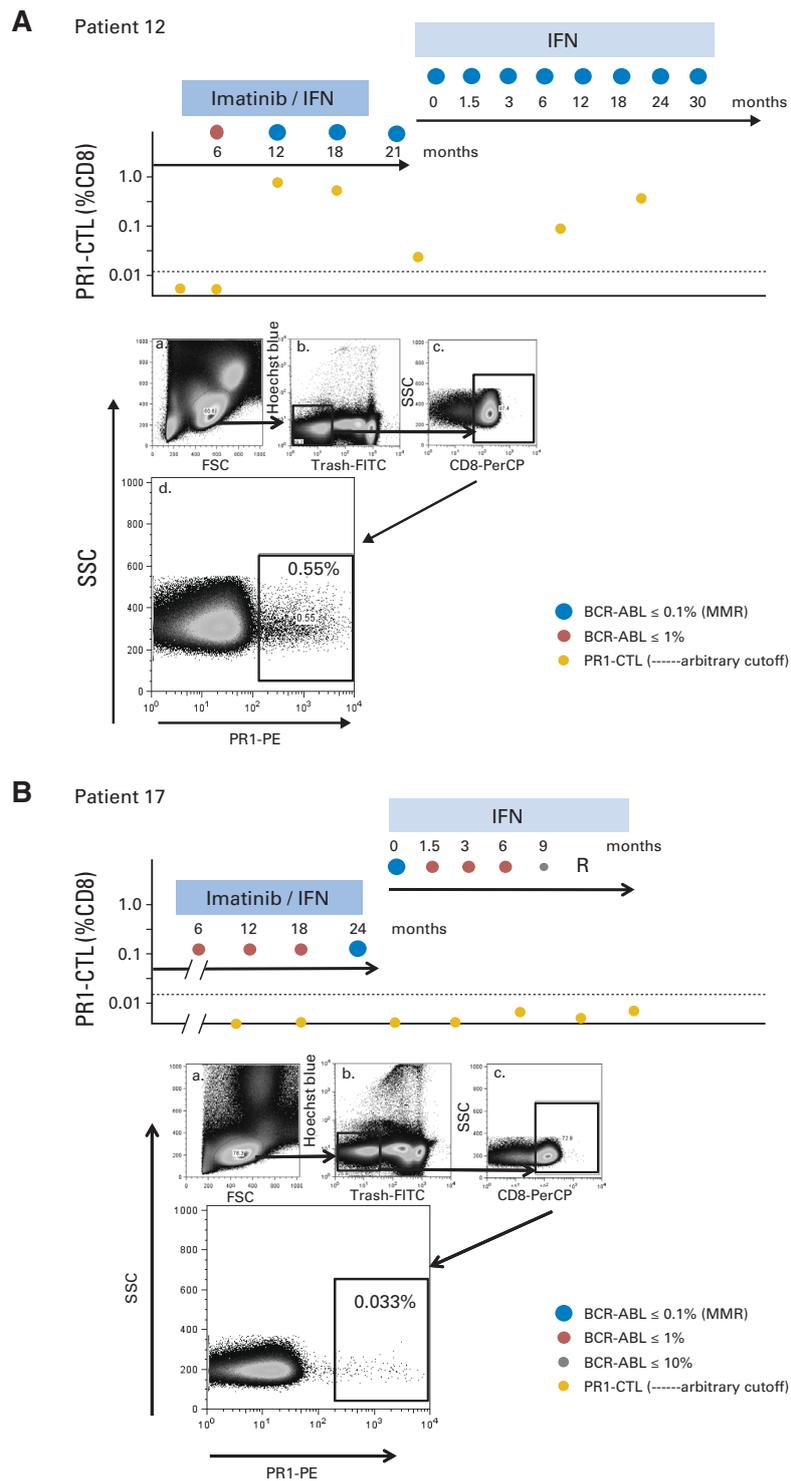


Abbildung 6.1: (A) Langzeitverlauf der PR1-spezifischen zytotoxischen T-Zellen (PR1-CTL) bei Patient 12. Die untere Abbildung zeigt die dreifache Gatingstrategie; (a) Forward scatter (FSC) Sideward scatter (SSC) auf mononukleäre Zellen, (b) Hoechst blue, CD4-, 19-, 56- fluorescein isothiocyanat (FITC), (c) CD8- PerCP auf CD8+ Zellen PR1-phycoerythrin (PE)-pentamer Bindung. (B) PR1-CTL und molekulares Ansprechen bei Patient 17, welcher auf IFN α keine Remission halten konnte.¹³

Literaturverzeichnis

- [1] G. P. Amarante-Mendes, C. Naekyung Kim, L. Liu, Y. Huang, C. L. Perkins, D. R. Green, and K. Bhalla. Bcr-abl exerts its antiapoptotic effect against diverse apoptotic stimuli through blockage of mitochondrial release of cytochrome c and activation of caspase-3. *Blood*, 91(5):1700–1705, Mar 1998.
- [2] Michele Baccarani, Giuseppe Saglio, John Goldman, Andreas Hochhaus, Bengt Simonsson, Frederick Appelbaum, Jane Apperley, Francisco Cervantes, Jorge Cortes, Michael Deininger, Alois Gratwohl, François Guilhot, Mary Horowitz, Timothy Hughes, Hagop Kantarjian, Richard Larson, Dietger Niederwieser, Richard Silver, Rudiger Hehlmann, and European LeukemiaNet. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the european leukemianet. *Blood*, 108(6):1809–1820, Sep 2006.
- [3] Jirair K Bedoyan, Ravinesh A Kumar, Jyotsna Sudi, Faye Silverstein, Todd Ackley, Ramaswamy K Iyer, Susan L Christian, and Donna M Martin. Duplication 16p11.2 in a child with infantile seizure disorder. *Am J Med Genet A*, 152A(6):1567–1574, Jun 2010.
- [4] Rafael Bejar, Kristen Stevenson, Omar Abdel-Wahab, Naomi Galili, Björn Nilsson, Guillermo Garcia-Manero, Hagop Kantarjian, Azra Raza, Ross L Levine, Donna Neuberg, and Benjamin L Ebert. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*, 364(26):2496–2506, Jun 2011.
- [5] Y. Ben-Neriah, G. Q. Daley, A. M. Mes-Masson, O. N. Witte, and D. Baltimore. The chronic myelogenous leukemia-specific p210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science*, 233(4760):212–214, Jul 1986.
- [6] J. H. Bennett. Case of hypertrophy of the spleen and liver in which death took place from suppuration of the blood. *Edinburgh Medical and Surgical Journal*, 64:413–423, 1845.
- [7] René Bernards, Thijn R Brummelkamp, and Roderick L Beijersbergen. shrna libraries and their use in cancer genetics. *Nat Methods*, 3(9):701–706, Sep 2006.

- [8] Katrien Berns, E. Marielle Hijmans, Jasper Mullenders, Thijn R Brummelkamp, Arno Velds, Mike Heimerikx, Ron M Kerkhoven, Mandy Madiredjo, Wouter Nijkamp, Britta Weigelt, Reuven Agami, Wei Ge, Guy Cavet, Peter S Linsley, Roderick L Beijersbergen, and René Bernards. A large-scale rnai screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature*, 428(6981):431–437, Mar 2004.
- [9] Katrien Berns, Hugo M Horlings, Bryan T Hennessy, Mandy Madiredjo, E. Marielle Hijmans, Karin Beelen, Sabine C Linn, Ana Maria Gonzalez-Angulo, Katherine Stemke-Hale, Michael Hauptmann, Roderick L Beijersbergen, Gordon B Mills, Marc J van de Vijver, and René Bernards. A functional genetic approach identifies the pi3k pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell*, 12(4):395–402, Oct 2007.
- [10] F. Bonifazi, A. de Vivo, G. Rosti, F. Guilhot, J. Guilhot, E. Trabacchi, R. Hehlmann, A. Hochhaus, P. C. Shepherd, J. L. Steegmann, H. C. Kluin-Nelemans, J. Thaler, B. Simonsson, A. Louwagie, J. Reiffers, F. X. Mahon, E. Montefusco, G. Alimena, J. Hasford, S. Richards, G. Saglio, N. Testoni, G. Martinelli, S. Tura, M. Baccarani, European Study Group on Interferon in Chronic Myeloid Leukemia, Italian Cooperative Study Group on CML, France Intergroup of CML, German CML Study Group, U. K. Medical Research Council Working Party on CML, Spanish CML Study Group, Australian CML Study Group, and Swedish CML Study Group. Chronic myeloid leukemia and interferon-alpha: a study of complete cytogenetic responders. *Blood*, 98(10):3074–3081, Nov 2001.
- [11] Thijn R Brummelkamp, René Bernards, and Reuven Agami. A system for stable expression of short interfering rnas in mammalian cells. *Science*, 296(5567):550–553, Apr 2002.
- [12] A. Burchert and A. Neubauer. [chronic myeloid leukemia. diagnostics, therapy and future strategy]. *Internist (Berl)*, 52(3):283–93; quiz 294–5, Mar 2011.
- [13] Andreas Burchert, Martin C Müller, Philippe Kostrewa, Philipp Erben, Tilman Bostel, Simone Liebler, Rüdiger Hehlmann, Andreas Neubauer, and Andreas Hochhaus. Sustained molecular response with interferon alfa maintenance after induction therapy with imatinib plus interferon alfa in patients with chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol*, 28(8):1429–1435, Mar 2010.
- [14] Andreas Burchert and Andreas Neubauer. Interferon alpha and t-cell responses in chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*, 46(2):167–175, Feb 2005.

- [15] Daniel R Caffrey, Juan Zhao, Zhili Song, Michael E Schaffer, Steven A Haney, Romesh R Subramanian, Albert B Seymour, and Jason D Hughes. sirna off-target effects can be reduced at concentrations that match their individual potency. *PLoS One*, 6(7):e21503, 2011.
- [16] D. D. De Carvalho, R. Binato, W. O. Pereira, J. M G Leroy, M. D. Colassanti, R. Proto-Siqueira, A. E B Bueno-Da-Silva, M. A. Zago, M. A. Zanichelli, E. Abdelhay, F. A. Castro, J. F. Jacysyn, and G. P. Amarante-Mendes. Bcr-abl-mediated upregulation of prame is responsible for knocking down trail in cml patients. *Oncogene*, 30(2):223–233, Jan 2011.
- [17] Geraldo Barroso Cavalcanti, Flavia da Cunha Vasconcelos, Giselle Pinto de Faria, Marcos Antônio Maurício Scheiner, Jane de Almeida Dobbin, Claudete Esteves Klumb, and Raquel C Maia. Coexpression of p53 protein and mdr functional phenotype in leukemias: the predominant association in chronic myeloid leukemia. *Cytometry B Clin Cytom*, 61(1):1–8, Sep 2004.
- [18] Mhairi Copland, Ashley Hamilton, Lucy J Elrick, Janet W Baird, Elaine K Allan, Niove Jordanides, Martin Barow, Joanne C Mountford, and Tessa L Holyoake. Dasatinib (bms-354825) targets an earlier progenitor population than imatinib in primary cml but does not eliminate the quiescent fraction. *Blood*, 107(11):4532–4539, Jun 2006.
- [19] Amie S Corbin, Anupriya Agarwal, Marc Loriaux, Jorge Cortes, Michael W Deininger, and Brian J Druker. Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of bcr-abl activity. *J Clin Invest*, 121(1):396–409, Jan 2011.
- [20] D. Cortez, G. Reuther, and A. M. Pendergast. The bcr-abl tyrosine kinase activates mitogenic signaling pathways and stimulates g1-to-s phase transition in hematopoietic cells. *Oncogene*, 15(19):2333–2342, Nov 1997.
- [21] D. Craigie. Case of disease of the spleen in which death took place from suppuration of the blood. *Edinburgh Medical and Surgical Journal*, 64:400–412, 1845.
- [22] B. J. Druker, S. Tamura, E. Buchdunger, S. Ohno, G. M. Segal, S. Fanning, J. Zimmermann, and N. B. Lydon. Effects of a selective inhibitor of the abl tyrosine kinase on the growth of bcr-abl positive cells. *Nat Med*, 2(5):561–566, May 1996.
- [23] Brian J Druker, François Guilhot, Stephen G O'Brien, Insa Gathmann, Hagop Kantarjian, Norbert Gattermann, Michael W N Deininger, Richard T Silver, John M

- Goldman, Richard M Stone, Francisco Cervantes, Andreas Hochhaus, Bayard L Powell, Janice L Gabilove, Philippe Rousselot, Josy Reiffers, Jan J Cornelissen, Timothy Hughes, Hermine Agis, Thomas Fischer, Gregor Verhoef, John Shepherd, Giuseppe Saglio, Alois Gratwohl, Johan L Nielsen, Jerald P Radich, Bengt Simonsson, Kerry Taylor, Michele Baccarani, Charlene So, Laurie Letvak, Richard A Larson, and I. R. I. S. Investigators. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 355(23):2408–2417, Dec 2006.
- [24] Abdelkader Essafi, Silvia Fernández de Mattos, Yasmin A M Hassen, Inês Soeiro, Ghulam J Mufti, N. Shaun B Thomas, René H Medema, and Eric W-F Lam. Direct transcriptional regulation of bim by foxo3a mediates sti571-induced apoptosis in bcr-abl-expressing cells. *Oncogene*, 24(14):2317–2329, Mar 2005.
- [25] Marieke A G Essers, Sandra Offner, William E Blanco-Bose, Zoe Waibler, Ulrich Kalinke, Michel A Duchosal, and Andreas Trumpp. Ifn α activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. *Nature*, 458(7240):904–908, Apr 2009.
- [26] S. Faderl, M. Talpaz, Z. Estrov, S. O'Brien, R. Kurzrock, and H. M. Kantarjian. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 341(3):164–172, Jul 1999.
- [27] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and C. C. Mello. Potent and specific genetic interference by double-stranded rna in caenorhabditis elegans. *Nature*, 391(6669):806–811, Feb 1998.
- [28] R. P. Gale, R. Hehlmann, M. J. Zhang, J. Hasford, J. M. Goldman, H. Heimpel, A. Hochhaus, J. P. Klein, H. J. Kolb, P. B. McGlave, J. R. Passweg, P. A. Rowlings, K. A. Sobocinski, and M. M. Horowitz. Survival with bone marrow transplantation versus hydroxyurea or interferon for chronic myelogenous leukemia. the german cml study group. *Blood*, 91(5):1810–1819, Mar 1998.
- [29] F. Gesbert, W. R. Sellers, S. Signoretti, M. Loda, and J. D. Griffin. Bcr/abl regulates expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 through the phosphatidylinositol 3-kinase/akt pathway. *J Biol Chem*, 275(50):39223–39230, Dec 2000.
- [30] F. Gizard, B. Lavallée, F. DeWitte, and D. W. Hum. A novel zinc finger protein trep-132 interacts with cbp/p300 to regulate human cyp11a1 gene expression. *J Biol Chem*, 276(36):33881–33892, Sep 2001.

- [31] F. Gizard, E. Teissier, I. Dufort, G. Luc, V. Luu-The, B. Staels, and D. W. Hum. The transcriptional regulating protein of 132 kda (trep-132) differentially influences steroidogenic pathways in human adrenal nci-h295 cells. *J Mol Endocrinol*, 32(2):557–569, Apr 2004.
- [32] Florence Gizard, Bernard Lavallee, Frederique DeWitte, Elisabeth Teissier, Bart Staels, and Dean W Hum. The transcriptional regulating protein of 132 kda (trep-132) enhances p450scc gene transcription through interaction with steroidogenic factor-1 in human adrenal cells. *J Biol Chem*, 277(42):39144–39155, Oct 2002.
- [33] Florence Gizard, Romain Robillard, Olivier Barbier, Brigitte Quatannens, Anne Faucompré, Françoise Révillion, Jean-Philippe Peyrat, Bart Staels, and Dean W Hum. Trep-132 controls cell proliferation by regulating the expression of the cyclin-dependent kinase inhibitors p21waf1/cip1 and p27kip1. *Mol Cell Biol*, 25(11):4335–4348, Jun 2005.
- [34] A. Goga, J. McLaughlin, D. E. Afar, D. C. Saffran, and O. N. Witte. Alternative signals to ras for hematopoietic transformation by the bcr-abl oncogene. *Cell*, 82(6):981–988, Sep 1995.
- [35] M. E. Gorre, M. Mohammed, K. Ellwood, N. Hsu, R. Paquette, P. N. Rao, and C. L. Sawyers. Clinical resistance to sti-571 cancer therapy caused by bcr-abl gene mutation or amplification. *Science*, 293(5531):876–880, Aug 2001.
- [36] Susan M Graham, Heather G J, Elaine Allan, Charlie Pearson, Michael J Alcorn, Linda Richmond, and Tessa L Holyoake. Primitive, quiescent, philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to sti571 in vitro. *Blood*, 99(1):319–325, Jan 2002.
- [37] François Guilhot, Brian Druker, Richard A Larson, Insa Gathmann, Charlene So, Roger Waltzman, and Stephen G O'Brien. High rates of durable response are achieved with imatinib after treatment with interferon alpha plus cytarabine: results from the international randomized study of interferon and sti571 (iris) trial. *Haematologica*, Jul 2009.
- [38] J. Hald, T. Galbo, C. Rescan, L. Radzikowski, A. E. Sprinkel, H. Heimberg, J. Ahnfelt-Rønne, J. Jensen, R. Scharfmann, G. Gradwohl, K. H. Kaestner, C. Stoeckert, J. N. Jensen, and O. D. Madsen. Pancreatic islet and progenitor cell surface markers with cell sorting potential. *Diabetologia*, 55(1):154–165, Jan 2012.
- [39] R. Hehlmann, H. Heimpel, J. Hasford, H. J. Kolb, H. Pralle, D. K. Hossfeld, W. Queisser, H. Löffler, A. Hochhaus, and B. Heinze. Randomized comparison of

interferon-alpha with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. the german cml study group. *Blood*, 84(12):4064–4077, Dec 1994.

- [40] R. diger Hehlmann. How i treat cml blast crisis. *Blood*, 120(4):737–747, Jul 2012.
- [41] A. Hochhaus, S. G. O'Brien, F. Guilhot, B. J. Druker, S. Branford, L. Foroni, J. M. Goldman, M. C. Müller, J. P. Radich, M. Rudoltz, M. Mone, I. Gathmann, T. P. Hughes, R. A. Larson, and I. R. I. S. Investigators. Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 23(6):1054–1061, Jun 2009.
- [42] M. S. Holtz, S. J. Forman, and R. Bhatia. Nonproliferating cml cd34+ progenitors are resistant to apoptosis induced by a wide range of proapoptotic stimuli. *Leukemia*, 19(6):1034–1041, Jun 2005.
- [43] G. Hutvágner, J. McLachlan, A. E. Pasquinelli, E. Bálint, T. Tuschl, and P. D. Zamore. A cellular function for the rna-interference enzyme dicer in the maturation of the let-7 small temporal rna. *Science*, 293(5531):834–838, Aug 2001.
- [44] Nobuhisa Ishikawa, Yataro Daigo, Atsushi Takano, Masaya Taniwaki, Tatsuya Kato, Sonosuke Tanaka, Wataru Yasui, Yukio Takeshima, Kouki Inai, Hitoshi Nishimura, Eiju Tsuchiya, Nobuoki Kohno, and Yusuke Nakamura. Characterization of sez6l2 cell-surface protein as a novel prognostic marker for lung cancer. *Cancer Sci*, 97(8):737–745, Aug 2006.
- [45] Aimee L Jackson, Steven R Bartz, Janell Schelter, Sumire V Kobayashi, Julja Burchard, Mao Mao, Bin Li, Guy Cavet, and Peter S Linsley. Expression profiling reveals off-target gene regulation by rna. *Nat Biotechnol*, 21(6):635–637, Jun 2003.
- [46] Aimee L Jackson and Peter S Linsley. Recognizing and avoiding sirna off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat Rev Drug Discov*, 9(1):57–67, Jan 2010.
- [47] T. Jonuleit, C. Peschel, R. Schwab, H. van der Kuip, E. Buchdunger, T. Fischer, C. Huber, and W. E. Aulitzky. Bcr-abl kinase promotes cell cycle entry of primary myeloid cml cells in the absence of growth factors. *Br J Haematol*, 100(2):295–303, Feb 1998.
- [48] Edurne San José-Eneriz, Xabier Agirre, Antonio Jiménez-Velasco, Lucia Cordeu, Vanesa Martín, Victor Arqueros, Leire Gárate, Vicente Fresquet, Francisco Cervantes, José A Martínez-Climent, Anabel Heiniger, Antonio Torres, Felipe Prósper,

- and Jose Roman-Gomez. Epigenetic down-regulation of bim expression is associated with reduced optimal responses to imatinib treatment in chronic myeloid leukaemia. *Eur J Cancer*, 45(10):1877–1889, Jul 2009.
- [49] Shreya Kanodia, Eric Wieder, Sijie Lu, Moshe Talpaz, Gheath Alatrash, Karen Clise-Dwyer, and Jeffrey J Molldrem. Pr1-specific t cells are associated with unmaintained cytogenetic remission of chronic myelogenous leukemia after interferon withdrawal. *PLoS One*, 5(7):e11770, 2010.
- [50] Hagop Kantarjian, Francis Giles, Lydia Wunderle, Kapil Bhalla, Susan O'Brien, Barbara Wassmann, Chiaki Tanaka, Paul Manley, Patricia Rae, William Mietlowski, Kathy Bochinski, Andreas Hochhaus, James D Griffin, Dieter Hoelzer, Maher Albitar, Margaret Dugan, Jorge Cortes, Leila Alland, and Oliver G Ottmann. Nilotinib in imatinib-resistant cml and philadelphia chromosome-positive all. *N Engl J Med*, 354(24):2542–2551, Jun 2006.
- [51] Hagop M Kantarjian, Susan O'Brien, Jorge E Cortes, Jianqin Shan, Francis J Giles, Mary Beth Rios, Stefan H Faderl, William G Wierda, Alessandra Ferrajoli, Srdan Verstovsek, Michael J Keating, Emil J Freireich, and Moshe Talpaz. Complete cytogenetic and molecular responses to interferon-alpha-based therapy for chronic myelogenous leukemia are associated with excellent long-term prognosis. *Cancer*, 97(4):1033–1041, Feb 2003.
- [52] Anastasia Khvorova, Angela Reynolds, and Sumedha D Jayasena. Functional sirnas and mirnas exhibit strand bias. *Cell*, 115(2):209–216, Oct 2003.
- [53] Natalia L Komarova and Dominik Wodarz. Effect of cellular quiescence on the success of targeted cml therapy. *PLoS One*, 2(10):e990, 2007.
- [54] H. Konig, M. Holtz, H. Modi, P. Manley, T. L. Holyoake, S. J. Forman, and R. Bhatia. Enhanced bcr-abl kinase inhibition does not result in increased inhibition of downstream signaling pathways or increased growth suppression in cml progenitors. *Leukemia*, 22(4):748–755, Apr 2008.
- [55] Kyle D Konze, Anqi Ma, Fengling Li, Dalia Barsyte-Lovejoy, Trevor Parton, Christopher J Macnevin, Feng Liu, Cen Gao, Xi-Ping Huang, Ekaterina Kuznetsova, Marie Rougie, Alice Jiang, Samantha G Pattenden, Jacqueline L Norris, Lindsey I James, Bryan L Roth, Peter J Brown, Stephen V Frye, Cheryl H Arrowsmith, Klaus M Hahn, Gang Greg Wang, Masoud Vedadi, and Jian Jin. An orally bioavailable chemical probe of the lysine methyltransferases ezh2 and ezh1. *ACS Chem Biol*, Apr 2013.

- [56] Ravinesh A Kumar, Christian R Marshall, Judith A Badner, Timothy D Babatz, Zohar Mukamel, Kimberly A Aldinger, Jyotsna Sudi, Camille W Brune, Gerald Goh, Samer Karamohamed, James S Sutcliffe, Edwin H Cook, Daniel H Geschwind, William B Dobyns, Stephen W Scherer, and Susan L Christian. Association and mutation analyses of 16p11.2 autism candidate genes. *PLoS One*, 4(2):e4582, 2009.
- [57] Ashu Kumari, Cornelia Brendel, Andreas Hochhaus, Andreas Neubauer, and Andreas Burchert. Low bcr-abl expression levels in hematopoietic precursor cells enable persistence of chronic myeloid leukemia under imatinib. *Blood*, 119(2):530–539, Jan 2012.
- [58] Junya Kuroda, Hamsa Puthalakath, Mark S Cragg, Priscilla N Kelly, Philippe Bouillet, David C S Huang, Shinya Kimura, Oliver G Ottmann, Brian J Druker, Andreas Villunger, Andrew W Roberts, and Andreas Strasser. Bim and bad mediate imatinib-induced killing of bcr/abl+ leukemic cells, and resistance due to their loss is overcome by a bh3 mimetic. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(40):14907–14912, Oct 2006.
- [59] G. Laible, A. Wolf, R. Dorn, G. Reuter, C. Nislow, A. Lebersorger, D. Popkin, L. Pillus, and T. Jenuwein. Mammalian homologues of the polycomb-group gene enhancer of zeste mediate gene silencing in drosophila heterochromatin and at s. cerevisiae telomeres. *EMBO J*, 16(11):3219–3232, Jun 1997.
- [60] P. le Coutre, E. Tassi, M. Varella-Garcia, R. Barni, L. Mologni, G. Cabrita, E. Marchesi, R. Supino, and C. Gambacorti-Passerini. Induction of resistance to the abelsson inhibitor sti571 in human leukemic cells through gene amplification. *Blood*, 95(5):1758–1766, Mar 2000.
- [61] R. C. Lee, R. L. Feinbaum, and V. Ambros. The c. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small rnas with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, 75(5):843–854, Dec 1993.
- [62] Louis J Lombardo, Francis Y Lee, Ping Chen, Derek Norris, Joel C Barrish, Kamelia Behnia, Stephen Castaneda, Lyndon A M Cornelius, Jagabandhu Das, Arthur M Doweyko, Craig Fairchild, John T Hunt, Ivan Inigo, Kathy Johnston, Amrita Kamath, David Kan, Herbert Klei, Punit Marathe, Suhong Pang, Russell Peterson, Sidney Pitt, Gary L Schieven, Robert J Schmidt, John Tokarski, Mei-Li Wen, John Wityak, and Robert M Borzilleri. Discovery of n-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-

- ylamino)thiazole-5-carboxamide (bms-354825), a dual src/abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J Med Chem*, 47(27):6658–6661, Dec 2004.
- [63] T. G. Lugo, A. M. Pendergast, A. J. Muller, and O. N. Witte. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science*, 247(4946):1079–1082, Mar 1990.
- [64] Ian J MacRae, Kaihong Zhou, and Jennifer A Doudna. Structural determinants of rna recognition and cleavage by dicer. *Nat Struct Mol Biol*, 14(10):934–940, Oct 2007.
- [65] F. X. Mahon, M. W. Deininger, B. Schultheis, J. Chabrol, J. Reiffers, J. M. Goldman, and J. V. Melo. Selection and characterization of bcr-abl positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor sti571: diverse mechanisms of resistance. *Blood*, 96(3):1070–1079, Aug 2000.
- [66] Raphael Margueron, Guohong Li, Kavitha Sarma, Alexandre Blais, Jiri Zavadil, Christopher L Woodcock, Brian D Dynlacht, and Danny Reinberg. Ezh1 and ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. *Mol Cell*, 32(4):503–518, Nov 2008.
- [67] Makiko Mochizuki-Kashio, Yuta Mishima, Satoru Miyagi, Masamitsu Negishi, Atsunori Saraya, Takaaki Konuma, Jun Shinga, Haruhiko Koseki, and Atsushi Iwama. Dependency on the polycomb gene ezh2 distinguishes fetal from adult hematopoietic stem cells. *Blood*, Oct 2011.
- [68] J. J. Molldrem, P. P. Lee, C. Wang, R. E. Champlin, and M. M. Davis. A pr1-human leukocyte antigen-a2 tetramer can be used to isolate low-frequency cytotoxic t lymphocytes from healthy donors that selectively lyse chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res*, 59(11):2675–2681, Jun 1999.
- [69] J. J. Molldrem, P. P. Lee, C. Wang, K. Felio, H. M. Kantarjian, R. E. Champlin, and M. M. Davis. Evidence that specific t lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. *Nat Med*, 6(9):1018–1023, Sep 2000.
- [70] W. C. Moloney. Radiogenic leukemia revisited. *Blood*, 70(4):905–908, Oct 1987.
- [71] Kambiz Mousavi, Hossein Zare, A. Hongjun Wang, and Vittorio Sartorelli. Polycomb protein ezh1 promotes rna polymerase ii elongation. *Mol Cell*, 45(2):255–262, Jan 2012.

- [72] M. Nieborowska-Skorska, M. A. Wasik, A. Slupianek, P. Salomoni, T. Kitamura, B. Calabretta, and T. Skorski. Signal transducer and activator of transcription (stat)5 activation by bcr/abl is dependent on intact src homology (sh)3 and sh2 domains of bcr/abl and is required for leukemogenesis. *J Exp Med*, 189(8):1229–1242, Apr 1999.
- [73] D.A. Nowell, P. & Hungerford. A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science*, 132:1497, 1960.
- [74] Stephen G O'Brien, François Guilhot, Richard A Larson, Insa Gathmann, Michelle Baccarani, Francisco Cervantes, Jan J Cornelissen, Thomas Fischer, Andreas Hochhaus, Timothy Hughes, Klaus Lechner, Johan L Nielsen, Philippe Rousset, Josy Reiffers, Giuseppe Saglio, John Shepherd, Bengt Simonsson, Alois Gratwohl, John M Goldman, Hagop Kantarjian, Kerry Taylor, Gregor Verhoef, Ann E Bolton, Renaud Capdeville, Brian J Druker, and I. R. I. S. Investigators. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 348(11):994–1004, Mar 2003.
- [75] L. O'Connor, A. Strasser, L. A. O'Reilly, G. Hausmann, J. M. Adams, S. Cory, and D. C. Huang. Bim: a novel member of the bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J*, 17(2):384–395, Jan 1998.
- [76] Diego Pasini, Adrian P Bracken, and Kristian Helin. Polycomb group proteins in cell cycle progression and cancer. *Cell Cycle*, 3(4):396–400, Apr 2004.
- [77] A. M. Pendergast, L. A. Quilliam, L. D. Cripe, C. H. Bassing, Z. Dai, N. Li, A. Batzer, K. M. Rabun, C. J. Der, and J. Schlessinger. Bcr-abl-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the sh2 domain of the grb-2 adaptor protein. *Cell*, 75(1):175–185, Oct 1993.
- [78] John W Pham and Erik J Sontheimer. Molecular requirements for rna-induced silencing complex assembly in the drosophila rna interference pathway. *J Biol Chem*, 280(47):39278–39283, Nov 2005.
- [79] Claude Preudhomme, Joëlle Guilhot, Franck Emmanuel Nicolini, Agnès Guerci-Bresler, Françoise Rigal-Huguet, Frederic Maloisel, Valérie Coiteux, Martine Gardembas, Christian Berthou, Anne Vekhoff, Delphine Rea, Eric Jourdan, Christian Allard, Alain Delmer, Philippe Rousset, Laurence Legros, Marc Berger, Selim Corm, Gabriel Etienne, Catherine Roche-Lestienne, Virginie Eclache, François-Xavier Mahon, François Guilhot, S. P. I. R. I. T. Investigators, and France Intergroupe des Leucémies Myéloïdes Chroniques (Fi-LMC). Imatinib plus pegin-

- terferon alfa-2a in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 363(26):2511–2521, Dec 2010.
- [80] L. Puil, J. Liu, G. Gish, G. Mbamalu, D. Bowtell, P. G. Pelicci, R. Arlinghaus, and T. Pawson. Bcr-abl oncoproteins bind directly to activators of the ras signalling pathway. *EMBO J*, 13(4):764–773, Feb 1994.
- [81] Alfonso Quintas-Cardama, Hagop M Kantarjian, and Jorge E Cortes. Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer Control*, 16(2):122–131, Apr 2009.
- [82] Pablo Ramirez and John F DiPersio. Therapy options in imatinib failures. *Oncologist*, 13(4):424–434, Apr 2008.
- [83] Ruibao Ren. Mechanisms of bcr-abl in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer*, 5(3):172–183, Mar 2005.
- [84] Eva Madi Riising and Kristian Helin. A new role for the polycomb group protein ezh1 in promoting transcription. *Mol Cell*, 45(2):145–146, Jan 2012.
- [85] J. D. Rowley. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining. *Nature*, 243(5405):290–293, Jun 1973.
- [86] Martin Sattler, M. Golam Mohi, Yuri B Pride, Laura R Quinnan, Nicole A Malouf, Klaus Podar, Franck Gesbert, Hiromi Iwasaki, Shaoguang Li, Richard A Van Etten, Haihua Gu, James D Griffin, and Benjamin G Neel. Critical role for gab2 in transformation by bcr/abl. *Cancer Cell*, 1(5):479–492, Jun 2002.
- [87] D. G. Savage, R. M. Szydlo, and J. M. Goldman. Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral centre over a 16-year period. *Br J Haematol*, 96(1):111–116, Jan 1997.
- [88] C. L. Sawyers, J. McLaughlin, and O. N. Witte. Genetic requirement for ras in the transformation of fibroblasts and hematopoietic cells by the bcr-abl oncogene. *J Exp Med*, 181(1):307–313, Jan 1995.
- [89] Angelique Schnerch, Jung Bok Lee, Monica Graham, Borhane Guezguez, and Mickie Bhatia. Human embryonic stem cell-derived hematopoietic cells maintain core epigenetic machinery of the polycomb group/trithorax group complexes distinctly from functional adult hematopoietic stem cells. *Stem Cells Dev*, 22(1):73–89, Jan 2013.

- [90] Dianne S Schwarz, György Hutvágner, Tingting Du, Zuoshang Xu, Neil Aronin, and Phillip D Zamore. Asymmetry in the assembly of the rnai enzyme complex. *Cell*, 115(2):199–208, Oct 2003.
- [91] Neil P Shah, Chris Tran, Francis Y Lee, Ping Chen, Derek Norris, and Charles L Sawyers. Overriding imatinib resistance with a novel abl kinase inhibitor. *Science*, 305(5682):399–401, Jul 2004.
- [92] Xiaohua Shen, Yingchun Liu, Yu-Jung Hsu, Yuko Fujiwara, Jonghwan Kim, Xiaohong Mao, Guo-Cheng Yuan, and Stuart H Orkin. Ezh1 mediates methylation on histone h3 lysine 27 and complements ezh2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency. *Mol Cell*, 32(4):491–502, Nov 2008.
- [93] Frederic D Sigoillot and Randall W King. Vigilance and validation: Keys to success in rnai screening. *ACS Chem Biol*, 6(1):47–60, Jan 2011.
- [94] Saurabh Singh, Ajit S Narang, and Ram I Mahato. Subcellular fate and off-target effects of sirna, shrna, and mirna. *Pharm Res*, Oct 2011.
- [95] T. Skorski, M. Nieborowska-Skorska, C. Szczylik, P. Kanakaraj, D. Perrotti, G. Zon, A. Gewirtz, B. Perussia, and B. Calabretta. C-raf-1 serine/threonine kinase is required in bcr/abl-dependent and normal hematopoiesis. *Cancer Res*, 55(11):2275–2278, Jun 1995.
- [96] Lovorka Stojic, Zuzana Jasencakova, Carolina Prezioso, Alexandra St,tzer, Beatrice Bodega, Diego Pasini, Rebecca Klingberg, Chiara Mozzetta, Raphael Margueron, Pier Lorenzo Puri, Dirk Schwarzer, Kristian Helin, Wolfgang Fischle, and Valerio Orlando. Chromatin regulated interchange between polycomb repressive complex 2 (prc2)-ezh2 and prc2-ezh1 complexes controls myogenin activation in skeletal muscle cells. *Epigenetics Chromatin*, 4:16, 2011.
- [97] Andrew I Su, Tim Wiltshire, Serge Batalov, Hilmar Lapp, Keith A Ching, David Block, Jie Zhang, Richard Soden, Mimi Hayakawa, Gabriel Kreiman, Michael P Cooke, John R Walker, and John B Hogenesch. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(16):6062–6067, Apr 2004.
- [98] M. Talpaz, K. B. McCredie, G. M. Mavligit, and J. U. Gutterman. Leukocyte interferon-induced myeloid cytoreduction in chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 62(3):689–692, Sep 1983.

- [99] Moshe Talpaz, Neil P Shah, Hagop Kantarjian, Nicholas Donato, John Nicoll, Ron Paquette, Jorge Cortes, Susan O'Brien, Claude Nicaise, Eric Bleickardt, M. Anne Blackwood-Chirchir, Vishwanath Iyer, Tai-Tsang Chen, Fei Huang, Arthur P Decillis, and Charles L Sawyers. Dasatinib in imatinib-resistant philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med*, 354(24):2531–2541, Jun 2006.
- [100] John S Tokarski, John A Newitt, Chieh Ying J Chang, Janet D Cheng, Michael Wittekind, Susan E Kiefer, Kevin Kish, Francis Y F Lee, Robert Borzilleri, Louis J Lombardo, Dianlin Xie, Yaqun Zhang, and Herbert E Klei. The structure of dasatinib (bms-354825) bound to activated abl kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant abl mutants. *Cancer Res*, 66(11):5790–5797, Jun 2006.
- [101] Ton van Agthoven, Anieta M Sieuwerts, Marion E Meijer van Gelder, Maxime P Look, Marcel Smid, Jos Veldscholte, Stefan Sleijfer, John A Foekens, and Lambert C J Dorssers. Relevance of breast cancer antiestrogen resistance genes in human breast cancer progression and tamoxifen resistance. *J Clin Oncol*, 27(4):542–549, Feb 2009.
- [102] Ton van Agthoven, Jos Veldscholte, Marcel Smid, Thecla L A van Agthoven, Lilian Vreede, Marieke Broertjes, Ingrid de Vries, Danielle de Jong, Roya Sarwari, and Lambert C J Dorssers. Functional identification of genes causing estrogen independence of human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 114(1):23–30, Mar 2009.
- [103] James W Vardiman, Nancy Lee Harris, and Richard D Brunning. The world health organization (who) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*, 100(7):2292–2302, Oct 2002.
- [104] Robert Virchow. Weisses blut. *Frorieps Notizen*, 36:151–156, 1845.
- [105] Nikolas von Bubnoff, Simone Barwisch, Michael R Speicher, Christian Peschel, and Justus Duyster. A cell-based screening strategy that predicts mutations in oncogenic tyrosine kinases: implications for clinical resistance in targeted cancer treatment. *Cell Cycle*, 4(3):400–406, Mar 2005.
- [106] Nikolas von Bubnoff, Darren R Veach, Heiko van der Kuip, Walter E Aulitzky, Jana Sänger, Petra Seipel, William G Bornmann, Christian Peschel, Bayard Clarkson, and Justus Duyster. A cell-based screen for resistance of bcr-abl-positive leukemia identifies the mutation pattern for pd166326, an alternative abl kinase inhibitor. *Blood*, 105(4):1652–1659, Feb 2005.

- [107] Ying Wang, Dali Cai, Cornelia Brendel, Christine Baret, Philipp Erben, Paul W Manley, Andreas Hochhaus, Andreas Neubauer, and Andreas Burchert. Adaptive secretion of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (gm-csf) mediates imatinib and nilotinib resistance in bcr/abl+ progenitors via jak-2/stat-5 pathway activation. *Blood*, 109(5):2147–2155, Mar 2007.
- [108] E. Weisberg, P. Manley, J. Mestan, S. Cowan-Jacob, A. Ray, and J. D. Griffin. Amn107 (nilotinib): a novel and selective inhibitor of bcr-abl. *Br J Cancer*, 94(12):1765–1769, Jun 2006.
- [109] Ellen Weisberg, Paul W Manley, Werner Breitenstein, Josef Bruggen, Sandra W Cowan-Jacob, Arghya Ray, Brian Huntly, Dorian Fabbro, Gabriele Fendrich, Elizabeth Hall-Meyers, Andrew L Kung, Jürgen Mestan, George Q Daley, Linda Callahan, Laurie Catley, Cara Cavazza, Mohammad Azam, Azam Mohammed, Donna Neuberger, Renee D Wright, D. Gary Gilliland, and James D Griffin. Characterization of amn107, a selective inhibitor of native and mutant bcr-abl. *Cancer Cell*, 7(2):129–141, Feb 2005.

Kapitel 7

Liste akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren:

Prof. Dr. med. Bartsch
Prof. Dr. med. Gress
Prof. Dr. med. Hoyer
Prof. Dr. med. Lohoff
Prof. Dr. med. Maisch
Prof. Dr. med. Moll
Prof. Dr. med. Moosdorf
Prof. Dr. med. Neubauer
Prof. Dr. med. Renz
Prof. Dr. med. Ruchholtz
Prof. Dr. med. Vogelmeier
Prof. Dr. med. Werner

Kapitel 8

Danksagungen

Mein Dank gilt allen Menschen, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit behilflich gewesen sind. An erster Stelle möchte ich mich bei Andreas Burchert für gute Betreuung, Anleitung und die unendliche Geduld bedanken. Ebenso möchte ich Prof. Dr. Martin Eilers dafür danken, dass er die NKI-Library zur Verfügung gestellt hat, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Besonderer Dank gilt auch den vielen Mitarbeitern der hämatologischen Forschungslabore, allen voran Ludmilla Sytik, für die hervorragende Einarbeitung, Anleitung und technische Hilfestellung. Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Neubauer und seiner Arbeitsgruppe, Sabine Teichler, Petra Roth, Kathleen Stabla, Sonja Tajstra, Torsten Volkmann und Sabrina Inselmann für den Beistand in technischen Fragen bedanken. Dank gilt auch meinen Eltern und Gertrude, die mich in der langen Zeit moralisch unterstützt haben.