

**Molekular- und zellbiologische
Untersuchungen
zur effektiven Suppression
des onkogenen Fusionsproteins
BCR-Abl**

**Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.**

genehmigte Dissertation

**von Dipl.-Biochem. Diana Steinmann
geboren am 12.05.1975 in Freiberg**

2004

1. Referent: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Alves
2. Referent: Prof. Dr. rer. nat. Walter Müller

Tag der Promotion : 30. Juli 2004

Nimm Dir Zeit...

*Nimm Dir Zeit, um zu arbeiten,
es ist der Preis des Erfolgs.*

*Nimm Dir Zeit, um nachzudenken,
es ist die Quelle der Kraft.*

*Nimm Dir Zeit, um zu spielen,
es ist das Geheimnis der Jugend.*

*Nimm Dir Zeit, um freundlich zu sein,
es ist das Tor zum Glücklichein.*

*Nimm Dir Zeit, um zu träumen,
es ist der Weg zu den Sternen.*

*Nimm Dir Zeit, um zu lieben,
es ist die wahre Lebensfreude.*

*Nimm Dir Zeit, um froh zu sein,
es ist die Musik der Seele.“*

(Irische Weisheit)

Zusammenfassung

Stichworte: RNA-Interferenz, BCR-Abl, Chronische Myeloische Leukämie, Lentivirus

Das onkogene Fusionsprotein BCR-Abl entsteht durch Transkription und Translation einer reziproken chromosomalen Translokation und verursacht die Chronische Myeloische Leukämie. Das Fusionsprotein ist eine konstitutiv aktive Tyrosinkinase, durch die es in hämatopoetischen Stammzellen über verschiedene Signaltransduktionswege zur malignen Transformation kommt. Der Tyrosinkinaseinhibitor STI571 wird erfolgreich in der Behandlung von CML-Patienten eingesetzt. Nach klinischer Anwendung des Medikamentes, entwickelte ein Teil der Patienten Resistenzen gegen STI571, sodass nach weiteren Behandlungsmöglichkeiten geforscht wird.

Zu Beginn der Forschungsarbeit wurde mit der *Phage Display*-Methode versucht, kleine Peptide zu selektionieren, die spezifisch die b3a2-mRNA-Struktur erkennen, effektiv binden und die Translation inhibieren. Da diese Methode für dieses Konstrukt zu keinen endgültigen Ergebnissen führte, wurden RNA-Moleküle zur Degradation der bcr-abl-b2a2-mRNA eingesetzt. Der Schwerpunkt wurde nun auf die RNA-Interferenz als weitere, sehr vielversprechende Möglichkeit zur sequenz-spezifischen Reduktion von Ziel-mRNAs verlagert.

Entlang der Sequenz der b2a2-mRNA-Bruchpunktregion wurden verschiedene siRNAs ausgewählt, chemisch synthetisiert oder von Plasmiden exprimiert und auf ihre Effizienz in einem Reportersystem mit einem GFP-Fusionsprotein untersucht. Dabei konnte eine siRNA identifiziert werden, die eine verkürzte b2a2-mRNA-Variante des BCR-Abl-Proteins zu 70% reduziert. Die transiente Degradation der gesamten b2a2-mRNA wurde mit der verzögerten Proliferation verschiedener hämatopoetischer Zelllinien gezeigt. Eine stabile siRNA-Expression wurde durch lentiviralen Gentransfer eines fluoreszenz-markierten Vektors erreicht und eine zur Fluoreszenzintensität korrelierende BCR-Abl-Reduktion in murinen und humanen Zelllinien detektiert. Nach derzeitigem Kenntnisstand scheint die b2a2-3-21nt-Sequenz die einzige siRNA zu kodieren, die die b2a2-mRNA stark reduziert. Sie degradiert jedoch weitere mRNA-Moleküle und ist somit nicht mehr mono-spezifisch. Sowohl in murinen als auch humanen b2a2-negativen Zellen konnte unter dem Einfluss der siRNA eine verminderte Zellproliferation beobachtet werden.

Vergleiche zwischen mRNA-Strukturanalysen und den ermittelten Effizienzen verschiedener siRNAs gegen die b2a2-mRNA belegen, dass die 5'-Enden der Antisense-Stränge der siRNAs entweder in gepaarten mRNA-Abschnitten binden und damit ineffizient sind, oder aber, wenn sie in einzelsträngigen mRNA-Bereichen binden und damit wirken können, zu weit mit den Wildtyp-Sequenzen des bcr- bzw. abl-Gens übereinstimmen.

Somit müssen für die b2a2-positive CML andere Methoden zur effektiven Inhibition der Expression des BCR-Abl-Proteins angewendet werden.

Abstract

Key words: RNA-Interference, BCR-Abl, Chronic Myeloid Leukemia, Lentivirus

The oncogenic fusion protein BCR-Abl is translated from a reciprocal chromosomal translocation and causes chronic myeloid leukemia. The fusion protein encodes a constitutively active cytoplasmic tyrosine kinase that is necessary and sufficient to induce and maintain leukemic transformation of hematopoietic cells. A major breakthrough in the treatment of CML took place with the approval of the tyrosine kinase inhibitor STI571. After several years of clinical use, a population of patients resistant to STI571 therapy has emerged, thus demonstrating the importance of developing alternative therapies for the disease.

To address this issue, phage display was initially used to select small peptides which specifically recognize the bcr-abl-b3a2-mRNA structure and inhibit their translation. Since this method failed to generate useful results, small interfering RNA (siRNA) molecules were used to reduce levels of bcr-abl-b2a2-mRNA.

Different sequences were chosen for siRNA design and the constructs were either chemically synthesized or expressed from plasmids. The efficiency was analyzed by a GFP fusion protein reporter system and one siRNA was found which efficiently reduced the b2a2 mRNA. The transient degradation of mRNA could be demonstrated by decreased proliferation of different hematopoietic cell lines. The stable siRNA expression was demonstrated by lentiviral vector-mediated delivery and signal intensity of the co-expressed red fluorescence correlated with BCR-Abl reduction in murine and human cell lines. The b2a2-3-21nt siRNA construct was found to efficiently down-regulate the b2a2 variant of BCR-Abl. However, it also led to reduced cell proliferation in murine and human b2a2 negative cells and therefore has to be considered as non-specific.

Comparison of mRNA secondary structure and siRNA efficiencies revealed two types of binding sites for the 5' terminus of the antisense strands of siRNAs. If binding is in a double-stranded b2a2 mRNA region, an inefficient siRNA gene silencing results. In contrast, when the siRNA localizes to a binding site, which is in a single-stranded b2a2 mRNA section, efficient reduction in b2a2 BCR-Abl occurs. However, the single-stranded binding sites also align well with wildtype sequences of the bcr or abl transcript which cause undesirable side effects. Thus, other methods to suppress the b2a2 mRNA have yet to be discovered.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN.....	V
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 DIE RIBONUKLEINSÄURE (RNA).....	1
1.2 RNA-BINDENDE PROTEINE.....	2
1.3 PHAGE DISPLAY	3
1.4 RNA-INTERFERENZ.....	5
1.5 RETROVIRAL VERMITTELTER GENTRANSFER.....	11
1.6 DAS ONKOGENE FUSIONSPROTEIN BCR-ABL.....	15
1.6.1 Die Funktion des zellulären BCR- und Abl-Proteins.....	15
1.6.2 Die Chronisch Myeloische Leukämie (CML).....	18
1.6.3 Biologie der Bcr-abl-Translokation.....	19
1.6.4 Therapie der CML auf molekularer Ebene	24
1.7 ZIELSETZUNG UND AUFGABENSTELLUNGEN	26
2 MATERIAL UND METHODEN.....	27
2.1 MATERIAL.....	27
2.1.1 Geräte.....	27
2.1.2 Software	28
2.1.3 Verbrauchsmaterial.....	28
2.1.4 Chemikalien.....	29
2.1.5 Puffer und Stammlösungen.....	30
2.1.6 Enzyme, Kits und Fertiglösungen.....	32
2.1.7 DNA- und RNA-Oligonukleotide.....	33
2.1.8 Vektoren	35
2.1.9 Antikörper	35
2.1.10 Bakterienstämme	35
2.1.11 Zelllinien	36
2.2 METHODEN.....	38
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	38
2.2.1.1 Aufreinigung von RNA aus Zellmaterial (gesamt-RNA in Trizol).....	38
2.2.1.2 Abbau von DNA-Fragmenten.....	38
2.2.1.3 Fällungen mit Phenol-Chloroform und Ethanol.....	39
2.2.1.4 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	39
2.2.1.5 Hybridisierung komplementärer siRNA-Stränge.....	39
2.2.1.6 <i>In vitro</i> -Transkription	40
2.2.1.7 Reverse Transkription.....	40
2.2.1.8 Quantitative <i>Real Time</i> -PCR	41

2.2.1.9	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAAGE) zur Auftrennung von RNA	42
2.2.1.10	Aufreinigung von RNA aus PAA-Gelen	42
2.2.1.11	Biotinylierung von RNA [153].....	43
2.2.1.12	Silberfärbung von PAA-Gelen	43
2.2.1.13	Modifikation von RNA durch Spaltung mit RNasen.....	43
2.2.1.14	Reverse Transkription mit einem fluoreszenzmarkiertem Primer	43
2.2.1.15	Detektion von RNA im Northern Blot	44
2.2.1.16	Kultivierung von Bakterien	45
2.2.1.17	Herstellung CaCl ₂ -kompetenter Bakterien	45
2.2.1.18	CaCl ₂ -Transformation von <i>E.coli</i> -Zellen	46
2.2.1.19	Blau-Weiß-Selektion.....	46
2.2.1.20	Phosphorylierung und Hybridisierung komplementärer Oligonukleotide	46
2.2.1.21	Polymerasekettenreaktion (PCR)	47
2.2.1.22	DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen.....	47
2.2.1.23	Auffüllen von <i>sticky ends</i> mit dem Klenow-Enzym	47
2.2.1.24	Dephosphorylierung linearisierter Vektor-DNA	48
2.2.1.25	Ligation.....	48
2.2.1.26	Klonierung von PCR-Produkten in Topo-Vektoren	48
2.2.1.27	Agarose-Gelelektrophorese	49
2.2.1.28	Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen.....	49
2.2.1.29	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	50
2.2.1.30	Sequenzierung von Plasmid-DNA	51
2.2.2	<i>Phage Display</i>	52
2.2.2.1	Peptidselektion	52
2.2.2.2	Amplifikation und Fällung der Phagen.....	53
2.2.2.3	ELISA.....	54
2.2.2.4	Sequenzierung	55
2.2.3	<i>Zellbiologische Methoden</i>	56
2.2.3.1	Allgemeine Zellkultur.....	56
2.2.3.2	Aufreinigung von genomischer DNA aus Zellsuspensionen	57
2.2.3.3	Detektion und Beseitigung von Mycoplasmenkontaminationen.....	58
2.2.3.4	Transfektion von eukaryotischen Zellen.....	58
2.2.3.5	Markierung von Zellen mit Antikörper.....	59
2.2.3.6	Propidiumiodid-(PI)-Färbung	60
2.2.3.7	Präparation von rekombinanten retro- und lentiviralen Überständen	60
2.2.3.8	Transduktion von Zellen.....	61
2.2.3.9	Virustiterbestimmung	61
2.2.3.10	Zellproliferationsbestimmung	61
2.2.3.11	Durchflusszytometrische Analysen	62
3	ERGEBNISSE	63
3.1	PHAGE DISPLAY – SELEKTION EINES BCR/ABL INHIBIERENDEN PEPTIDLIGANDEN.....	63
3.1.1	<i>Präparation der biotinylierten RNA</i>	63
3.1.2	<i>Biopanning und Sequenzierung der Phagen-DNA einzelner Plaques</i>	63
3.1.3	<i>Überprüfung der Spezifität der selektionierten Phagen im ELISA-Verfahren</i>	65

3.2	SEKUNDÄRSTRUKTURANALYSE DER 100NT-LANGEN BCR-ABL-(B3A2)MRNA	66
3.3	SUPPRESSION DER BCR-ABL-(B2A2)MRNA MIT RNA-INTERFERENZ.....	68
3.3.1	<i>Untersuchungen der Mauszelllinie Ba/F3-b2a2 mit STI571</i>	68
3.3.2	<i>Klonierung der GFP-Fusionsproteins sb3a2-EGFP.....</i>	70
3.3.3	<i>Transiente BCR-Abl-Suppression mit chemisch synthetisierten siRNAs.....</i>	72
3.3.3.1	Selektion effizienter siRNAs	72
3.3.3.2	Effekte der siRNAs in Ba/F3-b2a2-Zellen.....	73
3.3.3.3	Effekte der siRNAs in humanen b2a2-positiven Zellen.....	75
3.3.4	<i>shRNA-Expression durch pSuper-Plasmide.....</i>	77
3.3.4.1	Klonierung von Oligonukleotiden in pSuper	77
3.3.4.2	Test der Effizienz der shRNAs in einem Reportersystem.....	78
3.3.4.3	Effekte der shRNAs in einer hämatopoetischen Zelllinien.....	79
3.3.5	<i>shRNA-Expression durch das retrovirale Plasmid pBabepuro</i>	81
3.3.5.1	Klonierung der shRNA-Expressionskassette in das retrovirale Plasmid.....	81
3.3.5.2	Effizienz der exprimierten shRNAs in einem Reportersystem	82
3.3.5.3	Nachweis der siRNA im Northern Blot.....	82
3.3.5.4	Virustransduktion in Ba/F3-b2a2-Zellen	83
3.3.6	<i>shRNA-Expression durch das lentivirale Plasmid dcH1-shRNA-SR.....</i>	86
3.3.6.1	Klonierung des H1-Promotor-shRNA-Konstruktes aus pSuper in das lentivirale Plasmid.....	86
3.3.6.2	Effizienz der exprimierten shRNAs in einem Reportersystem	87
3.3.6.3	Effekte der Plasmid-exprimierten shRNAs in Ba/F3-b2a2-Zellen	87
3.3.6.4	Virustransduktion in hämatopoetische Zelllinien	88
3.3.7	<i>Einführung einer Basenfehlpaarung in shRNA-Konstrukte</i>	106
3.3.8	<i>Vergleich der shRNAs mit anderen Sequenzen.....</i>	108
4	DISKUSSION	110
4.1	PHAGE DISPLAY	110
4.2	RNA-SEKUNDÄRSTRUKTURANALYSE	112
4.3	BCR-ABL-SUPPRESSION MIT SIRNAS	113
4.3.1	<i>Transiente bcr-abl-Suppression mit siRNAs</i>	113
4.3.2	<i>Stabile bcr-abl-Suppression mit siRNAs</i>	115
	Lentiviraler Gentransfer	115
	Onkoretroviraler Gentransfer.....	116
4.3.3	<i>Selektion effizienter siRNAs</i>	117
	Beurteilung von Kriterien für eine effiziente siRNA	117
	Der Einfluss von Strukturmerkmalen auf die Effizienz einer siRNA	120
	Effektivität von siRNAs mit unterschiedlicher Länge	122
	Erhöhung der Effizienz einer shRNA durch Basenfehlpaarung	122
4.3.4	<i>Selektion spezifischer siRNAs.....</i>	123
	AUSBLICK.....	128
5	LITERATUR	129
	ANHANG.....	137

LEBENSLAUF 147

EIGENE PUBLIKATIONEN 148

DANKSAGUNG.....

Verzeichnis der Abkürzungen

Abl	humanes Homologon des v-abl-Onkogens des Abelson murinen Leukämievirus
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
aq. dest.	destilliertes Wasser
BCR	Breakpoint Cluster Region
CFU	Colonyforming units
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
dsRNA	doppelsträngige RNA
FCS	Fetal Calf Serum
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HSC	hämatopoetische Stammzellen
IFN- α	Interferon α
IL-3	Interleukin 3
IR	Ionisierende Strahlung
LTR	Long Terminal Repeat
MCS	Multiple Cloning Sites
miRNA	mikro RNAs
MOI	Multiplicity Of Infection, Zahl der eingesetzten Viruspartikel pro Zelle
MoMuLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	messenger-RNA
MSCV	muriner Stammzellvirus
NLS	Kernlokalisierungssignal
ODN	Oligodesoxynukleotide
PAAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
Ph	Philadelphia-Chromosom
Ph. D.-7/-12	Phage Display-Phagenbibliotheken 7-mer/12-mer
PI3	Phosphoinositol 3
PTD	Protein-Transfer-Domänen
PTGS	post-transkriptionelles Gene silencing
RdRP	RNA-abhängigen RNA-Polymerase
RISC	RNA Induced Silencing Complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNasen	Ribonukleasen
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
SCID	Severe combined immunodeficiency
shRNA	small hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
snRNA	small nuclear RNAs
tRNA	transfer-RNA
ü. N.	über Nacht

1 Einleitung

1.1 Die Ribonukleinsäure (RNA)

RNA-Moleküle sind meist einzelsträngig vorliegende Makromoleküle. Ihre Nukleotidsequenz ist durch die Transkription der DNA vorgegeben. Aufgrund ihrer Eigenschaft, sich selbst zurückfalten zu können, bilden RNA-Moleküle Doppelstrangbereiche aus. Dadurch kommt es zur Bildung von verschiedenen Sekundärstrukturelementen wie Haarnadelschleifen (*Hairpins*), Ausstülpungen (*Bulges*), internen Haarnadelschleifen (*Internal loops*) und Verbindungsstellen (*Junctions*), die untereinander durch Einzelstrangbereiche verbunden sind [1]. Die Vorhersage solcher Sekundärstrukturen ist mit verschiedenen Computerprogrammen möglich [2] und kann experimentell chemisch, enzymatisch oder molekularbiologisch untersucht werden [3]. Die enzymatische Strukturbestimmung verwendet Ribonukleasen (RNasen), die RNA nach bestimmten strukturellen Elementen spalten. Bekannt sind die RNasen: A, CL3, H, Phy I, Phy M, T1, T2, U2 und V1. Die Abkürzungen stehen für die unterschiedliche Herkunft der Enzyme. So werden z.B. die RNasen T1 und T2 aus *Aspergillus oryzae* und A aus Rinderpankreas isoliert. T1, T2 und A spalten in RNA-Molekülen spezifisch hinter einem einzelsträngigen Guanosin, Adenosin bzw. Cytosin und Uracil [4-7].

Zellen enthalten verschiedene RNA-Moleküle. Durch ihre dreidimensionale Struktur besitzt die RNA vielfältige Eigenschaften und kann verschiedene Funktionen übernehmen. So dient z.B. die *Messenger*-RNA (mRNA) als Matrize für die Proteinbiosynthese, *Transfer*-RNAs (tRNAs) transportieren Aminosäuren in einer aktivierten Form zum Ribosom, oder die ribosomale RNA (rRNA) ist strukturgebender und katalytischer Bestandteil der Ribosomen. In einem späteren Kapitel werden die Funktionen der mikro-RNAs (mi-RNAs) und der *small interfering* RNAs (siRNAs) genauer beschrieben.

RNA-Moleküle können entweder durch die Abfolge ihrer Nukleotidsequenz oder durch ihre Sekundärstruktur spezifische Interaktionen mit Liganden eingehen. Diese Möglichkeiten der gezielten RNA-Bindung nutzen verschiedene Substanzen wie Proteine oder RNA-Moleküle zur Inhibition der RNA-Expression.

1.2 RNA-bindende Proteine

Aufgrund ihrer Fähigkeit, komplexe dreidimensionale Strukturen auszubilden, ist RNA in der Lage, spezifisch Effektorproteine zu binden und damit gezielt regulatorische Funktionen in der Zelle zu übernehmen. RNA-bindende Proteine besitzen Schlüsselrollen in einer Vielzahl von wichtigen zellulären Prozessen, wie bei der Transkription, beim Spleißen, der Polyadenylierung, dem nukleären Export, der Translation, der mRNA-Lokalisation, bei der mRNA-Degradation oder auch beim Verpacken viraler RNA in Viruspartikel.

Viele bekannte RNA-bindende Proteine besitzen Module von 60-90 Aminosäuren, die für die Erkennung der RNA verantwortlich sind, sowie weitere Domänen für andere wichtige Funktionen. Ein häufiges RNA-Erkennungsmotiv (RRM, RNP oder RBD) beinhaltet eine kurze Konsensussequenz (RNP1 und RNP2) mit geladenen und aromatischen Seitenketten für den direkten RNA-Kontakt, wahrscheinlich gebildet durch Wasserstoffbrückenbindungen und Stapelung von Ringstrukturen. Weiterhin zeigt eine aromatische Seitenkette in das Innere der gefalteten Domäne und bildet zusammen mit anderen hoch konservierten hydrophoben Aminosäuren den hydrophoben Kern der Domäne.

Weitere wichtige RNA-bindende Motive beinhalten Arginin-reiche Sequenzen (ARM), auch basische Domänen genannt, die in viralen oder ribosomalen Proteinen die RNA-Bindung initiieren. Das Arginin besitzt wichtige Funktionen für die RNA-Bindung. Erstens erhöht die positive Ladung des Arginins die unspezifische Affinität zur RNA und erleichtert die Suche nach hochaffinen Bindungsstellen. Zweitens werden spezifische Wasserstoffbrückenbindungen zu dem Zucker-Phosphatrückgrat und den Basen geknüpft, wobei es im Vergleich zu Lysin viel mehr potenzielle Wasserstoffbrücken ausbildende Atome besitzt.

Die RGG-Box ist ein Motiv aus Wiederholungen von Arg-Gly-Gly-Sequenzen mit nur kurzen Unterbrechungen durch andere, oft aromatische Aminosäuren. Viele RNA-bindende Proteine enthalten außer der RGG-Box auch andere Formen von RNA-bindenden Domänen, da die RGG-Box allein eher unspezifisch ist. Zum Beispiel benötigt das Nukleolin vier RNP-Motive zur Erkennung der RNA und eine RGG-Box, die die RNA-Bindungsaffinität 10-fach erhöht. Weitere bekannte Motive sind das KH-Motiv mit der Kernsequenz VIGXXGXXI oder das Doppelstrang-RNA-bindende Motiv (DSRM) mit basischen (Arginin und Lysin) und hydrophoben Aminosäuren an den konservierten Positionen [8].

1.3 Phage Display

Die spezifische Bindung von dreidimensionalen RNA-Molekülstrukturen durch Proteine, Peptide oder andere Moleküle eröffnet Möglichkeiten für therapeutische Interventionen. Ein bekanntes Beispiel für natürlich vorkommende therapeutisch wirkende RNA-Liganden sind Antibiotika [9]. Dabei inhibieren z.B. Aminoglykoside durch Bindung an die 16S-rRNA in den Ribosomen die Translation bakterieller RNA. Eine genaue Strukturaufklärung der für die Bindung zuständigen RNA-Motive ermöglichte es, synthetisch oder *in vitro* hergestellte RNA-Strukturen zum Durchsuchen von Substanzbibliotheken nach niedermolekularen therapeutischen Liganden einzusetzen. Dass dieser Ansatz prinzipiell funktioniert, zeigte eine Suche nach Peptidliganden für eine für die HIV-Replikation essenzielle RNA-Struktur TAR [10].

Laird-Offringa und Belasco [11] versuchten ein genetisches System zu entwickeln, um das Studium einer großen Bandbreite von RNA-bindenden Proteinen zu ermöglichen. Sie verwendeten ein System, in dem die Selektion *in vitro* durch Bindung des Proteins an eine an magnetische Kügelchen immobilisierte Ziel-RNA stattfindet. Um die gebundenen Proteinmoleküle identifizieren zu können, ist es notwendig, jedes Protein mit seinem korrespondierenden Gen zu verknüpfen. Diese Möglichkeit bietet die *Phage Display*-Technologie, wobei das fremde Peptid oder Protein an das Hüllprotein eines filamentösen Bakteriophagen fusioniert ist. Somit erscheint das Fusionsprotein an der Oberfläche des Phagen (Display), während sich die dafür kodierende DNA im Inneren befindet [12].

Im *Phage Display*-Verfahren wird eine an eine Platte oder in einer Suspension immobilisierte Zielstruktur mit Phagen aus einer Phagenbibliothek inkubiert. Die ungebundenen Phagen werden durch Waschschriffe entfernt und die spezifisch gebundenen Phagen eluiert. Die eluierten Phagen werden amplifiziert und können durch weitere Selektions- und Amplifikationsschritte zu einem Pool an Peptiden mit favorisierten Sequenzen angereichert werden. Nach drei oder vier Runden können die einzelnen Klone durch DNA-Sequenzierung charakterisiert werden. Die verwendeten Phagenbibliotheken Ph.D.-7 und Ph.D.-12 basieren auf Peptiden mit einer 7- bzw. 12-Aminosäuren-langen, zufällig ausgewählten Sequenz, welche an das Hüllprotein (pIII) des M13-Phagen fusioniert ist. Die Peptidstruktur wird am N-Terminus von pIII exprimiert. Dem Peptid folgt eine kurze Überbrückungssequenz (Gly-Gly-Gly-Ser) und dann die Wildtyp-pIII-Sequenz. Einige Gruppen haben bereits erfolgreich Peptidliganden für RNA-Strukturen mit Phagenbibliotheken selektionieren können [13; 14].

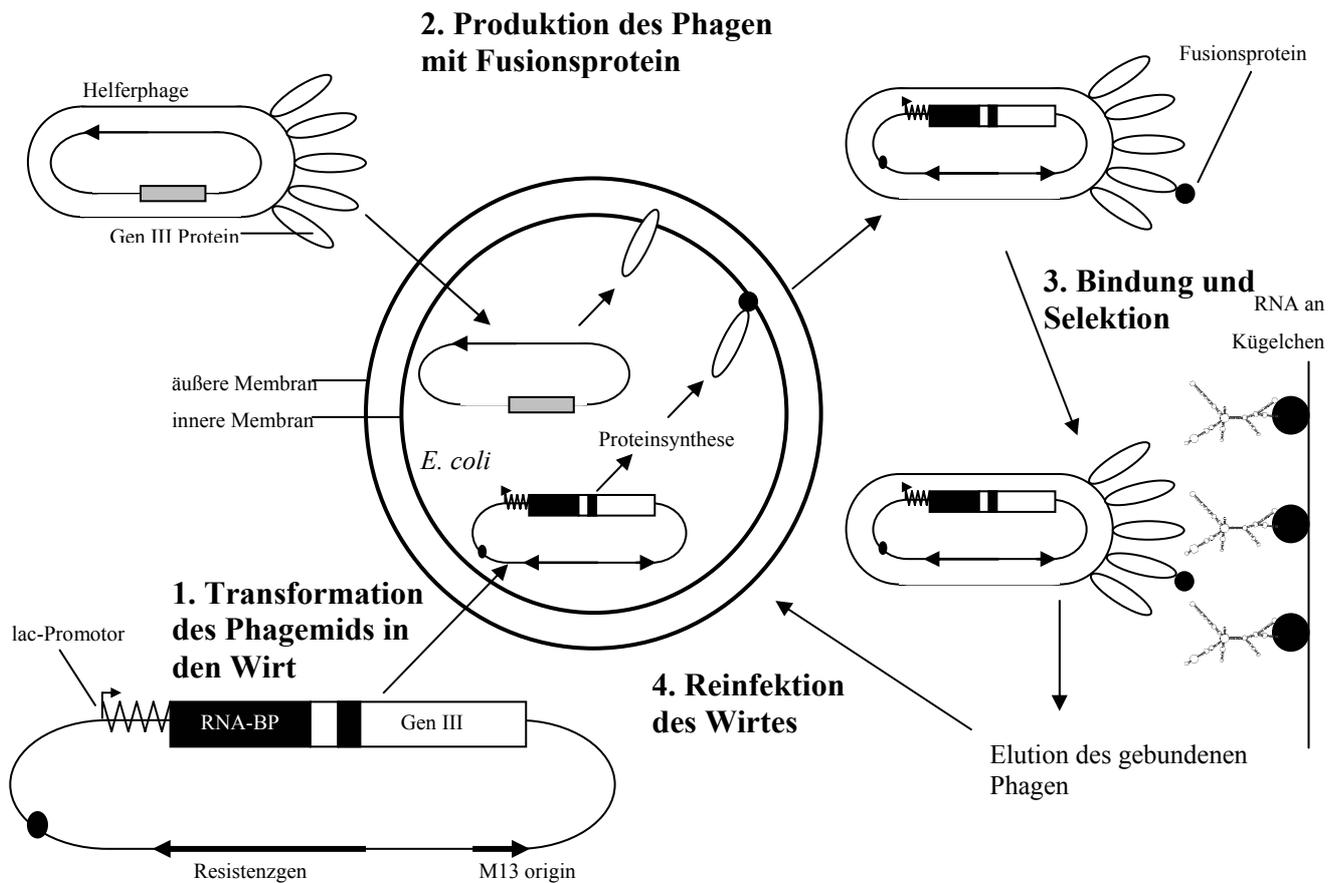


Abb. 1: Phage Display-Technologie als *in vitro*-Selektionsmethode von RNA-bindenden Peptiden. (1) Eine Bibliothek aus mutagenisierten cDNA-Fragmenten, die für RNA-bindende Peptide kodieren, werden in einen Phagenvektor kloniert. Es resultieren Fusionsproteine aus dem Peptiden und dem Hüllprotein III des filamentösen Bakteriophagen. Die Bibliothek wird in *E. coli* transformiert. (2) Die Phagenbibliothek mit den Peptiden an der Oberfläche wird durch Infektion des Wirtes mit dem Helferphagen generiert. (3) Die Phagenbibliothek kann an die immobilisierte RNA binden. (4) Nach dem Waschen werden die gebundenen Phagen eluiert und erneut zur Infektion von *E. coli* eingesetzt, um die Phagen zu amplifizieren und eine neue Selektionsrunde zu starten [13].

Mit der *Phage Display*-Technologie können auch Peptidliganden gegen eine Vielzahl anderer Zielstrukturen (Antikörper, Enzyme, Oberflächenrezeptoren etc.) durch einen *in vitro*-Selektionsprozess (*panning*) gefunden werden. Zufällige Peptidbibliotheken, auf Phagen exprimiert, wurden z.B. zur Charakterisierung von Epitopen [15] und Protein-Protein-Kontakten eingesetzt [16]. Mit der gleichen Technik wurden auch biologisch aktive Peptidliganden für aufgereinigte Rezeptoren [17] oder intakte Zellen identifiziert [18; 19]. In einem SCID-Mausmodell konnte mit einem gegen VEGFR-1 gerichteten selektierten Peptid das Tumorwachstum, durch eine humane Brustkrebszelllinie induziert, sowie Lungenmetastasen signifikant inhibiert werden [17].

1.4 RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist eine effektive Methode zur gezielten Inaktivierung von Genen *in vivo*. Dieser Prozess des post-transkriptionellen *Gene silencing* (PTGS) wird durch dsRNA-Moleküle induziert. Die Methode wurde mittlerweile von vielen Forschergruppen angewandt, um spezifisch definierte mRNA-Moleküle in Zellen verschiedener Organismen zu degradieren. Die siRNAs können chemisch synthetisiert eingeschleust oder endogen von Plasmiden in Zellen exprimiert werden. Diese Strategien eröffnen vielfältige Möglichkeiten in der Therapie verschiedener Erkrankungen sowie des gezielten Ausschaltens von Proteinen zu Zwecken der Funktionsanalyse.

Funktion und Wirkungsmechanismus der RNAi

Genome komplexer Organismen sind potenzielle Ziele für die Invasion von Viren und Transposons. Das menschliche Genom besteht zu 45% aus Überresten solcher Eindringlinge, die noch aktiv sind. Daraus ergibt sich, dass komplexe Organismen Abwehrstrategien benötigen, um ihr Genom zu schützen. In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass es dafür einen Mechanismus auf RNA-Ebene gibt, der in verschiedenen Reichen von Organismen konserviert ist (Pilze, Tiere, Pflanzen). RH Plasterk beschrieb diesen Mechanismus als „Immunsystem des Genoms“ [20].

Viele Forschergruppen studierten unabhängig voneinander diesen Mechanismus des *Gene silencing* in verschiedenen Organismen wie Pflanzen [20], Tieren wie *C. elegans* [21] oder *Drosophila* [22; 23] sowie in Pilzen („quelling“) und Algen [20]. Alle basieren auf dem gleichen, gegen die RNA-gerichteten, sequenz-spezifischen Mechanismus.

Aus Versuchen in *C. elegans* wusste man, dass die Verabreichung von artifizieller dsRNA zur sequenzspezifischen Degradation der komplementären zellulären mRNA führt [21]. Einige höhere Eukaryoten, z.B. Säugetiere, reagieren auf lange dsRNA-Moleküle (>30 Bp) mit der Produktion von Interferon, einer unspezifischen Abwehrreaktion. Der Signaltransduktionsweg der Interferonantwort aktiviert die dsRNA-abhängige Kinase PKR und die 2',5'-Oligoadenylat-Synthetase. Es kommt zur Phosphorylierung des eukaryotischen Translations-Initiationsfaktors 2 α (eIF2 α) und zur Aktivierung der RNase L. Das führt zur unspezifischen Inhibition der Proteinsynthese und zur Hydrolyse der mRNA und rRNA [24]. Organismen wie Pflanzen, Insekten oder Nematoden verfügen nicht über eine Interferonantwort und lösen deshalb den Mechanismus der RNAi aus [20].

Im ersten Schritt des nativen RNAi-Mechanismus werden dsRNA-Moleküle in kleine Fragmente von 21- bis 28nt Länge mit 2nt Überhang am 3'-Ende gespalten. Der Prozess wird durch das RNaseIII-ähnliche Enzym Dicer katalysiert und resultiert in den siRNAs. Diese werden in einem zweiten Schritt von der RNAi-Maschinerie erkannt und durch das dsRNA-bindende Protein R2D2 an den Enzymkomplex RISC (RNA-Induced Silencing Complex) weitergegeben [25]. Nach Entwindung der siRNA führt der Antisense-Strang den RISC-Komplex zur komplementären mRNA-Zielsequenz, um diese durch die im Komplex enthaltene Endonuklease zu spalten. Die Ziel-mRNA wird an einer einzigen Position im Zentrum der Duplexregion, 10nt vom 5'-Ende der siRNA entfernt, gespalten. Die mRNA ist nun zugänglich für weitere Exonukleasen [25; 26].

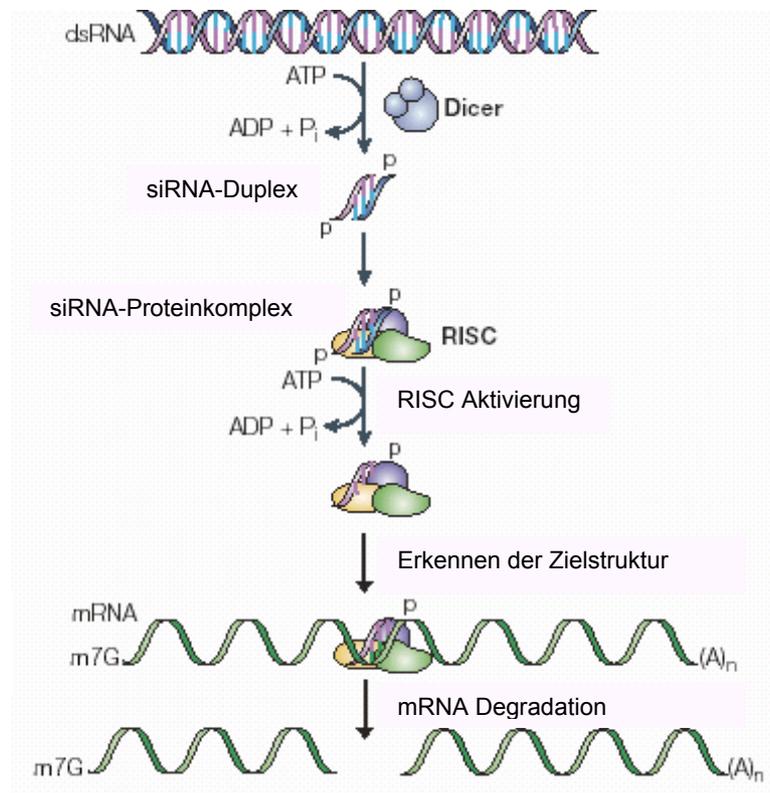


Abb. 2: Der RNAi-Mechanismus. Lange dsRNA wird durch die RNaseIII (Dicer) in einer ATP-abhängigen Reaktion in siRNAs gespalten. Die siRNAs werden in den RISC eingeschleust. Die Aufnahme in den Komplex ist ATP-unabhängig, aber die folgende Entwindung des siRNA-Duplex benötigt ATP. Der Antisense-Strang führt den RISC zur komplementären mRNA. Der Vorgang endet in der Spaltung der mRNA durch eine Endonuklease sowie der mRNA-Degradation [26].

Nicht-kodierende, siRNA-ähnliche RNA-Moleküle sind miRNAs, die nativ in Zellen die Genexpression regulieren. Diese einzelsträngigen Moleküle sind 21nt bis 22nt lang und entstehen durch Dicer-Spaltung aus ca. 70nt langen endogenen Transkripten mit imperfekter Haarnadelstruktur. Die miRNAs gehen in einen Proteinkomplex (miRNP) ein, der die

Translation der mRNA blockiert [25]. Bei kompletter Komplementarität der miRNA zu einer mRNA-Sequenz kann auch deren Degradation induziert werden [27].

Anwendung der siRNA-Technologie in der Forschung

Für die Synthese einer effektiven siRNA wurden in verschiedenen Veröffentlichungen wichtige Kriterien zur Beurteilung der Effektivität vorgestellt [28; 29]. Dykxhoorn *et al.* [26] fassten diese Kriterien in einem Übersichtsartikel zusammen und diskutierten dabei sowohl sequenzspezifische als auch strukturelle Merkmale der siRNA sowie der Ziel-mRNA. Es wurden verschiedene Sequenzmotive (AAN₁₉TT, NAN₁₉NN; NAPuN₁₂PyNN; NANN₁₂PyNN), ein GC-Gehalt von 30-70%, Vermeidung von repetitiven und längeren Sequenzen mit nur einer Base (v.a. G) bei der siRNA genannt. Ein 3'-Überhang aus zwei 2'-Desoxythymidinen wurde von Elbashir *et al.* [29] als entscheidend betrachtet. Prinzipiell kann jede Gensequenz als Ziel dienen, allerdings sollten Startcodons und Exon-Exon-Brücken vermieden werden. Die Wahl einer siRNA ist aber durch die Sequenz des Gens festgelegt. Oft muss eine siRNA gewählt werden, die nicht alle Parameter für eine hohe Effizienz aufweist. Die wirkliche Effektivität einer siRNA muss individuell durch Experimente ermittelt werden. Weitere Untersuchungen zeigten, dass durch die Einführung einer Basenfehlpaarung am 3'-Ende des Antisense-Stranges an diesem Ende die siRNA leichter vom RISC-Komplex entwunden wird und der Antisense-Strang bevorzugt in den Enzymkomplex eingeht [30]. Khvorova *et al.* [27] konnten ebenfalls zeigen, dass auch bekannte miRNA-Sequenzen am 5'-Ende des Antisense-Stranges eine verstärkte Flexibilität aufwiesen.

Um RNAi in Forschungsarbeiten anwenden zu können, gibt es verschiedene Möglichkeiten siRNAs in eukaryotische Zellen einzuschleusen.

Exogen gelangen chemisch synthetisierte, durch *in vitro*-Transkription erzeugte [31-33] oder aus Proteinextrakten isolierte [34] siRNAs durch physikalische Methoden wie die Lipofektion [35-40] oder Elektroporation [41] in die Zellen. Auch die Mikroinjektion in Adipozyten konnte erfolgreich durchgeführt werden [42]. Die Lipofektion wird für die Applikation in adhärenzte Säugerzelllinien wie HeLa, NIH3T3, Cos-7 oder 293T verwendet. Bei Suspensionszellen ist die Elektroporation effizienter und konnte erfolgreich in hämatopoetischen Zelllinien [43], primären Zellen [44] und zur Etablierung einer shRNA-transgenen murinen embryonalen Stammzelllinie [45] angewendet werden.

siRNA-Applikationen in die Schwanzvene von Mäusen wurden angewendet, um RNAi im Gewebe zu erzeugen. So hemmte eine Injektion von siRNAs bis zu 90% die Expression parallel injizierter Plasmide in verschiedenen Organen der Maus [46]. Neben der transienten

Wirkung sind weitere Nachteile dieser Methode der hohe Druck und das massive Volumen bei der murinen vaskulären Applikation. Song *et al.* [47] konnten mit der gleichen Methode für zehn Tage das Fas-Protein in Hepatozyten mit effektiven Cy5-Fas-siRNAs reduzieren und so Mäuse mit Autoimmunhepatitiden vor Leberversagen und -fibrose bewahren.

Die zeitlich limitierte Aktivität von exogen applizierten siRNAs kann mit der Verwendung von Plasmidvektoren mit RNA-Polymerase-II-[48] oder RNA-Polymerase-III-Promotoren, wie dem U6-Promotor [49-51] oder dem H1-Promotor [52] umgangen werden. Sie ermöglichen eine intrazelluläre siRNA-Expression. Dabei können der Sense- und Antisense-Strang von zwei separaten Promotoren oder aber als Haarnadelstruktur von einem einzelnen Promotor exprimiert werden. Im letzteren Fall der *small hairpin* RNAs (shRNA) faltet das Transkript sich selbst zu einer Doppelstrang-Struktur mit *Loop* zurück. Diese Haarnadelstruktur kann wie lange dsRNA-Moleküle von der RNase Dicer in siRNAs prozessiert werden. Brummelkamp *et al.* [52] generierten einen pSuper-Vektor mit H1-Promoter zur Expression von shRNAs. Ein *Loop* mit 9nt (5'-UUCAAGAGA-3') förderte das *Gene silencing* am stärksten. Nach Transfektion des Plasmids und Selektion der positiven Zellen konnte p53 über zwei Monate stabil supprimiert werden.

Ein Vielzahl von Experimenten konzentrierte sich auf den viral vermittelten Gentransfer von shRNAs, wodurch eine effektive Möglichkeit zur Transduktion einer großen Bandbreite von Zellen eröffnet wird. Verschiedene Studien zeigten erfolgreich den retroviral [53; 54], adenoviral [55] oder lentiviral vermittelten Transfer von shRNAs in Zellen. Sie konnten die Expression von Genen für EGFP [56; 57] oder auch den HIV-Korezeptor CCR5 [58] über längere Zeiträume stabil inhibieren. Rubinson *et al.* [59] beschrieben den lentiviralen shRNA-Transfer in proliferierende und nicht-proliferierende Säugerzellen, in Stammzellen und Einzelzell-Embryonen. Schomber *et al.* [60] konnten durch lentivirale shRNA-Expression über mehrere Wochen die p53-mRNA in humanen HSC reduzieren. Hemann *et al.* transduzierten verschiedene shRNAs gegen p53 in murine HSCs und transplantierten diese in E μ -Myc-transgene Mäuse. In Abhängigkeit von der jeweiligen siRNA-Effizienz wurden verschiedene Phänotypen von der benignen lymphoiden Hyperplasie bis zum stark disseminierten Lymphom beobachtet [61]. Scherr *et al.* [62] demonstrierten eine direkte Korrelation zwischen der Anzahl lentiviraler Integrationen, der Stärke der shRNA-Expression und dem Ausmaß des *Gene silencing* in hämatopoetischen Zellen.

Anwendungen in hämato-onkologischen und immunologischen Fragestellungen

Auf dem Gebiet der HIV-Forschung konnte mit transfizierten oder transduzierten siRNAs in Zellen die Virusreplikation inhibiert oder aber die Expression von Oberflächenrezeptoren auf T-Zellen blockiert werden [37; 51; 58]. Banerjea *et al.* [63] verwendete lentivirale Vektoren zur Transduktion von anti-*rev*-siRNAs in CD34⁺-hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen. Scherr *et al.* [64] nutzten die gleiche Methode, um RNAi gegen die gemeinsame β -Kette der Rezeptoren für GM-CSF, IL-3 und IL-5 (β -GMR) in primären CD34⁺-Zellen zu induzieren. Nach Stimulation der Signaltransduktion mit GM-CSF und IL-3 konnte eine Inhibition der Koloniebildung der transduzierten Zellen gezeigt werden. Im Vergleich dazu ist die Stimulation mit G-CSF, SCF und TPO unabhängig von β -GMR, weshalb hier keine Inhibition beobachtet werden konnte. Diese Studien zeigten, dass primäre humane hämatopoetische Vorläuferzellen durch lentiviralen Gentransfer mit Expressionskassetten für shRNAs ohne Einfluss auf die Proliferation oder Differenzierung der Zellen genetisch modifiziert werden können.

Weitere experimentelle RNAi-Studien zeigten die Suppression onkogener Translokationsprodukte. Heidenreich *et al.* [43] transfizierten Kasumi-Zellen mit anti-AML1/ETO-siRNAs und beobachteten eine Reduktion der mRNA und des Proteins sowie Effekte auf die TGF β - und Vitamin-D3-induzierte zelluläre Differenzierung. Bruno *et al.* [65] schalteten ein weiteres Translokationsprodukt, PML-RAR α , aus, das als Ursache der Promyelocytenleukämie angesehen wird. shRNAs, exprimiert durch den humanen Promotor des Gens für die tRNA(Val), inhibierten die Expression des Fusionsproteins.

Verschiedene Forschergruppen konnten durch Elektroporation von anti-bcr-abl-(b3a2)-siRNAs eine effektive Reduktion der mRNA und des BCR-Abl-Proteins in humanen K562, primären CML- und in transgenen Mauszelllinien zeigen [39; 44; 66]. Ebenfalls konnte eine Inhibition der Zellproliferation humaner b3a2-positiver K562-Zellen nach Transduktion von shRNAs mit lentiviralen Vektoren gezeigt werden [67; 68]. Eine effektive Reduktion der b2a2-mRNA, des Proteins oder eine Inhibition des Zellwachstums b2a2-positiver Zellen durch RNAi konnte bisher nicht gezeigt werden.

Um den BCR-Abl-Signaltransduktionsweg indirekt zu blockieren, kann die Expression assoziierter Proteine inhibiert werden. Ray *et al.* [69] zeigten das siRNA-vermittelte Ausschalten der Hsp70-Expression in K562-Zellen und konnten damit eine signifikant erhöhte Sensitivität der Paclitaxel-induzierten Apoptose demonstrieren.

Ausblick der RNAi in der therapeutischen Anwendung

Mit den neuen RNAi-Technologien ergeben sich somit neue Therapiemöglichkeiten. Das therapeutische Potenzial von siRNAs konnte bereits in Mausmodellen z.B. bei Lebererkrankungen, viralen Infektionen, Sepsis und Tumorwachstum gezeigt werden [25]. Allerdings konnte noch keine geeignete Methode zum effektiven Einschleusen der siRNAs in den menschlichen Organismus gefunden werden. Forschungsschwerpunkte stützen sich auf chemische Modifikationen von siRNAs, damit die Moleküle besser von Zellen aufgenommen werden können und eine hohe Affinität zu Trägermolekülen im Blut besitzen [25]. Eine Alternative ist der viral-vermittelte Gentransfer, bei dem shRNAs nach retro- oder lentiviraler Transduktion in Zellen stabil exprimiert werden. Die Effizienz der Degradation ist dabei abhängig von der Menge der Virusintegrationen. Probleme bestehen darin, dass zu hohe Dosen toxisch auf den Organismus wirken und unklar bleibt, an welchen Orten virale Integrationen stattfinden. Bei klinischer Anwendung des retroviralen Gentransfers entwickelten zwei Kinder mit einer X-chromosomalen SCID-Erkrankung nach retroviraler Transduktion des Knochenmarks Leukämien. Bei beiden Kindern resultierte eine einzelne retrovirale Integration im LMO2-Locus in einer veränderten transkriptionellen Aktivierung [70]. Demzufolge müssen verbesserte virale Vektoren entwickelt werden, um das Risiko zellulärer Transformation durch Insertionsmutagenesen zu verhindern.

Weiterhin therapeutisch sinnvoll ist auch die Kombination der Inhibition der Genexpression mit Proteinantagonisten. Der additive Effekt von siRNAs gegen das bcr-abl-Transkript und den Tyrosinkinaseinhibitor STI571 konnte bereits gezeigt werden [66; 68]. Somit kann der Angriff auf eine Zielstruktur auf unterschiedlichen Ebenen der Entwicklung von Resistenzen vorbeugen [71].

1.5 Retroviral vermittelter Gentransfer

In der vorliegenden Arbeit sollte mit retroviralem Gentransfer stabile siRNA-Expression in hämatopoetischen Zellen erreicht werden. Die effektive Transfektion von siRNA-exprimierenden Plasmiden ist in manchen Zelllinien unzureichend etabliert, oder aber die Zellen können nicht solange in Zellkultur wachsen, wie es für die Selektion positiver Klone und die Kultivierung einer homogenen Population nach Einzelzellklonbildung notwendig ist. Aus diesen Gründen haben bereits verschiedene Forschergruppen retrovirale Vektoren verwendet, um siRNAs in Zellen einzuschleusen. Dabei wurden verschiedene retrovirale Vektoren verwendet: onkoretrovirale Vektoren, unter anderem basierend auf dem *Moloney Murine Leukemia Virus* (MoMuLV) oder dem murinen Stammzellvirus (MSCV), sowie lentivirale Vektoren, basierend auf dem *Human Immunodeficiency Virus-1* (HIV-1).

Lentiviraler Gentransfer

Lentiviren gehören zu den Retroviren, besitzen aber zwei entscheidende Charakteristiken, durch die sie noch breiter anwendbar für den Gentransfer sind als Onkoretroviren. Da Lentiviren auf dem HIV-1 basieren, können sie sowohl proliferierende als auch nicht-proliferierende, post-mitotische Zellen, wie Neuronen, Makrophagen oder hämatopoetische Stammzellen (HSC) infizieren [72]. Der Präintegrationskomplex kann die intakte Kernmembran passieren, während Onkoretroviren die Auflösung der Kernmembran während der Mitose benötigen.

Infektiöse Lentiviren bestehen aus einem diploiden Genom mit zwei einzelsträngigen Plus-RNA-Molekülen und einem Nukleokapsid mit den Proteinen *gag*, *pro* (Protease) und *pol* (RNase H, Reverse Transkriptase und Integrase). Die Virushülle bildet das *env*-Protein. Der Replikationsszyklus des HIV ist in der Abbildung 3 dargestellt.

Im Provirus wird das lentivirale Genom an beiden Seiten durch *Long Terminal Repeats* (LTR) flankiert, die die U5-, R- und U3-Region enthalten. Die 5'-LTR reguliert die virale Transkription durch die zelluläre Polymerase II, während die 3'-LTR Signale für die Polyadenylierung enthält. Verschiedene halb- oder ungespleißte virale RNA-Moleküle werden ins Zytoplasma exportiert und in die viralen Proteine translatiert. Akzessorische Proteine wie die viralen, transkriptionellen Transaktivatoren Tat und Rev aktivieren den 5'-LTR-Promotor oder interagieren mit Regionen des RNA-Transkriptes, z.B. der RRE (Rev Responsive Element). So kann Rev das RNA-Spleißen sowie den RNA-Export ins Zytoplasma kontrollieren. Weitere akzessorische Proteine sind Vpr, Vif, Nef und Vpu [73].

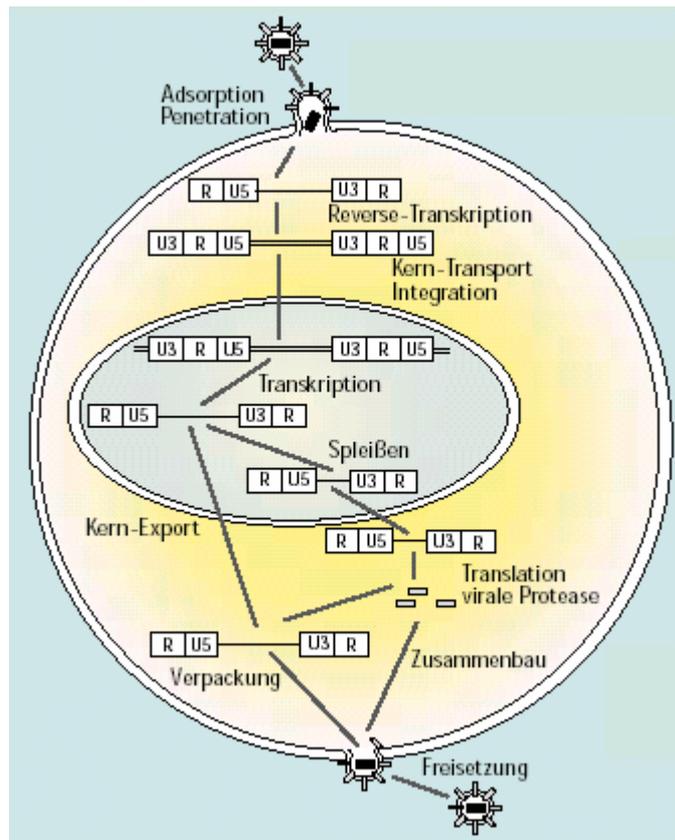


Abb. 3: Replikationszyklus des HIV [74]

Um lentivirale Vektoren experimentell verwenden zu können, musste das Risiko der genetischen Rekombination des Virus gesenkt werden. Deshalb wurden die benötigten lentiviralen Sequenzen getrennt und die Sequenzen für Strukturproteine, Enzyme und die LTR-Regionen auf unterschiedlichen Plasmiden kodiert [75].

Das in dieser Arbeit zur stabilen Expression von shRNAs verwendete Transgen-Plasmid wird von den LTR-Regionen flankiert, die zusätzlich die Expressionskassette mit dem H1-Promotor und der shRNA enthalten. Der 5'-LTR folgt das RRE-Element, sowie eine Expressionskassette für das Rot Fluoreszierende Protein (RFP) unter Kontrolle des *Spleen Focus Forming Virus*-(SFFV)-Promotors und einem vorgeschalteten zentralen Polypurintrakt (cPPT). Dieses Transgen-Plasmid ist ein Derivat des pHR'SINcPPT-SEW-Vektors, mit einem EGFP und folgender WPRE (regulatorisches Element des *Woodchuck Hepatitis Virus*) unter Kontrolle des SFFV-Promotors. Das EGFP-WPRE-Element wurde dann gegen ein RFP ausgetauscht. Das Plasmid gehört zu der Gruppe sich selbst inaktivierender Vektoren (SIN). Diese besitzen eine Deletion in der U3-Region der 3'-LTR, die während der reversen Transkription auf die 5'-LTR übertragen wird. Dadurch kann die Initiation der Transkription nach Integration in das Wirtsgenom nicht mehr erfolgen [76].

Mit dem Ausgangsvektor konnte mehrfach eine effektive Transduktion von hämatopoetischen CD34⁺-Zellen gezeigt werden [73; 77; 78].

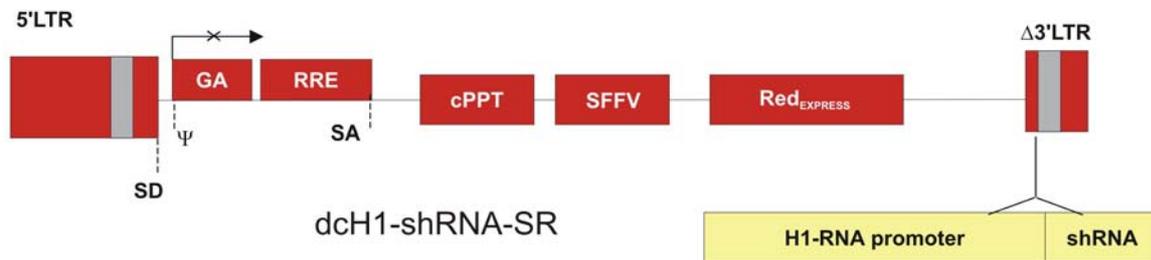


Abb. 4: Schema des lentiviralen Transgens dcH1-shRNA-SR [62]

Das verwendete *Packaging*-Plasmid pCMVΔ8.9.1, das die Sequenzen für die Proteine Gag und Pol kodiert, gehört zur „zweiten Generation“ von lentiviralen Vektoren, aus denen zusätzlich zu verschiedenen Änderungen der ersten Generation die akzessorischen Proteine Vif, Vpr und Nef entfernt wurden [79].

Das *Envelope*-Plasmid enthält die Sequenzen für das Hüllprotein. Das verwendete pMD.G-Plasmid exprimiert das Glykoprotein G des Vesikulären Stomatitis-Virus (VSV.G) unter Kontrolle eines CMV-Promoters. Dieses Hüllprotein ermöglicht die Infektion eines breiten Spektrums an Zielzellen und stabilisiert die virale Hülle der infektiösen Partikel.

Alle drei Plasmide müssen zusammen in eine Zelle transfiziert werden, um infektiöse Viruspartikel zu erzeugen.

Onkoretroviraler Gentransfer

Onkoretroviren sind weniger komplex als Lentiviren. Ihnen fehlen die Sequenzen für regulatorische und akzessorische Proteine. Der Replikationszyklus und die grundlegenden Strukturen für Enzyme und Verpackung gleichen denen der Lentiviren. Am häufigsten wird das MoMuLV für Vektor-Konstruktionen verwendet. Die viralen Gene sind wie beim lentiviralen Gentransfer auf Plasmide für das Transgen, die Hüllstrukturen und die Enzyme aufgeteilt.

Das als Transgen verwendete pBabepuro-Plasmid wurde von Morgenstern und Land [80] mit dem Ziel konstruiert, ein allgemein applizierbares, auf dem MoMuLV basierendes, retrovirales Vektorsystem zu erzeugen. Das pBabepuro-Plasmid trägt zwischen der 5'- und 3'-LTR-Region den SV40-Promotor, unter dessen Kontrolle das Selektionsgen für die Puromycinresistenz steht. Paddison und Hannon [28] verwendeten diesen Vektor für shRNA-

1.6 Das onkogene Fusionsprotein BCR-Abl

1.6.1 Die Funktion des zellulären BCR- und Abl-Proteins

Das BCR-Protein

Das Gen der „Breakpoint Cluster Region“ befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 22 (22q11), ist 130 kB lang und enthält 23 Exons [82]. Zwei verschiedene Transkripte mit 4,5 und 7 kB werden in Proteine mit vielen verschiedenen funktionellen Domänen translatiert [83; 84]. Das Exon 1, das sich in allen bekannten bcr-abl-Fusionsgenen befindet, kodiert für eine Serin-Threoninkinase [85] und für SH2-bindende Domänen. Eine dieser Domänen wird von der SH2-Domäne des Abl-Proteins gebunden und ist somit essenziell für die onkogene Aktivierung von BCR-Abl [86; 87]. Eine andere SH2-bindende Domäne interagiert mit dem Adapterprotein Grb2, ein für den Ras-Signaltransduktionsweg essenzielles Protein [88]. Die dritte funktionelle Domäne im Exon 1 kann Homotetramere bilden und ist an der Lokalisation des BCR-Abl-Proteins im Zytoplasma durch verstärkte F-Aktinbindung beteiligt [89]. Die zentralen und C-terminalen Domänen des BCR-Proteins interagieren auf unterschiedliche Weise mit G-Proteinen. Diese Proteine sind essenziell in intrazellulären Signalwegen, bei der Organisation des Zytoskeletts, für Zellwachstum und -entwicklung [90]. Domänen der Exons 3-10 des BCR-Gens enthalten Homologien zu den Nukleotidaustauschfaktoren Cdc24, Dbl und Vav [91; 92]. Cdc24, ein Zellzyklusgen der Hefe, und das humane Gegenstück Dbl kodieren für ein Zellzykluskontrollprotein. Cdc24 spielt eine Rolle in der Organisation des Zytoskeletts und Zytoplasmas und agiert als GDP-GTP-Austauschfaktor für Ras-ähnliche G-Proteine [93]. Ein GAP-Protein der Rho-GTPase-Familie besitzt strukturelle Ähnlichkeit zum C-Terminus des BCR-Gens. Proteine der Rho-Familie gehören zu den Ras-Proteinen und sind für die Verknüpfung extrazellulärer Signale mit der Reorganisation des Zytoskeletts verbunden [94; 95].

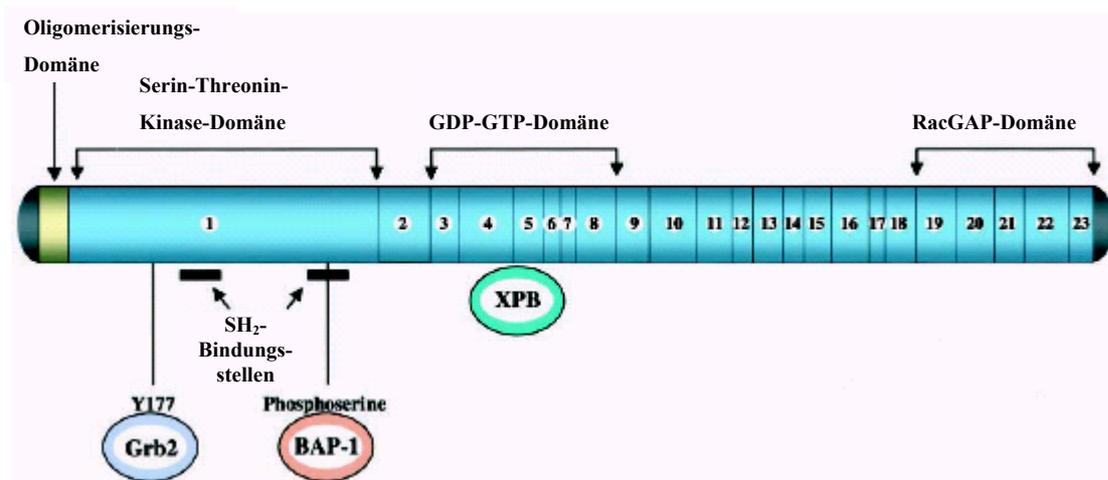


Abb. 6: Schematische Darstellung des BCR-Proteins. Funktionelle Angriffspunkte einschließlich einer Serine-Threoninkinase-Domäne in Exon 1, eine zentrale GDP-GTP-Austausch-Domäne und eine C-terminale GAP-Domäne. SH2-bindende Stellen befinden sich ebenfalls im Exon 1. Das 14-3-3-Protein (Bap-1) interagiert ebenfalls mit einer dieser Phosphorylierungsstellen von Abl. Grb2 ist mit einer weiteren proximalen SH2-bindenden Stelle assoziiert, die das Phosphotyrosin an Position 177 enthält. Die GDP-GTP-Austausch-Domäne interagiert mit dem XPB-DNA-Reparaturprotein [95].

Das c-Abl-Protein

Das c-abl-Gen wurde zuerst als zelluläres Homologon des transformierenden Gens des Abelson murinen Leukämievirus auf dem langen Arm des Chromosoms 9 (9q34) identifiziert [96]. Das c-abl-Gen wird in Säugerzellen ubiquitär exprimiert und besitzt zwei alternative Exons am 5'-Ende mit separaten Promotoren. Diese generieren mRNAs mit 5 bzw. 6,5 kB, die wiederum zu Proteinen mit verschiedenen N-Termini führen. Die einzelnen funktionellen Domänen des c-Abl-Proteins sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

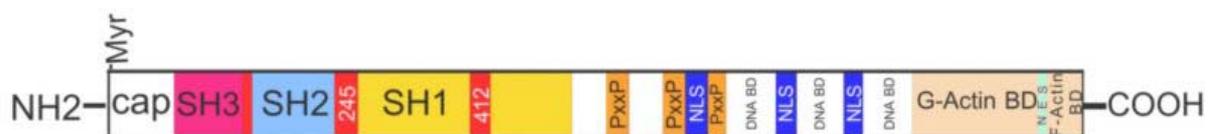


Abb. 7: Struktur des c-Abl-Proteins. Nach dem N-Terminus mit einer Myristolierungsstelle folgen die c-Src-homologen SH3, SH2 und SH1-Domänen, wobei die SH1-Domäne die Tyrosinkinasefunktion trägt. Die Mitte des Proteins bilden Prolin-reiche Regionen (PxxP), Kernlokalisierungssignale (NLS) und DNA-bindende Domänen (DNA-BD). Am C-Terminus des Proteins befinden sich G- und F-Aktin-bindende Domänen sowie das Kernexportsignal (NES) [97].

Die meisten bekannten Tyrosinkinasen sind in der Nähe der Plasmamembran oder im Zytoplasma lokalisiert. Die c-Abl-Tyrosinkinase dagegen kann sowohl im Zellkern [98] als auch im Zytoplasma nachgewiesen werden [99]. Die verschiedenen Lokalisationen des c-Abl-Proteins werden durch drei Kernlokalisierungssignale (NLS) und ein zusätzliches Kernexportsignal (NES) reguliert. Im Zytoplasma ist die Lokalisation mit F-Aktin assoziiert, das an eine mit NES überlappende Region bindet [96; 99]. Zusätzlich gewährleistet eine

Myristoylgruppe am N-Terminus des I β -Proteins die Lokalisation an der inneren Oberfläche der Plasmamembran [100].

Durch die Beweglichkeit des Proteins innerhalb der Zelle ist es möglich, verschiedene Signale als Antwort auf unterschiedliche physiologische Stimuli zu übertragen. Demnach hat auch c-Abl in jeder Lokalisation eine andere Funktion. Im Zytoplasma wird die Kinaseaktivität durch Integrin-vermittelte Zelladhäsion gesteuert [101] und die Interaktion mit dem F-Aktin-Zytoskelett beschrieben. *In vivo* konnten aber nur geringe c-Abl-Konzentrationen im Zytoplasma gemessen werden. Daher scheint es nicht essenziell modifizierend auf die Aktine zu wirken. In Abl^{-/-}-Fibroblasten wurde eine signifikant reduzierte c-Crk-Kinaseaktivität, beobachtet, wonach c-Abl Hauptregulator von Crk *in vivo* sein muss [102].

Das nukleäre c-Abl ist involviert in die Regulation der Genexpression und des Zellzyklus. Ein Teil des nukleären c-Abl ist in der G1-Phase des Zellzyklus mit dem Retinoblastoma-Protein (Rb) komplexiert. Dabei bindet Rb an die ATP-bindende Region der Kinasedomäne und inhibiert somit die Kinaseaktivität. Die Phosphorylierung von Rb im Übergang von der G1- zur S-Phase gibt c-Abl wieder frei und führt zur Aktivierung des c-Abl in der S-Phase. Das Protein kann nun RNA-Polymerase II phosphorylieren und die Transkription von S-Phase-Genen stimulieren. Andere Studien zeigten nach Überexpression von c-Abl die Apoptose durch Induktion eines Wachstumsstops in der G1-Phase [103; 104; 105].

c-Abl hat außerdem DNA-bindende Aktivität, vermittelt durch drei Tandemrepeats DNA-bindender Domänen. Die funktionelle Signifikanz der DNA-bindenden Aktivität von c-Abl ist nicht bekannt. Obwohl c-Abl keine intrinsische Transkriptionsaktivität besitzt, können c-Abl und v-Abl mit Transkriptionsfaktoren komplexieren und so Transkriptionsaktivitäten modulieren. Die DNA-bindende Aktivität wird auch als Antwort auf DNA-Brüche diskutiert [105].

Ionisierende Strahlung (IR) und alkylierende Chemotherapeutika wie Mitomycin C scheinen die Kinaseaktivität von c-Abl 3- bis 5-fach zu erhöhen [105]. Auch andere Studien demonstrierten die Interaktion (und Phosphorylierung) von c-Abl mit anderen Proteinen wie z.B. ATM als Antwort auf ionisierende Strahlung [105]. Die Aktivierung der Kinase führt zur Phosphorylierung verschiedener Substrate, wie Rad51 oder DNA-PK [106]. Allerdings konnten in abl^{-/-}-Zellen keine Fehler bei der Reparatur von DNA-Brüchen festgestellt werden. Das führt zu der Überlegung, dass c-Abl in bestimmten Zellen nur eine untergeordnete Rolle in der DNA-Reparatur und im Zellzyklus übernimmt, die durch andere Proteine kompensiert werden können.

Abl-defiziente Mäuse besaßen eine verkürzte Lebenszeit und verschiedene Fehlbildungen, u.a. Milz- und Thymusathrophien mit einer 10-30-fach erniedrigten Zahl von reifen B- und T-Lymphozyten. Ergebnisse von Transplantationsversuchen mit diesen Mäusen ließen vermuten, dass sowohl stromale als auch hämatopoetische Defekte für die erniedrigte Lymphozytenzahl verantwortlich sind [105].

1.6.2 Die Chronisch Myeloische Leukämie (CML)

Die CML wird nach WHO-Richtlinien als Myeloproliferatives Syndrom klassifiziert und ist cytogenetisch durch das Philadelphia-Chromosom (Ph) definiert. Dieses entsteht durch die Translokation eines Bruchstückes des Chromosom 9 auf das Chromosom 22. Das mediane Alter der CML-Patienten liegt bei Erstdiagnose zwischen 45 und 55 Jahren. Die Hälfte aller CML-Fälle sind Zufallsbefunde bei Routineuntersuchungen. Bei 80% der Patienten wird die Diagnose in der chronischen Phase gestellt. Charakteristische klinische Symptome sind Müdigkeitserscheinungen, Gewichtsverlust und Völlegefühl sowie palpable Splenomegalie. Diese Patienten haben oft Leukozytosen, Thrombozytosen, Anämien, Eosino- und Basophilien oder eine erniedrigte alkalische Leukozytenphosphatase (ALP). Ihr Knochenmark ist histologisch durch eine vermehrte Zellularität gekennzeichnet.

Bei der CML werden drei Stadien unterschieden. Die erste ist die chronische Phase mit den Leitsymptomen Leukozytose und Splenomegalie, gefolgt von der Akzelerationsphase (Übergangsphase) mit zunehmender Leukozytose und vermehrtem Auftreten unreifer Vorläuferzellen im Knochenmark und peripheren Blut. In der dritten Phase, dem so genannten Blastenschub, werden aus dem Knochenmark unreife Vorstufen von Blutzellen (Myeloblasten und Promyelozyten) in großer Zahl in das Blut abgegeben. Eine Blastenkrise liegt definitionsgemäß dann vor, wenn der Blastzellanteil im Blut über 30% bzw. im Knochenmark über 50% beträgt. Der Verlauf dieser dritten Phase gleicht einer akuten Leukämie und es kommt zur dramatischen Verschlechterung der Symptome. Die mittlere Überlebensdauer beträgt dann nur noch zwei bis vier Monate.

Steht die Diagnose fest, wird in allen Stadien der Erkrankung sofort behandelt. Die Therapie der ersten Wahl ist heute der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib¹. Dieser wird allein oder zusammen mit den Medikamenten Interferon- α (IFN- α) und Cytarabin (Ara-C) eingesetzt. Bei der Imatinib-Therapie kommt es bei 95% der Patienten in der chronischen Phase zu einer hämatologischen, und bei 60% zu einer cytogenetischen Remission (<35% Ph+-Zellen).

¹ Imatinib entspricht auch den Bezeichnungen CGP-57148, STI571, Glivec und Gleevec.

Befinden sich die Patienten bereits in der Phase des Blastenschubs, so zeigt sich nur bei 31% der Patienten eine hämatologische, und bei 15% eine cytogenetische Remission.

Eine Heilung der CML kann nach heutigen Erkenntnissen nur durch eine allogene Knochenmarkstransplantation erreicht werden. Diese ist nur möglich, wenn zuvor ein geeigneter Knochenmarkspender gefunden wurde. Die Überlebensraten sind von Patientenfaktoren wie dem Alter, dem Krankheitsstadium der CML, der verstrichenen Zeit seit Erstdiagnose, sowie von Spenderfaktoren abhängig, bei denen entscheidend ist, ob es sich um einen Familien- oder Fremdspender handelt, und in welcher Geschlechterkombination Spender und Empfänger zueinander stehen (Gratwohl-Score) [107; 108].

1.6.3 Biologie der Bcr-abl-Translokation

Die Translokation des Philadelphia-Chromosoms t(9;22)(q34;q11) lässt verschiedene bcr-abl-Fusionsgene entstehen. Die Bruchpunkte im c-abl-Gen befinden sich in einer langen Region zwischen Exon 1 und Exon 2. Nach post-transkriptionellem Spleißen entstehen Fusionen zu verschiedenen Regionen im BCR-Transkript. Die Transposition von c-abl auf die M-bcr-Region (*major* bcr) zwischen den Exons 12 und 16 resultiert in einer 8,5 kB großen mRNA, welche für ein Protein mit 210 kD kodiert. Durch alternatives Spleißen entstehen Fusionstranskripte mit b2a2- oder b3a2-Verknüpfungen (jetzt auch e13a2 und e14a2). In den meisten Patienten mit Ph⁺-ALL liegt der Bruchpunkt in der m-bcr-Region (*minor* bcr). Die Translation des e1a2-Transkripts resultiert in einem Protein mit 190 kD. Ein dritter Bruchpunkt zwischen den Exons 19 und 20 (μ -bcr) bringt eine e19a2-mRNA mit einem 230kD-Protein hervor. Die Expression des p230^{BCR-Abl}-Proteins wird mit der chronischen neutrophilen Leukämie assoziiert. Alle Proteine zeigen eine konstitutive Tyrosinkinaseaktivität [97].

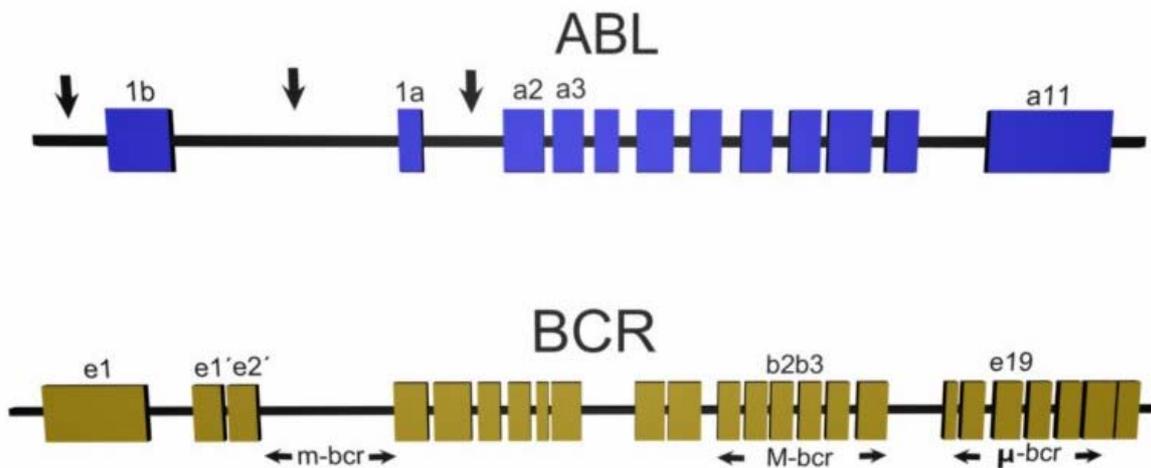


Abb. 8: abl- und bcr-Genstruktur [97]

Verschiedene Strukturmerkmale des Fusionsproteins sind entscheidend für die maligne Transformation der BCR-Abl-positiven Zellen. Die Tyrosinkinase befindet sich in der Src-homologen Domäne 1 (SH1) der Abl-Komponente des BCR-Abl-Proteins. Weitere wichtige Motive des Abl-Teils sind die SH2- und SH3-Domänen und die C-terminale Aktin-bindende Domäne. Im BCR-Teil ist das *coiled-coil*-Motiv des Exon 1 des bcr-Gens verantwortlich für die Tetramerisierung des Onkoproteins, wodurch es zur gegenseitigen Phosphorylierung der Tyrosinreste der angrenzenden BCR-Abl-Moleküle kommt. N-terminale Phosphoserin- und Phosphothreoninreste sind für die Interaktion mit Proteinen mit SH2-Domänen wie auch Abl notwendig [109].

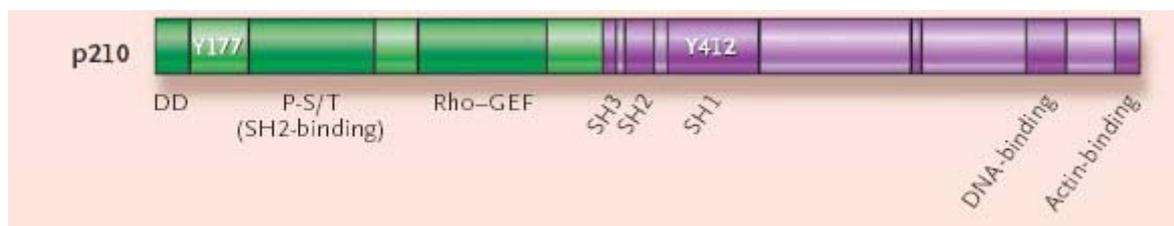


Abb. 9: Struktur des BCR-Abl-Proteins [109]

Durch die Tyrosinkinaseaktivität kommt es zur Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege, die in verschiedenen Publikationen ausführlich dargestellt werden [97]. Einige von ihnen sollen nachfolgend kurz skizziert werden:

- **Ras-MAP-Kinaseweg**

Die Phosphorylierung der Aminosäure 177 des BCR-Proteinanteils ermöglicht die Bindung des Adaptormoleküls Grb2 [88]. Dadurch wird Ras in seiner aktiven GTP-gebundenen Form stabilisiert. Ras wiederum aktiviert die Serin-Threonin-Kinase Raf, gefolgt von der Aktivierung von Mek1/2 und Erk. Dieser Signaltransduktionsweg wird auch durch Cytokine wie IL-3 und GM-CSF positiv reguliert [110]. Neben dem Ras/Raf-Weg wird auch der MAP-Kinaseweg durch BCR-Abl aktiviert.

- **Jak-STAT-Signaltransduktion**

Die konstitutive Phosphorylierung von STAT-Transkriptionsfaktoren (STAT-1 und STAT-5) wurde in BCR-Abl-exprimierenden Zelllinien und primären CML-Zellen detektiert und zeigt antiapoptotische Funktionen durch transkriptionelle Aktivierung von Bcl-X_L [97; 111].

Die Rolle der Janus-Kinase2 (JAK-2) bei der malignen Transformation BCR-Abl-positiver Zellen ist weniger geklärt, aber die Bindung von Cytokinen und Wachstumsfaktoren (IL-3, GM-CSF) resultiert in Autophosphorylierung von JAK-2 und Aktivierung des JAK-2- und STAT-5-Signaltransduktionsweges [112]. In K562-Zellen konnte ein verringerter onkogener Effekt von BCR-Abl nach Transfektion einer JAK-2-Kinase-inaktiven Form gezeigt werden [113].

Die Rolle der Ras- und JAK/STAT-Signaltransduktionswege als Antwort auf Cytokine kann die Beobachtung erklären, dass BCR-Abl eine Wachstumsfaktor-Unabhängigkeit bei ursprünglich Wachstumsfaktor-abhängigen Zelllinien induziert. Experimentell konnte gezeigt werden, dass BCR-Abl eine autokrine Sekretion von IL-3 und G-CSF in frühen Vorläuferzellen induziert [114]. Außerdem induziert die BCR-Abl-Tyrosinkinaseaktivität die Expression von Wachstumsfaktor-Rezeptoren wie dem Onkostatin M-β-Rezeptor [97].

- **PI3-Kinase-Weg**

BCR-Abl bildet Komplexe mit der PI3-Kinase, Cbl und den Adaptermolekülen Crk und Crkl, wodurch die PI3-Kinase aktiviert ist [115]. Die Phosphorylierung der Serin-Threoninkinase Akt inaktiviert durch weitere Phosphorylierung das pro-apoptotische Protein Bad. Dieses Protein wird von 14-3-3-Proteinen eingeschlossen und kann nicht an Bcl-X_L binden [116; 117; 118].

- **c-Myc-Überexpression**

Das Myc-Protein ist ebenfalls in vielen humanen malignen Erkrankungen überexprimiert. Die Aktivierung von Myc durch BCR-Abl ist von der SH2-Domäne abhängig, aber der genaue Signaltransduktionsweg ist noch ungeklärt [119].

- **Apoptoseinhibition durch ICSBP-Reduktion**

Frühere Untersuchungen zeigten eine Reduktion des Interferon Consensus Sequenzbindenden Proteins (ICSBP) in BCR-Abl-positiven Zellen. ICSBP ist in die Apoptoseinduktion involviert. ICSBP-negative Mäuse entwickeln ein myeloproliferatives Syndrom ähnlich zur CML [97].

- **Veränderte Adhäsionseigenschaften**

Bei der Interaktion von Stromazellen und Vorläuferzellen spielen Integrine eine essenzielle Rolle. CML-Zellen exprimieren eine Adhäsions-inhibitorische Variante des $\beta 1$ -Integrins, die in normalen Vorläuferzellen nicht vorkommt [120]. Weiterhin phosphoryliert BCR-Abl CrkL [115], das mit anderen Adhäsionsmolekülen wie Paxillin, Fak und Hef1 assoziiert ist [97].

So besitzen BCR-Abl-positive Zellen eine erhöhte Rate spontaner Motilität [121] und eine verringerte Adhäsion zu Stromazellen des Knochenmarks und der extrazellulären Matrix [122].

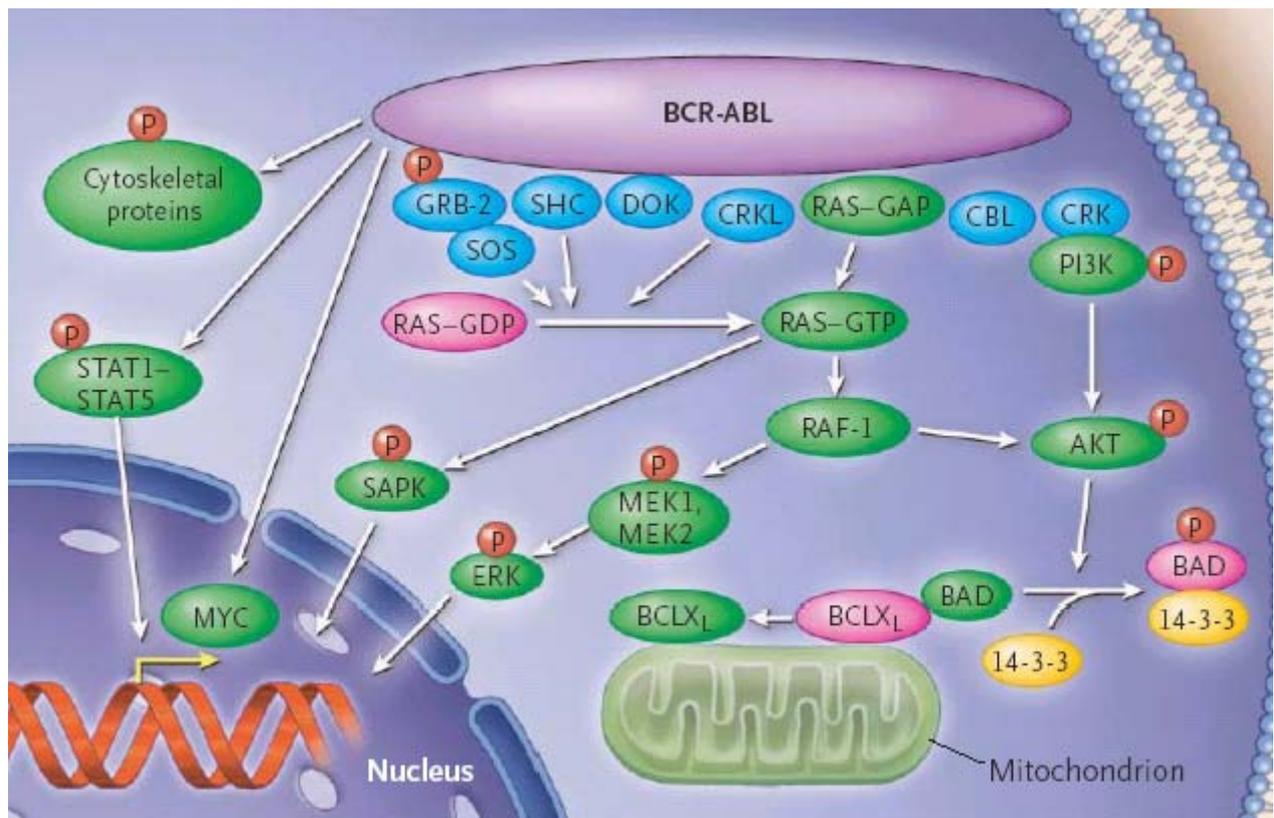


Abb. 10: Aktivierte Signaltransduktionswege in BCR-Abl-positiven Zellen. Das Diagramm stellt verschiedene Signaltransduktionswege nur vereinfacht dar. Viele weitere Assoziationen von BCR-Abl und Signalproteinen wurden berichtet [109].

Die aktivierten Signaltransduktionswege und das veränderte Adhäsionsverhalten BCR-Abl-positiver Zellen führt zur malignen Transformation hämatopoetischer Zelllinien. So konnte in verschiedenen Experimenten gezeigt werden, dass die Expression von BCR-Abl in den murinen Zelllinien Ba/F3 und 32D sowie der humanen Zelllinie Mo7 zur kompletten Faktorunabhängigkeit führt [123; 124]. Die Transduktion von murinem Knochenmark mit BCR-Abl und dessen Transplantation in syngene Empfänger führte bei einem Drittel der Mäuse zu malignen hämatologischen Erkrankungen. Dabei trat gehäuft ein CML-ähnliches myeloproliferatives Syndrom auf [125]. Klucher *et al.* [126] etablierten eine murine TonB210.1-Zelllinie mit Tetrazyklin-induzierbarer BCR-Abl-Expression. Balb/c-Mäuse, denen diese Zellen subkutan injiziert wurden, wiesen ein ebenfalls Tetrazyklin-abhängiges Tumorwachstum auf. Mit optimierten Transduktions- und Transplantationstechnologien konnten zwei Forschergruppen eine myeloproliferative Erkrankung in 100% der Empfänger erreichen [127; 128].

Im Rahmen der BCR-Abl-induzierten Signaltransduktionswege und der malignen Transformation von Zellen wurde bereits das Faktor-unabhängige Wachstum von BCR-Abl-positiven Zellen genannt. Einerseits initiiert in den Zellen BCR-Abl die Cytokin-vermittelte Signaltransduktion, andererseits kommt es zusätzlich zur veränderten Produktion von hämatopoetischen Cytokinen wie IL-3, G-CSF und GM-CSF in diesen Zellen [114; 129]. Die Untersuchung von Ph-positiven primitiven Vorläuferzellen zeigte die Expression von IL-3- und G-CSF-Transkripten, die teilweise mit IL-3-Antikörpern inhibiert werden konnte [114]. Li *et al.* untersuchten die autokrine und parakrine Produktion von IL-3 und GM-CSF in der Pathogenese von BCR-Abl-induzierter CML-ähnlicher Leukämie in Knochenmarkstransplantations- und Transduktionsexperimenten. Mäuse mit homozygoter Inaktivierung des IL-3, des GM-CSF-Gens oder beider Gene wurden als Spender oder Empfänger verwendet. Weder IL-3 noch GM-CSF waren für die Induktion einer CML-ähnlichen Erkrankung durch BCR-Abl notwendig. Trotzdem konnten erhöhte IL-3-Werte bei den Empfängermäusen als Reaktion auf die Erkrankung beobachtet werden [130]. Andere experimentelle Studien zeigten, dass es bei primitiven CML-Vorläuferzellen zu einer Erhöhung der IL-3-Transkripte beim Übergang von der Ruhephase in den aktiven Zellzyklus kam [131].

Zusammenfassend kristallisieren sich drei wichtige Funktionen für die biologische Aktivität des BCR-Abl-Proteins heraus: Es verändert die Adhäsionseigenschaften der Zelle, es initiiert Signalübertragungswege in ähnlicher Weise wie verschiedene Wachstumsfaktoren und stimuliert so die Zellproliferation, und es zeigt starke anti-apoptotische Eigenschaften und vermindert so den apoptotischen Zelltod.

1.6.4 Therapie der CML auf molekularer Ebene

Verschiedene Angriffspunkte in molekularen Therapieansätzen führen zur Inhibition der BCR-Abl-Funktion. Der Vorteil gegenüber der konventionellen Chemotherapie ist der gezielte Angriff auf das durch die Translokation entstandene und damit für die malignen Zellen spezifische BCR-Abl. Da gezeigt werden konnte [126], das BCR-Abl und die Tyrosinkinaseaktivität notwendig und hinreichend für die Myeloproliferation in der Zellkultur und im Mausmodell sind, können durch BCR-Abl-Degradation oder Tyrosinkinaseinhibition effektiv wirkende Therapeutika entwickelt werden.

Die Degradation der bcr-abl-mRNA durch Antisense-Oligonukleotide (asODN) führte in einem Mausmodell in Kombination mit Cyclophosphamid zur Heilung von 50% BCR-Abl-positiver Mäuse [132]. Diese Therapieform hat bisher jedoch keine klinische Relevanz [133]. Weitere vielversprechende Therapieansätze, wie die Verwendung von Adaphostinen, Inhibitoren des für die Faltung von BCR-Abl erforderlichen Chaperons (HSP90), Src-Kinase- und Farnesyltransferaseinhibitoren werden untersucht [109].

Inhibition der Tyrosinkinaseaktivität

Die Inhibition der Tyrosinkinaseaktivität zeigte bisher die größten Erfolge in der Therapie. Das Medikament STI571 wird bereits klinisch angewendet. In experimentellen Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde es als Positivkontrolle und zur Überprüfung des BCR-Abl-abhängigen Wachstums von Zelllinien verwendet.

Erste Versuche wurden mit Substanzen wie z.B. Herbimycin A durchgeführt, das aus *Streptomyces*-Arten isoliert wurde [134]. Danach wurde eine Klasse von Tyrosinkinaseinhibitoren, die 2-Phenylaminopyrimidin-Derivate, synthetisiert und auf den Grad der Inhibition hin selektiert [135]. Die Inhibition war um so größer, je mehr die Verbindung aufgrund ihrer Struktur in der Lage war, mit ATP zu konkurrieren. Die Optimierung dieser Verbindungen führte zur Detektion des CGP-57148 bzw. STI571. Die Verbindung inhibiert selektiv Abl, *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF)-Rezeptortyrosinkinasen und den Stammzellfaktor-Rezeptor c-Kit [136]. Die Inhibition der BCR-Abl-Tyrosinkinasaktivität führt in Ph-positiven Zellen zum apoptotischen Zelltod. Druker *et al.* [137] untersuchten den Effekt auf p210^{BCR-Abl}-transfizierte Zellen im Vergleich zu BCR-Abl-negativen Zellen der gleichen Zelllinie. Sie konnten eine spezifische Inhibition der zellulären Proliferation der p210^{BCR-Abl}-exprimierenden Zellen zeigen. Weiterhin führte die Verbindung zu einer 92-98%igen Verringerung koloniebildender Einheiten primärer Zellen von CML-Patienten. STI571 inhibierte das Zellwachstum von Zellen, die p185^{BCR-Abl}

und TEL/Abl exprimieren [138]. Die selektive Suppression des Wachstums von BCR-Abl-positiven Zellen konnte auch in Mäusen gezeigt werden [139]. Somit schien STI571 für eine erfolgreiche Behandlung Ph-positiver Leukämien geeignet zu sein und wurde in klinischen Studien überprüft. Phase I-Studien wurden mit CML-Patienten in der chronischen Phase durchgeführt, die nicht mehr auf IFN- α reagierten. STI571 zeigte eine geringe Toxizität, aber eine hohe Effizienz. Alle Patienten, die mit 300mg/d oder mehr behandelt wurden, zeigten eine komplette hämatopoetische Remission [140; 141]. Zusätzliche Phase II-Studien erzielten bei einer Hälfte behandelter CML-Patienten in der Blastenkrise bzw. bei einem Drittel behandelter Ph-positiven ALL-Patienten eine hämatologische Remission [142; 143]. Obwohl in vielen Patienten die Remission nicht dauerhaft erhalten blieb, ist dennoch das Medikament, welches oral appliziert werden kann und wenig toxisch ist, ein großer Fortschritt für die Behandlung dieser Risikogruppen. In einer internationalen randomisierten Studie (IRIS) wurde bei neu diagnostizierten CML-Patienten der Therapieerfolg bei kombinierter Gabe von IFN- α und Ara-C im Vergleich zur Behandlung mit Imatinib untersucht. Bei 74% der Imatinib-Therapien wurde eine komplette cytogenetische Remission erreicht, im Gegensatz dazu nur bei 8,5% der Patientengruppe, die mit IFN- α und Ara-C therapiert wurden. Somit stellt Imatinib derzeit die Therapie der 1. Wahl bei allen diagnostizierten CML-Erkrankungen dar [144].

In weiteren klinischen Studien wird STI571 in Kombination mit anderen antileukämischen Medikamenten getestet [145]. Eine Kombinationstherapie erscheint sinnvoll, weil in einigen Patienten bereits eine STI571-Resistenz mit Reaktivierung der BCR-Abl-Kinase beobachtet wurde. Die Untersuchung molekularer Mechanismen zeigen Mutationen in der Kinasedomäne von BCR-Abl oder zu hohe BCR-Abl-Expression als Resistenzverursacher [146; 147; 148]. Demzufolge ist es zweckmäßig, weitere Therapieansätze zu entwickeln, die sowohl in Kombination mit STI571 als auch allein eine signifikante Reduktion des BCR-Abl-Proteins oder seiner Aktivität zeigen.

1.7 Zielsetzung und Aufgabenstellungen

Das Hauptziel der Arbeit besteht darin, einen effektiven Suppressor der bcr-abl-mRNA zu finden, um somit eine weitere Therapiemöglichkeit für CML-Patienten zu eröffnen.

Dieses Ziel soll zunächst durch Selektion von Peptiden, die spezifisch die RNA-Struktur erkennen, mit der *Phage Display*-Methode erreicht werden. Folgende Teilziele können formuliert werden:

- die *in vitro*-Transkription der b3a2-RNA sowie von RNAs als Negativkontrollen mit anschließender Biotinylierung
- Selektion von Phagen in mehreren Selektionsrunden
- die Überprüfung der spezifischen Bindung der Phagen in einem ELISA-Verfahren
- die Identifizierung der selektierten Peptide durch Sequenzierung
- Klonierung eines bcr-abl-GFP-Fusionsgens zur späteren Überprüfung der Suppression *in vivo*
- Überprüfung der Stabilität der mRNA-Sekundärstruktur durch enzymatisches *Probing*

In einem zweiten Ansatz soll versucht werden, das Ziel der Arbeit durch den Einsatz von sequenz-spezifischen siRNAs gegen die b2a2-Variante zu erreichen. Er kann in folgende Teilziele unterteilt werden:

- das Konstruieren und Testen einer effektiven siRNA
- das effiziente Einschleusen der siRNA in verschiedene hämatopoetische Zelllinien
- die Erzeugung von transienten und stabilen RNAi-Effekten
- die genaue Detektion der Reduktion der mRNA und des Proteins
- die Überprüfung der Spezifität der siRNA.

Um die Zugänglichkeit der mRNA beurteilen zu können, sollen theoretische RNA-Sekundärstrukturanalysen durchgeführt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Alle im Folgenden aufgeführten Firmen haben, falls nicht anders angegeben, ihren Sitz in Deutschland.

2.1.1 Geräte

ABI PRISM® 7000	Applied Biosystems, Weiterstadt
ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Weiterstadt
Agarosegelelektrophoreseapparatur	Forschungswerkstätten, MHH
Bilddokumentationssystem	Polaroid MP4 Land Camera, Offenbach
Blockthermostat BT 100	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden
Eppendorf Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Blotkammer, Semidry Blot	Multiphor II, Pharmacia, Uppsala, S
Brutschränke	Heraeus Sepatech, Osterode
Durchflusszytofluorometer	Becton Dickinson, FACSCalibur, Heidelberg
Elektroporator	EPI2500, Elektroporations-Impulsgenerator, Dr. L. Fischer, Heidelberg
ELISA-Reader	Model 3550 Microplate reader, Japan
Eppendorf Centrifuge 5417R	Eppendorf AG Hamburg
Eppendorf Centrifuge 5415D	Eppendorf AG Hamburg
Biofuge 13	Heraeus Sepatech, Osterode
Fluoreszenzmikroskop	Nikon Eclipse TE 300, Düsseldorf
Hybridisierungsöfen	Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen
Kühlzentrifuge	Beckman J2-MC, Glenrothes, UK
Lichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss Jena
Lichtmikroskop Olympus CK2	Optical Co. Japan
PAA-Gelelektrophoreseapparatur	Mini-PROTEAN II cell, BioRad, Hercules, USA
PCR-Thermocycler, versch. Modelle	Landgraf, Langenhagen Biometra, Göttingen
Pipetten, versch. Modelle	Applied Biosystems, Weiterstadt Pipetman abimed, Langenfeld Eppendorf 4710, 0,5-10µl, Eppendorf AG, Hamburg
Schüttelinkubator	Gerhardt, Königswinter
Spannungsgeräte	EPS 301, Amersham, Braunschweig E815, 1200V-500mA, Consort, Turnhout, B PS 3002, Life technologies
Ultrazentrifuge	Optima LE-80K Ultrazentrifuge, Beckman, USA
UV-Cross-linker	Stratalinker 1800, Stratagene, La Jolla, USA
UV-Strahler	Benda, Wiesloch
Vortexer	Vortex-genie 2, Scientific Industries, Bohemia, USA
Wasserbad	BLB-Braunschweiger Laborbedarf, GFL, Burgwedel
Zellzählgerät	Beckman Coulter AC.T 8, Krefeld
Zentrifuge für Falconröhrchen	Megafuge 1.0R, Heraeus Sepatech, Osterode

2.1.2 Software

FACSCalibur Becton Dickinson	CellQuest 3.1f
ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer	GeneScan® Analysis Software Sequencing Analysis Software Data Collection Software
ABI PRISM® 7000 Sequenzanalysen	Sequence Detection Software GeneRunner Chromas
Sekundärstrukturvorhersage	RNAfold < ma.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi >

2.1.3 Verbrauchsmaterial

96-well Optical Reaction Plate	Applied Biosystems, Weiterstadt
Deckgläschen	Menzel-Gläschen
Einfrierröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Einmalpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorfreaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Falconröhrchen 50ml/15ml	Nunc, Wiesbaden
Filme	Kodak, Rochester, USA
G25-Säule	Roche, Mannheim
Gene Pulser E.coli Cuvette, 0,1cm	Bio-Rad, Hercules, USA
Glaszylinder mit Stopfen für Blot-Hybr.	Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen
Hybond-N, Hybond-N+-Membran	Amersham, Braunschweig
Kieselgel 60F, DC-Alufolie	Merck, Darmstadt
Kodak BioMax cassette	Kodak, Rochester, USA
Küvetten 0,4cm Ø	Biozym, Hess. Oldendorf
Magnetic Particle Concentrator for Microtubes, MPC-M	DYNAL, Oslo, Norway
Microamp 96-well Tube/Tray/Retainer Assembly	Applied Biosystems, Weiterstadt
Microamp Caps 12 Caps/Strip	Applied Biosystems, Weiterstadt,
Multipipettenaufsätze combitips	Eppendorf, Hamburg
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Sephadex-G25-Säulen	Roche, Mannheim
Spritzen 10ml, 5ml, 2ml	Braun, Melsungen
Spritzen 50ml	Fresenius Kabi, Friedberg
Sterilfilter Millex-HV, 0,45µm	Millipore, Carrigtwahill, Ireland
Whatman-Papier 3mm, CHR	Whatman, Maidstone, England
Zählkammern	Neubauer, Marienfeld
Zellkulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturplatten	Nunc, Wiesbaden

2.1.4 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 40%	Bio-Rad, Hercules, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Chemicals, Deisenhofen
Aqua dest. (Ampuwa)	Fresenius Kabi AG, Bod Homburg
Biotin	MoBiTec, Göttingen
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	Sigma Chemicals, Deisenhofen
Calciumchlorid	Sigma Chemicals, Deisenhofen
Chloroform	J.T. Baker, Deventer, Holland
DAPI	Roche, Mannheim
Dextransulfat 500, Na-Salz	Serva, Heidelberg
Dimethylformamid	USB, Ohio, USA
EDTA	Serva, Heidelberg
Essigsäure	J.T. Baker, Deventer, Holland
Ethanol	J.T. Baker, Deventer, Holland
Ethidiumbromid	Sigma Chemicals, Deisenhofen,
Ficoll	Sigma Chemicals, Deisenhofen
Formamid	USB, Bad Homburg
Glykogen (20mg/ml)	Roche, Mannheim
Harnstoff	Sigma Chemicals, Deisenhofen
Hepes	Sigma Chemicals, Deisenhofen
Herings-DNA	GibcoBRL, Eggenstein
2-Mercaptoethanol	Sigma Chemicals, Deisenhofen
Morpholinopropansulfonsäure	Roche, Mannheim
Natriumchlorid	Calbiochem, Bad Soden
Natriumsulfat	Sigma Chemicals, Deisenhofen
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Invitrogen, Karlsruhe
Polyvinylpyrrolidon	Sigma Chemicals, Deisenhofen
Propidiumiodid	Fluka, Taufkirchen
SDS 10%	GibcoBRL, Eggenstein
SeaKem ME Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Sucrose	Serva, Heidelberg
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
Xylencyanol	Sigma Chemicals, Deisenhofen

Alle weiteren verwendeten Chemikalien wurden von Merck, Darmstadt, bezogen.

2.1.5 Puffer und Stammlösungen

Zellkultur

Cell Dissociation Buffer Enzyme free / PBS-based		Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco's MEM with Glutamax (DMEM)		GibcoBRL, Eggenstein
RPMI 1640 with L-Glutamin		GibcoBRL, Eggenstein
Fetales Kälberserum (FCS)		GibcoBRL, Eggenstein
STI571	100µM (100mg/1695ml aq.dest)	Novartis, Basel, Schweiz
2x HBS	500ml mit 8g NaCl, 6,5g Hepes, 5,25g Na ₂ HPO ₄ , pH 7,05	
Polybrene	Hexadimethrinbromid 2500x 100mg/10ml aq.dest. 100x 400µl Stammlsg./10ml	Sigma Chemicals, Deisenhofen
Chloroquine	100mM (0,51g/10ml aq.dest.)	Sigma Chemicals, Deisenhofen
PBS		GibcoBRL, Eggenstein
Trypanblau	Stammlsg: 0,5g/100ml NaCl 0,9% 1:10 verdünnen mit 0,9% NaCl	Sigma Chemicals, Deisenhofen
Gelatine 2%	1:20 in aq. dest. verdünnen	GibcoBRL, Eggenstein
Natriumbutyrat	1M, upstate biotechnology, NY, USA	
Penicillin/Streptomycin	5.000U/ml, Gebrauch 1:100	GibcoBRL, Eggenstein
Trypsin	10x Stammlsg., Gebrauch 1x in aq.dest.	Biochrom, Berlin

Lösungen für Elektrophoresetechniken

20x SSC	3M NaCl, 300mM Tri-Natriumcitrat-dihydrat, pH 7,0
10x MOPS	0,2M Morpholinopropansulfonsäure, 0,05M Na-Acetat 0,01M EDTA, pH 7,0, mit DEPC ansetzen
100x Denhardt	je 2g Ficoll/Polyvinylpyrrolidon/BSA auf 100ml aq.dest.
RNA-Ladepuffer	Formamid, 10x MOPS, Formaldehyd 37%, Glycerin 80%, Bromphenolblau
RNA-Ladepuffer für NB 2x	96% Formamid, 2ml EDTA (0,5M) 50mg Bromphenolblau, 50mg Xylencyanol
(Prä-)Hybridisierungslösung	30% Formamid, 10% Dextransulfat, 2x SSC, 2x Denhardts-Lösung, 1% SDS, 200µg/ml Herings-DNA
5x Stopppuffer DNA	11g Sucrose, 0,1M EDTA, 25mg Bromphenolblau, aq. dest ad 10ml
10x TBE	0,089M Tris, 0,089M Borsäure, 0,002M EDTA pH 8,3
Lösung für 16% PAA-Gel:	8M Harnstoff, 1x TBE, 16% Acrylamid/Bisacrylamid

Hybridisierungspuffer für siRNA-Duplizies

100mM Kaliumacetat, 30mM Hepes, 2mM Magnesiumacetat, pH 7,4

Lösungen für die Phage-Display-Technik

Lösung A	0,1M NaOH, 0,05M NaCl
Lösung B	0,1M NaCl
Biotin	N-(biotinoyl)-N'-(iodoacetyl)ethylenediamin, 50mM in DMSO
BW-Puffer 2x	10mM Tris-HCl (pH 7,5), 1mM EDTA, 2M NaCl
TE pH 6,8	10mM Tris-HCl (pH 6,8), 1mM EDTA
Glycin/BSA	0,2M Glycin-HCl pH 2,2, BSA 1mg/ml
Tris-HCl pH 9,1	1M Tris-HCl pH 9,1
SuperBlock	Blocking buffer Pierce, Perbio, Bonn
Streptavidin	1,5mg/ml, NEB, Frankfurt/M.
PEG/NaCl	20% (w/v) Polyethylenglykol-8000, 2,5M NaCl
Iodid-Puffer	10mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM EDTA, 4M NaI
TBS-Puffer	50mM Tris-HCl (pH 7,5), 150mM NaCl

Kultivierung von Bakterien

LB Broth Base		Invitrogen, Karlsruhe
SOC-Medium		Invitrogen, Karlsruhe
LB Agar		Invitrogen, Karlsruhe
Top-Agar	1g MgCl ₂ ·6H ₂ O und 7g Agarose pro Liter LB-Medium	
IPTG	Stammlsg. 200mg/ml (1g/5ml aq.dest)	Alexis, Grünberg
X-gal	50mg/ml DMF	Sigma Chemicals

Antibiotika

Ampicillin	Stammlsg. 100mg/ml Gebrauchslsg. 1µl/ml LB-Medium	Sigma Chemicals, Deisenhofen
Ciprofloxacin	Ciprobay 200mg in 100ml	Bayer AG, Leverkusen,
Geneticin	G-418-sulfat, 718µg/mg Stammlösung: 50mg/ml (5g G418 / 71,8ml aq.dest.) Gebrauchslösung: 1mg/ml	GibcoBRL, Eggenstein
Kanamycin	Stammlsg. 30mg/ml Gebrauchslsg. 1,67µl/ml LB-Medium (50µg/ml)	Sigma Chemicals, Deisenhofen
Puromycin	Stammlsg. 100mg/ml	Sigma Chemicals, Deisenhofen
Tetrazyklin	20mg /ml in Ethanol	Sigma Chemicals, Deisenhofen
Zeocin	Stammlsg. 100mg/ml	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.6 Enzyme, Kits und Fertiglösungen

ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v 1.1	Applied Biosystems, Weiterstadt
Alkalische Phosphatase 1U/ μ l	Roche, Mannheim
Brilliant QPCR Master Mix	Stratagene, CA, USA
DNase I, RNase-frei 10U/ μ l	Roche, Mannheim
dNTP Set, 100mM	GibcoBRL, Eggenstein
DyeEx 2.0 Dye-Terminator Removal Kit	QIAGEN, Hilden
Dynabeads M-280 Streptavidin	Dynal, Oslo, Norway
ECL Westernblotting detection reagents	Amersham, Braunschweig
GMPS (Guanosin-5'-monophosphorothioat)	Dietmar Scherr, Oberursel
Hi-Di-Formamid	Applied Biosystems, Weiterstadt
Inorganic Pyrophosphatase (IPP)	USB, Cleveland, USA
Klenow-Enzym, DNA-Polymerase I 2U/ μ l	Roche, Mannheim
Lipofectamine 2000-Reagent, Oligofectamine-Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
M-MLV H ⁻ RT (Superscript)	GibcoBRL, Eggenstein
NTPs 100mM	Roche, Mannheim
Peptide Library Kit, Ph.D.-12	NEB, Frankfurt/M.
Pfu DNA Polymerase, 2,5U/ μ l	Stratagene, La Jolla, USA
OPD Peroxidase Substrat	Sigma Chemicals, Deisenhofen
QIAamp DNA Blood Minikit	QIAGEN, Hilden
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick Gel Extraktion Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick Nucleotide Removal Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
QuikChange XL site-directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, USA
Rapid DNA Ligation Kit	Roche, Mannheim
Restriktionsenzyme, Puffer	NEB, Frankfurt/M.
Ribonuclease T2	Invitrogen, Karlsruhe
Ribonuclease T1 1.000U/ μ l	Roche, Mannheim
Ribonuclease A aus bovinem Pankreas 0,83U/ μ l	Pharmacia, Uppsala, S
RNasin RNase-Inhibitor 10U/ μ l	Promega, Mannheim
RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden
RT-Kit (RT-Puffer, 0,1M DTT, MMLV-RT)	Invitrogen, Karlsruhe
Superscript II RNase H- RT	Invitrogen, Karlsruhe
Taq-Polymerase 5U/ μ l, 10x Puffer, MgCl ₂	Invitrogen, Applied Biosystems
T3-RNA-Polymerase	Promega, Madison , USA
T4-DNA-Ligase, T4-DNA-Ligase-Puffer +10mM ATP	NEB, Frankfurt/M.
T4-DNA-Polymerase	NEB, Frankfurt/M.
T4-Polynukleotidkinase	NEB, Frankfurt/M.
T7-RNA-Polymerase	Promega, Mannheim
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
γ - ³² P-ATP 10 μ l, 4MBq	FP301, Hartmann, MHH

2.1.7 DNA- und RNA-Oligonukleotide

Marker

DNA Molecular Weight Marker I-VIII	Roche, Mannheim
RNA-Leiter, 0,16 - 1,77kB	GibcoBRL, Eggenstein
0,24 - 9,5kB	GibcoBRL, Eggenstein
M13mp18 single-stranded DNA	NEB, Frankfurt/M.
Genescan 500 Rox Size Standard	Applied Biosystems, Weiterstadt

Synthetische Oligonukleotide

Alle DNA-Oligonukleotide wurden von MWG, Ebersberg, alle RNA-Oligonukleotide von Biospring, Frankfurt, bezogen.

Klonierungen in pSuper

b2a2-3-sense

5`GATCCCCGGAAGAAGCCCTTCAGCGGCCTTCAAGAGAGGCCGCTGAAGGGCTTCTTCCTTTTTTGGAAAG-3`

b2a2-3-antisense

5`-TCGACTTTCCAAAAAAGGAAGAAGCCCTTCAGCGGCCTTCTTGAAGGCCGCTTCTTCGGG-3`

b2a2-1-sense

5`GATCCCCCATCAATAAGGAAGAAGCCCTTCAAGAGAGGGCTTCTTCCTTATTGATGGTTTTTGGAAAG-3`

b2a2-1-antisense

5`TCGACTTTCCAAAAAACCATCAATAAGGAAGAAGCCCTTCTTGAAGGGCTTCTTCCTTATTGATGGGGG-3`

b2a2-2-sense

5`GATCCCCCAATAAGGAAGAAGCCCTTCATTCAAGAGATGAAGGGCTTCTTCCTTATTGTTTTTGGAAAG-3`

b2a2-2-antisense

5`TCGACTTTCCAAAAACAATAAGGAAGAAGCCCTTCATCTCTTGAATGAAGGGCTTCTTCCTTATTGGG-3`

GL4-S

5`-GTCGACTTTTTTGGCCAGGGCACGGGCACGGGCAGCTTGCGGTGTTTCGTCCTTTCCTTCCAC-3`

GL4-antisense

5`-GTCGACTTTTTTGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCGGTGTTTCGTCCTTTCCTTCCAC-3`

PCR-Primer

4h GFP FP 5`-CGGCCGCTTGGTGGAGGTGGAATAGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGG-3`

4h GFP RP 5`-GCGGCCGCTACACATTGATCCTAGCAGAAGCAC-3`

4h GFP FP 5`-GCGGCCGCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC-3`

sb3a2 FP 5`-GAATTCGCCGCGCAATGAGAAGCTTCTCCCTGACATCCGTGGAGCTG-3`

sb3a2 RP 5`-GAATTCGCGCCGCTGTTTCTCCAGACTGTTGACTGGCGTGATGTAGTTG-3`

Mycoplasmen-PCR-Primer (100µM)

5outer1 5`-CGCCTGAGTAGTACGTTTCGC-3` 5outer2 5`-CGCCTGAGTAGTACGTACGC-3`

5outer3 5`-TGCCTGGGTAGTACATTCGC-3` 5outer4 5`-TGCCTGAGTAGTACATTCGC-3`

5outer5 5`-CGCCTGAGTAGTATGCTCGC-3` 5outer6 5`-CGCCTGGGTAGTACATTCGC-3`

3outer1 5`-GCGGTGTGTACAAGACCCGA-3` 3outer2 5`-GCGGTGTGTACAAAACCCGA-3`

3outer3 5`-GCGGTGTGTACAAAACCCGA-3`

Real Time-PCR-Primer

Gen	FP	Sequenz	RP	Sequenz
GAPDH murin	mu FP	5' CAACAGGGTGGTGGACCTC3'	mu RP	5' GGGTGGTCCAGGGTTTCTTA3'
GAPDH human	huFP	5' GAAGGTGAAGGTCGGAGT3'	huRP	5' GAAGATGGTGATGGGTTTC3'
Bcr human	FPbcr	5' TGCAGAGTGGAGGGAGAACA3'	RPbcr	5' CTGCAGCTCCACGGATGTC3'
Abl human	FPabl	5' ATGATTTTGTGGCCAGTGA3'	RPabl	5' CACCATTCCCCATTGTGATT3'
b2a2	FP	5' TGTGAAACTCCAGACTGTCCACA3'	RP	5' AAAGTCAGATGCTACTGGCCG3'
b3a2	For	5' TCCACTCAGCCACTGGATTTAA3'	Rev	5' TGAGGCTCAAAGTCAGATGCTACT3'

Konzentration der Primer 300µM, Gebrauchslsg. 30µl pro Primer +140µl aq. Dest.

Primer für Reverse Transkriptionen

pd(N₆) Random Hexamer, 5'-phosphat, Na-salz, 100pmol Amersham, Braunschweig

Primer für GeneScan-Analyse (5'-6-FAM): b3a2100-RT 5'-CAGACCCTGAGGCTCAAAG-3'

Primer für Mutagenesereaktionen

B2a2-1 MK-C-F 5' -CATCAATAAGGAAGAAGCCATTGAAGAGAGGGCTTCTTCC-3'

B2a2-1 MK-C-R 5' -GGAAGAAGCCCTCTCTTCAATGGCTTCTTCCTTATTGATG-3'

Fluoreszenz-markierte Sonden

(6nmol/ 400µl Verdünnung, 1:10 Gebrauchslsg.)

B3a2 5' -CAGAGTTCAAAGCCCTTCGCGGC-3' 5' -FAM, 3' -TAMRA

B2a2 5' -TGACCATCAATAAGGAAGAAGCCCTTCAGC-3' 5' -FAM, 3' -TAMRA

GAPDH murin 5' -TGGCCTACATGGCCTCCAAGGA-3' 5' -VIC, 3' -TAMRA

GAPDH human 5' -CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-3' 5' -VIC, 3' -TAMRA

Sonden für Northern-Blot-Analysen

U6 5' -TATGGAACGCTTCACGAATTGC-3'

B2a2-3-sense-NB 5' -GGAAGAAGCCCTTCAGCGGCC-3'

RNA-Moleküle

Biotinylierte RNA 24nt bcr-abl 5' -AGCAGAGUUCAAAAGCCCUUCAGC-3'

chemisch synthetisierte siRNAs

b2a2-0 sense 5' -TAAGGAAGAAGCCCUUCAGdTdT-3'

antisense 3' -dTdTAAUCCUUCUUCGGGAAGUC-5'

b2a2-3-19nt sense 5' -GGAAGAAGCCCUUCAGCGGdTdT-3'

antisense 3' -dTdTCCUUCUUCGGGAAGUCGCC-5'

GL2 siRNA: anti-GL2_siRNA Elbashir *et al.* [149]

KO siRNA: invGL2_siRNA Elbashir *et al.* [149]

2.1.8 Vektoren

pTRI Kan 18*	Ambion, TX, USA
pTRI Kan 18-bcr-abl-100	Michaela Scherr, MHH
pTRI Kan 18-bcr-100	Michaela Scherr, MHH
pTRI Kan 18-abl-100	Michaela Scherr, MHH
pd4EGFP-N1*	BD, Palo Alto, USA
pBluescript II KS (+/-)*	Stratagene, La Jolla, USA
pcDNA3.1/ Zeo*	Invitrogen, Karlsruhe
pCR 2.1 Topo*	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA3.1-sb2a2-EGFP	Michaela Scherr, MHH
pGD210	Daley <i>et al.</i> [125]
pGD210-b2a2	Michaela Scherr, MHH
LNSN (LNGFR-exprimierendes Plasmid)	Manuel Grez, Frankfurt
pSuper*	Brummelkamp <i>et al.</i> [52]
pBabepuro*	Morgenstern <i>et al.</i> [80]
ecoenv-IRES-puro*	Thomas Winkler, MHH
gag-pol M57	Thomas Winkler, MHH
dcH1-shRNA-SR*	Scherr <i>et al.</i> [62]
pMD.G*	Daniel Ory <i>et al.</i> [150]
pCMV Δ R8.9.1*	Zufferey <i>et al.</i> [79]

* Die Vektorkarte befindet sich im Anhang.

2.1.9 Antikörper

PE-anti-human NGFR, monoklonal	BD PharMingen, CA, USA
M13-Biotin (Anti-fd Bacteriophage Biotin Conjugate)	Accurate, Westbury, USA
HRP/Anti-M13 Monoclonal Conjugate	Amersham, Braunschweig

2.1.10 Bakterienstämme

Top10	One Shot Top10	Invitrogen, Karlsruhe
DH5 α	MAX Efficiency Competent Cells	GibcoBRL, Eggenstein
HB101	Library Efficiency Competent Cells	GibcoBRL, Eggenstein
Stable2	MAX Efficiency Competent Cells	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.11 Zelllinien

Humane Zelllinien

293T

Humane embryonale Nierenzellen wurden mit dem Adenovirus Typ 5 transformiert. Die Zelllinie ist auch als HEK-293T bekannt. Die adhärenenten fibroblastoiden Zellen wachsen als Einzelzellschicht in 90% DMEM und 10% FCS. Sie werden mit ca. $2,5-3 \times 10^5 / 25 \text{cm}^2$ ausgesät. Die Verdopplungszeit beträgt 20-24h.

Bezug: Manuel Grez, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt/ Main

ΦN_x-GP

Die Zellen sind 293T-Zellen, die mit dem *Moloney*-GagPol-IRES-Lyt2-Konstrukt stabil transfiziert wurden. Das Konstrukt enthält einen RSV-Promotor und einen pPGK-Hygro-Selektionsmarker.

Bezug: Gary Nolan, Stanford, USA

HeLa

Die Zellen wurden aus einem epitheloiden Zervixkarzinom einer 31 Jahre alten Frau kontinuierlich kultiviert. Die Diagnose wechselte später in ein Adenokarzinom. Morphologisch sind die Zellen Epithelium-ähnliche Zellen und wachsen als Einzelzellschicht in 90% DMEM und 10% FCS (mit 2mM L-Glutamin und nicht-essentiellen Aminosäuren). Die Zellen werden ausgesät mit ca. $1-2 \times 10^6$ Zellen/ 80cm^2 und erreichen sehr schnell die Konfluenz. Die Verdopplungszeit beträgt ca. 48h.

Bezug: DSMZ, Braunschweig

U937

Die Zellen wurden aus dem Pleuraerguss eines 37-Jahre alten Mannes mit Histiocytärem Lymphom kultiviert. Es sind runde bis polygonale Einzelzellen in Suspension. Die Zellen werden mit $0,1-1 \times 10^6$ Zellen/ml in 90% RPMI 1640 und 10% FCS Medium ausgesät.

Die Verdopplungszeit beträgt 30 bis 40h.

Bezug: DSMZ, Braunschweig

B2a2-Ph⁺-Zelllinien

BV173

Die Zellen sind humane leukämische B-Zell-Vorläufer und stammen aus dem peripheren Blut eines 45 Jahre alten Mannes mit CML in der Blastenkrise. Die Einzelzellen in Suspension schwer zu kultivieren. Sie wachsen anscheinend in 24-Lochplatten besser als in Flaschen. Die Zellen werden mit $0,5-1,0 \times 10^6 / \text{ml}$ in Medium (90% RPMI 1640 und 10% FCS) ausgesät und besitzen eine Verdopplungszeit von ca. 48h.

Bezug: DSMZ, Braunschweig

JK-1

Die Zellen stammen aus dem Biopsiematerial eines Schultertumores eines 62 Jahre alten Mannes mit CML in erythroider Blastenkrise. Sie produzieren Hämoglobin. Die runden Suspensionseinzelnellen werden in 80% RPMI 1640 und 20% FCS mit $0,5 \times 10^6$ /ml ausgesät.

Die Verdopplungszeit beträgt ca. 50h.

Bezug: DSMZ, Braunschweig

Meg01

Die humane Zelllinie stammt aus dem Knochenmark einer 55 Jahre alten Frau mit CML in megakaryozytärer Blastenkrise. Die Suspensionszellen wachsen nach zwei Tagen zu 50% adhären auf der Oberfläche. Die Zellen werden mit ca. $0,3 \times 10^6$ in 90% RPMI 1640, 10% FCS ausgesät und verdoppeln sich ca. alle 35h.

Bezug: DSMZ, Braunschweig

B3a2-Ph⁺-ZelllinienK562

Die Zellen wurden aus dem Pleuraerguss einer 53-Jahre alten Frau mit CML in Blastenkrise kultiviert. Die Suspensionszellen werden mit $0,1 \times 10^6$ /ml ausgesät und in 90% RPMI 1640 und 10% FCS kultiviert. Die Verdopplungszeit beträgt 30 - 40h.

Bezug: DSMZ, Braunschweig

Murine ZelllinienBa/F3

Die murine pro-B Zelllinie sind runde Einzelzellen in Suspension und werden mit $0,1 \times 10^6$ /ml in 90% RPMI 1640 + 10% FCS + 10% WEHI ausgesät.

Die Verdopplungszeit beträgt 12-24h.

Bezug: Matthias Eder

NIH-3T3

Die Fibroblastenzelllinie entstammt einem schweizer Mausembryo und wächst als Einzelzellschicht in 90% DMEM und 10% FCS. Die Kultur wird mit ca. 1×10^4 Zellen/cm² ausgesät sollte nie ganz konfluent sein. Die Verdopplungszeit beträgt ca. 20h.

Bezug: DSMZ, Braunschweig

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Methoden, die in der Arbeit angewendet wurden, waren in der Arbeitsgruppe etabliert und folgten Protokollen aus „*Molecular Cloning*“ und „*Current Protocols*“ [151; 152].

Aufreinigung, Synthese, Modifizierung und Detektion von RNA

2.2.1.1 Aufreinigung von RNA aus Zellmaterial (gesamt-RNA in Trizol)

Die Präparation von Gesamt-RNA aus humanen Zelllinien erfolgte unter Verwendung von Trizol-Reagenz nach den Angaben des Herstellers. Trizol ist ein Gemisch aus Phenol und Guanidiniumthiocyanat, welches die Zellen lysiert, dabei RNasen hemmt und die Integrität der RNA nicht beeinträchtigt. Die RNA wird aus dieser Lösung durch Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließende Isopropanolpräzipitation isoliert.

Zur Isolierung der gesamten RNA aus Zellen wurden 1×10^7 Zellen in 1ml Trizol aufgenommen, 5min bei Raumtemperatur inkubiert und bei -70°C eingefroren oder direkt wie folgt weiter verarbeitet. Nach Zugabe von 200 μl Chloroform und gutem Mischen wurde die Probe 10min bei RT inkubiert und anschließend 15min bei 14.000U/min und 4°C zentrifugiert. Die obere klare wäßrige Phase wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und mit 500 μl Isopropanol gut geschüttelt. Danach erfolgte wiederum eine Inkubation von 10min bei RT und eine Zentrifugation 10min bei 14.000U/min und 4°C . Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und 5min bei 14.000U/min und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und für eine folgende DNase-Inkubation in 11,7 μl Wasser aufgenommen.

2.2.1.2 Abbau von DNA-Fragmenten

Zur Beseitigung von DNA-Fragmenten wurde die RNA mit DNase inkubiert.

Zu 11,7 μl RNA wurden 10x M-MLV-RT-Puffer, 50mM DTT, 3,2U DNase und 24U RNasin ad aq. dest. 20 μl gegeben und 60min bei 37°C inkubiert. Die RNA wurde anschließend mit einer Phenol-Chloroform-Ethanol-fällung aufgereinigt.

2.2.1.3 Fällungen mit Phenol-Chloroform und Ethanol

Die zu fällende RNA-Lösung wurde mit gleichem Volumen des Phenol-Chloroform verdünnt, gut gemischt und 5min bei 13.000U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben, mit gleichem Volumen an Chloroform überschichtet, gut gemischt und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Der Überstand wurde mit dem dreifachen Volumen an Ethanol und 1µl Glykogen vermischt und mindestens 30min bei -70°C gelagert. Danach erfolgte eine Zentrifugation von 20min bei 13.000U/min und 4°C. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet mit 300-500µl 70% Ethanol gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation von 5min bei 7500U/min wurde das Pellet getrocknet und in sterilem Wasser aufgenommen.

Eine zu fällende DNA-Lösung wurde mit einem Endvolumen von 100µl in sterilem Wasser aufgenommen und mit 100µl Phenol-Chloroform versetzt. Nach Zentrifugation wurde das dreifache Volumen an Ethanol und 10µl 3M Na-Acetat-Lösung zugegeben. Alle weiteren Schritte erfolgten wie bei der RNA-Fällung beschrieben.

2.2.1.4 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA-, Plasmid- und RNA-Proben erfolgte im Photometer unter Bestimmung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260nm. Gleichzeitig wurde bei 280nm die Verunreinigung durch Proteine gemessen. Der Quotient aus den Messungen bei 260 und 280nm sollte zwischen 1,5 und 1,9 betragen.

Die Proben wurden zur Konzentrationsbestimmung verdünnt und in eine Quarzküvette pipettiert, der Messwert wurde gegen Wasser abgeglichen. Die Konzentration wurde dann wie folgt berechnet:

Konzentration (DNA) ng/µl = Extinktion (OD)* Verdünnungsfaktor* 50ng/µl dsDNA

Konzentration (RNA) ng/µl = Extinktion (OD)* Verdünnungsfaktor* 40ng/µl RNA

2.2.1.5 Hybridisierung komplementärer siRNA-Stränge

Es wurden von jedem chemisch synthetisierten siRNA-Strang Stammlösungen von 2mM und 200µM Konzentration in Hybridisierungspuffer hergestellt. Zur Herstellung des siRNA-Duplex wurden von der 200µM Lösung des Sense- und Antisense-Stranges je 10µl und 80µl des Hybridisierungspuffers 1min bei 90°C erhitzt und über Nacht auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Duplizes wurden in 20µl Aliquots bei -20°C gelagert.

2.2.1.6 *In vitro*-Transkription

RNA-Oligonukleotide können durch *in vitro*-Transkription klonierter DNA-Fragmente hergestellt werden. Geeignete Transkriptionsvektoren enthalten multiple Restriktionsschnittstellen (MCS), die von Promotoren für die Bakteriophagen-RNA-Polymerasen SP6, T3 oder T7 flankiert werden. Bei Verwendung der entsprechenden Polymerase wird das klonierte DNA-Fragment in RNA umgeschrieben. Um zu vermeiden, dass die erzeugte RNA den gesamten Vektor umläuft, muß der Vektor stromabwärts der zu amplifizierenden Sequenz linearisiert werden.

Zur Herstellung von RNA *in vitro* wurde das als Matrize für die Transkriptionsreaktion dienende Plasmid durch eine Restriktionsspaltung linearisiert. Davon wurden 2µg in die Reaktion eingesetzt. Der Reaktionspuffer, die Nukleotide, die entsprechende RNA-Polymerase sowie DTT und IPP wurden nach dem folgenden Schema zu einem Ansatz von 100µl zusammenpipettiert und 2h bei 37°C inkubiert.

Für eine anschließende Biotinylierung der RNA wurde ein Teil des GTP durch GMPS ersetzt und innerhalb der 2h Inkubation bei 37°C alle 20min 1µl 20mM GTP zum Ansatz gegeben, zusätzlich nach 1h 5µl Polymerase.

		<u>Standard</u>		<u>vor Biotinylierung</u>
Polymerase –Puffer (ohne DTT)5x		20µl		20µl
GTP	100mM	2µl	0,2mM	1µl
ATP	100mM	2µl		2µl
CTP	100mM	2µl		2µl
UTP	100mM	2µl		2µl
DTT	100mM	10µl		10µl
RNA-Polymerase	80U/µl	0,5µl		5µl
DNA-Matrize	0,5µg/µl	4µl		4µl
GMPS			0,45mM	10µl
Wasser		ad 100µl		ad 100µl

Die Reaktion wurde mit 10µl 0,5M EDTA gestoppt und über eine Phenol-Chloroform- und Ethanol-fällung mit Glykogen aufgereinigt.

2.2.1.7 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription läßt sich in *Annealing*- und Transkriptionsschritt unterteilen. Um die gesamte RNA in cDNA umzuschreiben, wurde ein randomisierter N₆-Primer verwendet.

Für die Reverse Transkription und spätere quantitative PCR wurde 1µg in 11µl Wasser gelöst, 10min bei 70°C erhitzt und danach auf Eis gestellt.

Zu der RNA wurde in einem Ansatz von 20µl Endvolumen 5x RT-Puffer, 1µl 0,1M DTT, 2µl 10mM dNTP, 10pmol pd(N₆)-Primer und 1µl M-MLV-Rev. Transkriptase zusammenpipettiert. Der Ansatz wurde 60min bei 37°C inkubiert.

2.2.1.8 Quantitative *Real Time*-PCR

Prinzip

Die Quantifizierung einer bestimmten Nukleinsäuremenge mittels einer Polymerasekettenreaktion (PCR) ist im linearen Bereich der Amplifikationseffizienz mit Hilfe der *Real Time*-PCR möglich. Zusätzlich zu den beiden Primern, die in jeder PCR vorhanden sind, befindet sich in dieser Reaktion ein Oligonukleotid (Sonde), das an eine Gensequenz zwischen den beiden Primern bindet und mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert ist. Wenn die beiden Fluoreszenzfarbstoffe durch die Sonde nahe zusammen sind, wird nach Anregung durch einen Argon-Laser die Energie des Reporterfarbstoffes auf den Quencherfarbstoff übertragen und nur dieser emittiert Licht. Während der PCR werden beide Primer mittels der Taq-Polymerase so lange verlängert, bis sie auf die Sonde treffen. Dort wird dann die Sonde von dem DNA-Strang gelöst und mit Hilfe der 5' Nuklease-Aktivität der Taq-Polymerase abgebaut. Somit sind die beiden Fluoreszenzfarbstoffe nicht mehr nah zusammen und es kann kein Energietransfer mehr stattfinden. Es können nun beide Fluoreszenzfarbstoffe Licht emittieren. Die Stärke der Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes ist proportional zur gebildeten DNA-Menge. Diese Reporterfluoreszenz wird alle 7s gemessen, somit kann relativ einfach der Verlauf der PCR-Reaktion verfolgt werden. Innerhalb der PCR-Kurve wird dann ein geeigneter Punkt für die Quantifizierung gewählt.

Durchführung

Bei der quantitativen *Real Time*-PCR zur Bestimmung des mRNA-Gehaltes einer Zelle wurden die Proben nach der Reversen Transkription auf 90µl mit aq. dest. verdünnt und pro Bestimmung 9µl (entspricht der cDNA von 0,1µg RNA) eingesetzt. Es wurden pro Probe drei Messungen durchgeführt. In einem Mastermix wurden 12,5µl Brilliant QPCR 2x-Puffer, 3pmol der Sonde und 0,25pmol pro Primer zu einem Endvolumen von 16µl pro Messung vorgelegt und zu der cDNA pipettiert. Diese 25µl wurden in eine Vertiefung der Mikrotiterplatte gegeben. Die PCR-Reaktion und die anschließende Auswertung erfolgte im ABI Prism 7700 Sequence Detector mit der Sequence Detecting Software.

Herstellung des cDNA-Gemisches zur Erstellung einer Standardkurve

Um die Proben quantitativ beurteilen zu können, erfolgte die Festlegung einer Standardkurve. Dazu wurde aus 7×10^6 murinen (TonB210, Ba/F3-b2a2) bzw. humanen BCR-Abl-positiven Zellen (K562, HL60, BV173) RNA nach der Trizol-Methode isoliert, die DNA-Kontamination durch einen DNase-Verdau beseitigt und die RNA in cDNA umgeschrieben.

Die cDNA wurde in 15ml Endvolumen aufgenommen. Demzufolge entsprachen 75 μ l 35.000 Zellen.

Zur Erstellung der Standardkurve wurden Ansätze mit der cDNA entsprechend 3600, 3000, 2500, 1500, 500 und 0 Zellen in 9 μ l pipettiert, der Mastermix wie beschrieben hinzugefügt und die Standardkurve gemeinsam mit den zu bestimmenden Proben im ABI-Gerät gemessen. Auch hier wurde jede Bestimmung dreifach vorgenommen.

2.2.1.9 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAAGE) zur Auftrennung von RNA

Je nach Größe der zu detektierenden RNA wurde die entsprechende Acrylamid/Bisacrylamidkonzentration gewählt. Für ein 12%iges PAA-Gel wurde eine Ausgangslösung von 7ml mit 4,2g Harnstoff, 1ml 10x TBE-Puffer, 3ml Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 40% und 2,5ml aq. dest hergestellt. Zu der Lösung wurde 140 μ l 10% APS und 9 μ l TEMED gegeben und das Gel zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen. Nach Polymerisation des Geles wurde es in der Elektrophoresekammer befestigt und 1x TBE-Puffer aufgefüllt. Der Kamm wurde entfernt und nach einem Vorlauf von ca. 30min bei 200V wurden die Proben aufgetragen. Das Gel lief unter Spannungen von 120 bis 200V bis der Blaumarkerfarbstoff des Auftragspuffers die gewünschte Weite erreicht hatte.

2.2.1.10 Aufreinigung von RNA aus PAA-Gelen

Wenn die RNA nach der *in vitro*-Transkription biotinyliert wurde, wurde sie vor und nach der Biotinylierung über ein PAA-Gel aufgereinigt.

Nach der *in vitro*-Transkription wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt und die RNA mit Ethanol-Glykogen-Fällung präzipitiert. Die RNA von einem Transkriptionsansatz wurde in 5-10 μ l aq. dest. resuspendiert, mit dem dreifachen Volumen an 2x Formamidlaufpuffer vermischt und auf ein 12% PAA-Gel (RNA = 100nt) aufgetragen. Nach einer Laufzeit von ca. zwei Stunden bei 120 – 200V (der Blaumarker befand sich an der unteren Gelkante) wurde das Gel aus der Kammer genommen und auf eine Kieselgelplatte gelegt. Unter Bestrahlung mit UV-Licht konnten die Banden (100nt) mit einem Skalpell herausgeschnitten und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt werden. Die Gelstücke von vier Banden wurden in 300 μ l Elutionspuffer und 10mM DTT ü. N. bei 16°C geschüttelt. Der Überstand mit der RNA wurde abgenommen und eine Ethanol-Glykogenfällung durchgeführt.

2.2.1.11 Biotinylierung von RNA [153]

Nach Aufreinigung der RNA über ein PAA-Gel und anschließender Ethanol-fällung wurde das Pellet in 2µl NaH₂PO₄ (pH 8.0) aufgenommen und mit 2µl Biotinlösung (50mM) zwei Stunden bei Raumtemperatur und ohne Lichteinstrahlung inkubiert. Die Reaktion wurde mit 2µl Biotinlösung (50mM) und einer Stunde Inkubationszeit wiederholt.

Danach wurde eine Ethanol-fällung und eine Aufreinigung über ein PAA-Gel durchgeführt.

2.2.1.12 Silberfärbung von PAA-Gelen

Um geringe Mengen an RNA zu detektieren, wurde eine Silberfärbung des PAA-Geles durchgeführt. Nach Fixierung der Banden 10min in 20% Trichloressigsäure wurde das Gel zweimal 5min mit aq. dest. gespült und anschließend 20min mit 0,1% (w/v) Silbernitratlösung gefärbt. Danach erfolgte die Entwicklung der Banden mit einer Natriumcarbonatlösung (30mg/ml) und 0,02% Formaldehyd. Die Reaktion wurde mit 1% Essigsäure gestoppt und das Gel 10min fixiert.

2.2.1.13 Modifikation von RNA durch Spaltung mit RNasen

Für die Durchführung von Sekundärstrukturanalysen wurde die 100nt lange RNA von dem Transkriptionsvektor pTRI-Kan exprimiert. Die RNA wurde nach Ausbildung ihrer Sekundärstruktur mit Enzymen inkubiert, die spezifisch hinter einzelsträngigen Nukleotiden die RNA spalteten. Damit das RNA-Molekül in Sekundärstruktur vorliegt, wurde die RNA, pro Ansatz 2µg, in 20µl TE-Puffer pH 6,8 gelöst, 3min auf 75°C erhitzt und in ca. einer Stunde auf RT abkühlt. Anschließend erfolgte die Spaltung mit den RNasen nach folgendem Muster:

RNase T1: 1µl (100U), 0°C, 30min

RNase T2: 2µl (60U), 37°C, 15min

RNase A: 1-2µl (0,5-1U), 37°C, 30min

Ein Ansatz ohne Enzym galt als Kontrolle. Nach der Spaltung wurde der Ansatz mit 80µl aq. dest. verdünnt und über eine Phenol-Chloroform-Ethanol-fällung aufgereinigt.

2.2.1.14 Reverse Transkription mit einem fluoreszenzmarkiertem Primer

Die durch RNase-Spaltung entstandenen Fragmente wurden über eine Reverse Transkription (*Primer extension assay*) in fluoreszenzmarkierte cDNA-Moleküle umgeschrieben. Dafür wurde eine Superscript-Reverse Transkriptase verwendet, welche eine optimale Funktion bei 42°C besitzt. Damit der Primer binden kann, musste die RNA einzelsträngig vorliegen. Durch

die höhere Temperatur bleibt die einzelsträngige Struktur der RNA-Moleküle länger erhalten. Die Reaktion erfolgte nach Anleitung des Enzymherstellers und den beigefügten Lösungen. Die modifizierte RNA wurde nach der Ethanolfällung in 10µl aq. dest. aufgenommen, 10min bei 70°C erhitzt, und auf Eis abgekühlt. Zu dem Ansatz wurden 2µl dNTPs (10µM) und 1µl (10pmol) des 6-FAM-Primers gegeben, 5min bei 65°C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 4µl First-Strand-Puffer, 2µl 0,1M DTT und 1µl RNasin wurde der Reaktionsansatz 2min bei 42°C inkubiert und anschließend mit 1µl Superscript-Enzym 50min bei 42°C die cDNA erstellt. 3-5µl der cDNA wurden mit 0,5µl ROX-500 Größenstandard und 20µl Hi-Di-Formamid vermischt und im ABI 310 analysiert.

2.2.1.15 Detektion von RNA im Northern Blot

Beim Northern Blot wird RNA nach elektrophoretischer Auftrennung aus der Gelmatrix auf eine Nylonmembran übertragen und immobilisiert, wobei das ursprüngliche Trennmuster der RNA-Moleküle erhalten bleibt. Nach Inkubation mit einem spezifischen radioaktiv markierten Oligonukleotid (Sonde), kann das gewünschte RNA-Molekül detektiert werden.

Herstellung der radioaktiv markierten Sonde

Zu 2µl des Oligonukleotids (10pmol/µl) wurden 1µl des Kinasepuffers, 5µl aq. dest., 10U der T4-Polynukleotidkinase und 1µl des γ -³²P-ATP (0,4MBq) gegeben und 45min bei 37°C inkubiert. Die Sonde wurde anschließend über eine Sephadex-G25-Säule aufgereinigt. Dazu wurden die Sonden zunächst 2min bei 2200U/min in der Biofuge zentrifugiert, danach in ein sauberes Gefäß gestellt, der Kinaseansatz (in 90µl aq. dest. verdünnt) aufgetragen und durch Zentrifugation 2min bei 2200U/min eluiert. Zur Kontrolle wurden 1µl der Sonde auf ein PAA-Gel (6%) aufgetragen.

Auftrennung der RNA über ein Polyacrylamidgel (PAA-Gel)

Um die RNA aufzutrennen, wurde ein 16% PAA-Gel gegossen. 10µg der RNA aus Zellen nach Trizol-Aufreinigung wurden in 10µl aq. dest. gelöst, mit 10µl des RNA-Ladungspuffers 3min bei 90°C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Nach Polymerisation des Geles und einem Vorlauf von 30min bei 200V in 1x TBE-Puffer wurden die Proben aufgetragen und ca. eine Stunde bei 200V laufen gelassen.

Übertragung der RNA auf eine Membran (Blotting)

Ein Hybond-N-Papier und sechs Stück Whatman-Papier wurden in Gelgröße zugeschnitten und in 0,5x TBE eingeweicht bzw. angefeuchtet. Zuerst wurden drei der Whatman-Papiere luftblasenfrei in der Blot-Kammer übereinandergelegt, danach das Gel, die Hybond N-

Membran und drei weitere Whatmanpapiere. Die Übertragung der RNA-Banden erfolgte nach zwei Stunden bei 90mA im Blot-Gerät.

Die Hybond-N-Membran wurde 5min an der Luft getrocknet, die Banden wurden mit der Membran im UV-Cross-Linker vernetzt und zwischen zwei trockenen Whatmanpapieren gelagert.

Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Sonde

Die Hybond-N-Membran wurde in 2x SSC-Puffer eingeweicht und anschließend 4 bis 6h Stunden in 8ml Hybridisierungslösung unter Rotation bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Hybridisierung mit der radioaktiven Sonde in 10ml Hybridisierungslösung ü. N. bei 37°C unter Rotation. Die Membran wurde dreimal 10min bei 37°C und einmal bei 25°C mit 2x SSC-Puffer gewaschen und anschließend getrocknet.

Exposition und Entwicklung des Filmes

Die getrocknete Membran wurde in einer Film-Kassette mit einem Kodak-Film unterschiedlich lang exponiert und anschließend entwickelt.

Allgemeine Klonierungsmethoden

2.2.1.16 Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung von Bakterien erfolgte in LB-Flüssigmedium, dem gegebenenfalls Antibiotika zugesetzt wurden. Zur Herstellung von Selektionsnährböden wurde dem Medium jeweils 1,5% (w/v) Bacto-Agar zugesetzt. Die Zugabe von Antibiotika fand nach Abkühlung des Mediums unter 50°C statt. Zur dauerhaften Aufbewahrung von Bakterien wurden Aliquots der jeweiligen Kulturen mit 15% Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

2.2.1.17 Herstellung CaCl₂-kompetenter Bakterien

Zellen des entsprechenden Bakterienstammes wurden in wenigen Millilitern LB-Medium etwa 16h kultiviert und danach in 150ml LB-Medium überführt. Diese Kultur wurde bei 37°C geschüttelt, bis sie eine OD von 0,5 bei 578nm erreicht hatte. Die Zellen wurden für mindestens 10min auf Eis gelagert und anschließend bei 3.000U/min und 4°C in der Megafuge 1.0R 10min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 100ml steriler, eiskalter 0,1M CaCl₂-Lösung gewaschen, 10min auf Eis inkubiert und erneut abzentrifugiert. Abschließend wurden die Zellen in 3ml steriler 0,1M CaCl₂-Lösung aufgenommen, mit 1ml 86%igem sterilem Glycerin vorsichtig vermischt, zu 100µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen wurden bei -70°C gelagert.

2.2.1.18 **CaCl₂-Transformation von *E.coli*-Zellen**

Die zu transformierende DNA wurde in 50µl CaCl₂-kompetente Bakterien pipettiert und 15min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock der Bakterien bei 42°C für 1min. Die Zellen wurden 2min auf Eis abgeschreckt und anschließend 30 - 60min in 300µl LB-Medium bei 37°C inkubiert. Das Zellpellet wurde abzentrifugiert, in wenig Volumen resuspendiert und auf LB-Agar mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden 10-16h bei 37°C inkubiert.

2.2.1.19 **Blau-Weiß-Selektion**

Der Bakterienstamm, in den das klonierte Plasmid transformiert wird, muss die M15-Mutation des *lacZ*-Gens enthalten. Der Vektor enthält zwischen dem Promotor und der eigentlichen Sequenz der β -Galactosidase eine Multiklonierungsstelle, in die das Insert eingefügt wird. Das neue inserierte Fragment verhindert die IPTG-induzierte Synthese des Enzyms und somit die Metabolisierung von Galactose (bzw. X-Gal). Somit erscheinen positive Klone weiß und negative blau.

Auf einer LB-Agarplatte wurde vor der Transformation 40µl einer 40mg/ml X-Gal-Stammlösung ausgestrichen und 15min getrocknet. Ebenso wurden 40µl einer 100mM IPTG-Lösung auf die Agarplatte ausgestrichen und 20-30min getrocknet. Danach erfolgte das Ausplattieren der transformierten Bakterienkultur.

2.2.1.20 **Phosphorylierung und Hybridisierung komplementärer Oligonukleotide**

Für die Generierung der pSuper-shRNA-Plasmide wurden synthetisch hergestellte Oligonukleotide eingesetzt, die nach ihrer Hybridisierung bereits das fertige Insert mit den passenden Enden für die Ligation darstellten. Pro Konstrukt wurden jeweils vier Oligonukleotide mit paarweiser komplementärer Sequenz konstruiert. Für den Einsatz bei der Klonierung musste das jeweilige Oligonukleotid-Paar zunächst phosphoryliert und hybridisiert werden. Dazu wurde in einem 20µl-Ansatz pro Oligo 0,1OD, 10x T4-PNK-Puffer, 2µl 10mM dATP und 10U T4-PNK verwendet und 30min bei 37°C inkubiert.

Danach wurde der Reaktionsansatz drei Minuten bei 100°C aufgeköcht und anschließend die Probe über Nacht ganz langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Dabei hybridisieren die Oligonukleotide aufgrund ihrer komplementären Sequenzen zum Doppelstrang. Von diesem Inkubationsansatz wurde ein Teil direkt in die Ligation eingesetzt, ein Teil des Ansatzes wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.2.1.21 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der selektiven *in vitro*-Amplifikation einer spezifischen DNA-Region. Für eine PCR-Reaktion wurden 20-100ng Plasmid-DNA eingesetzt. Der Reaktionsmix bestand aus 10x-Puffer mit 15mM MgCl₂, 100pmol pro Primer, 80nmol dNTPs und Polymerase bei einem Endvolumen von 100µl. Standardmäßig begann eine PCR mit 5min Denaturierung bei 94°C, darauf folgten 35 Zyklen mit je 1min 94°C; 2min für die Anlagerung der Primer und 2min Elongation (Verlängerung der Primer durch die Polymerase) bei 72°C. Den Abschluss bildete ein 10-minütiger Elongationsschritt bei 72°C. Für die unterschiedlichen Anwendungen wurden die folgenden Annealingtemperaturen und Polymerasen gewählt:

EGFP-Amplifikation mit späterer Fusion an sb3a2:	50°C, 1µl Taq-Polymerase
EGFP-Amplifikation ohne weitere Fusion:	55°C, 1µl Pfu-Polymerase
sb3a2-500Bp Amplifikation:	66°C, 1µl Pfu/Turbo-Polymerase

2.2.1.22 DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen

Mit Restriktionsspaltung wird das sequenzspezifische Auftrennen von doppelsträngigen DNA-Molekülen mit Hilfe von Endonukleasen bezeichnet, die eine bestimmte palindrome Sequenz erkennen. Je nach Restriktionsenzym entstehen dabei entweder 3'- bzw. 5'-überhängende (kohäsive, "*sticky*") oder glatte ("*blunt*") Enden. Dieses Verfahren wird zur Vorbereitung von PCR-Produkten und Vektoren für die Klonierung genutzt, dient aber auch analytischen Zwecken z. B. der Überprüfung einer Schnittstelle oder eines Inserts.

Die Spaltungen wurden unter den Puffer- und Temperaturbedingungen durchgeführt, die der Hersteller für die Enzyme vorgab. Es wurden 10U Restriktionsendonuklease pro µg DNA eingesetzt. In der Regel wurde ein Reaktionsvolumen von 10 bis 20µl gewählt und 1-2h bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der Enzyme erfolgte anschließend durch Hitzeinaktivierung oder die Aufreinigung durch Phenol-Chloroform-Extraktion.

2.2.1.23 Auffüllen von *sticky ends* mit dem Klenow-Enzym

Nach Spaltung von Plasmid-DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen entstehen Fragmente mit überhängenden Enden. Sollen diese Fragmente in Vektoren kloniert werden, die *blunt end* linearisiert wurden, müssen die einzelsträngigen *sticky ends* zum Doppelstrang aufgefüllt werden. Diese Reaktion wurde mit dem Klenow-Enzym, einer DNA-Polymerase I, durchgeführt.

Zu 30µl Restriktionsansatz wurden 2µl dNTPs (10mM), 8µl MgCl₂ (0,05M) und 1µl Klenow-Enzym pipettiert und 30min bei 37°C inkubiert.

2.2.1.24 Dephosphorylierung linearisierter Vektor-DNA

Durch Restriktionsendonukleasen linearisierte Vektormoleküle neigen zur Rezirkularisierung, was eine Ligation mit dem Ziel der Einfügung zusätzlicher DNA-Abschnitte behindert. Deshalb wurde der linearisierte Vektor mit einer alkalischen Phosphatase am 5'-Ende dephosphoryliert.

Nach der Linearisierung des Vektors durch Restriktionsendonukleasen wird der Ansatz mit 1 µl Phosphatase (10U/µl) versetzt und 30min bei 37°C inkubiert.

2.2.1.25 Ligation

Das Einbringen von DNA (Insert) in einen vorbereiteten Vektor bzw. die Verknüpfung der komplementären DNA-Stränge wird durch die T4-DNA-Ligase in Gegenwart von ATP katalysiert und als Ligation bezeichnet. Dabei werden Phosphodiesterbindungen zwischen freien 3'-OH-Gruppen und 5'-Phosphatgruppen gebildet.

Die Reaktion wurde in Gegenwart von 40U T4-DNA-Ligase in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Es wurden 600ng Vektor pro Reaktion und eine dreifach molare Menge des jeweiligen Inserts eingesetzt. Die Ligation erfolgte bei 16°C über Nacht oder bei RT für 2h. 10 µl des Reaktionsansatzes wurde direkt zur Transformation von *E. coli* eingesetzt.

2.2.1.26 Klonierung von PCR-Produkten in Topo-Vektoren

Die TOPO-TA-Klonierungstechnologie der Firma Invitrogen ist eine schnelle und hoch effiziente Klonierungsstrategie für die direkte Insertion von *Taq*-Polymerase-amplifizierten PCR-Produkten in einen Plasmidvektor. Dieser Plasmidvektor ist linearisiert mit einzelnen 3'-Thymidin-(T)-Überhängen und einer kovalent gebundenen Topoisomerase I. Die verwendete *Taq*-Polymerase besitzt eine Matrizen unabhängige terminale Transferaseaktivität, durch die einzelne Desoxyadenosine (A) an das 3'-Ende des PCR-Produktes anhängt werden. Da der linearisierte Vektor T-Überhänge besitzt, kann so das PCR-Insert effizient in den Vektor ligiert werden. Die Topoisomerase I des *Vaccinia*-Virus bindet doppelsträngige DNA an spezifischen Stellen und spaltet das Phosphodiester-Rückgrat nach der Folge von 5'CCCTT in einem Strang. Die freiwerdende Energie führt zur Bildung einer kovalenten Bindung zwischen dem 3'-Phosphat des gespaltenen Stranges und einem Tyrosinrest (Tyr-274) der Topoisomerase I. Diese Bindung kann durch den Angriff des 5'-OH-Endes des Originalstranges wieder gelöst und somit das Enzym freigegeben werden (Abb. 11).

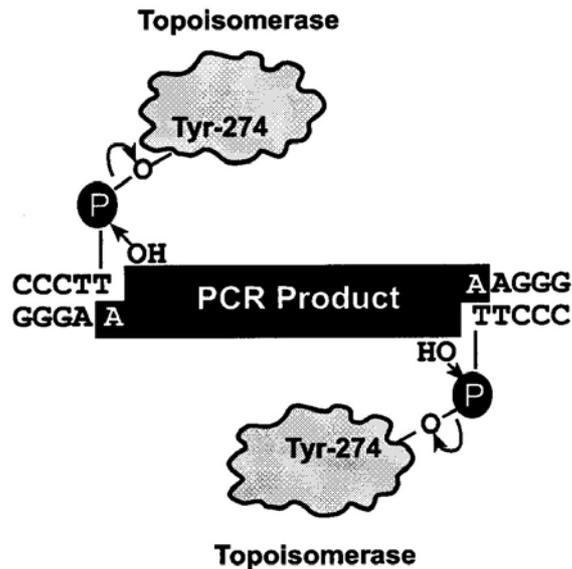


Abb. 11: Prinzip der Klonierungsstrategie von PCR-Produkten in TOPO-Vektoren [Invitrogen]

Nach Amplifikation einer bestimmten DNA-Sequenz und anschließender Ethanolfällung wurden 6,5µl (von 20µl) des PCR-Produktes mit 1,5µl des pPCR2.1-TOPO-Vektors mit dem *Rapid Ligation Kit* nach Protokoll des Herstellers 2h bei RT ligiert. Der Ligationsansatz wurde in *OneShot-Top10-Zellen* transformiert, positive Klone wurden über Blau-Weiß-Selektion detektiert. Nach Amplifikation der einzelnen Klone, Mini-Plasmid-Präparation und Detektion der positiven Plasmide erfolgte aus dem TOPO-Vektor die Klonierung des PCR-Produkt-Sequenz in den Zielvektor.

2.2.1.27 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarosekonzentration der Gele wurde jeweils in Abhängigkeit von den zu erwartenden Fragmentgrößen zwischen 0,8 und 2% [w/v] gewählt.

Dazu wurde Agarose in TBE-Puffer mit 1, 1,5 oder 2% (w/v) in TBE-Puffer gelöst und aufgekocht. Die Agarose wurde mit 0,5µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in eine Flachbett-kammer gegossen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer angelegten Spannung von 100 - 130V in 1x TBE. Anschließend wurde die DNA auf einem Transilluminator im UV-Licht bei einer Wellenlänge von 302nm sichtbar gemacht, und die Banden mit Hilfe einer Polaroid-Kamera dokumentiert.

2.2.1.28 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Durch präparative Agarose-Gelelektrophorese wurden Vektoren und DNA-Fragmente von noch vorhandenen, unerwünschten Restriktionsfragmenten getrennt. Nach Auftrennung der DNA im Agarose-Gel wurden die benötigten DNA-Banden im UV-Licht bei 302nm

ausgeschnitten und anschließend mit dem QIAquick *Gel Extraction Kit* nach dem Protokoll des Herstellers aus dem Gel eluiert. Das Eluat wurde durch eine Ethanol-fällung aufgereinigt und der Erfolg der Isolierung im Agarose-Gel überprüft.

2.2.1.29 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Es wurden verschiedene Plasmid-DNA-Präparationsmethoden durchgeführt, wobei sich die Wahl der Methode nach der gewünschten Reinheit und Menge der Plasmid-DNA richtete. Für die DNA-Gewinnung zur Transformationsüberprüfung von Bakterienklonen wurde die Plasmid-Minipräparation angewandt, für größere DNA-Mengen wurde die Maxipräparation durchgeführt. Beide Verfahren basieren auf einer alkalischen Lyse der plasmidhaltigen Bakterien und anschließender Isolierung der Plasmide.

Plasmid-Minipräparationen

Für eine Minipräparation wurden jeweils 2ml LB-Amp-Medium mit dem entsprechenden Plasmid-tragenden Bakterienklon angeimpft und ü. N. bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. 1,5ml Übernachtskultur wurden in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und für 5min bei 13.000U/min zentrifugiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte mit dem QIAprep *Spin Miniprep Kit* nach Herstellerangaben. Die Plasmid-DNA wurde mit 50µl aq. dest. eluiert.

Plasmid-Maxipräparationen

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA mit einem hohen Reinheitsgrad für präparative Zwecke (Klonierung, Transformation, Transfektion) wurden Plasmid-Maxipräparationen mit dem QIAGEN *Plasmid Maxi Kit* laut Herstellerprotokoll durchgeführt. Hierfür wurde eine 200ml Übernachtskultur eingesetzt, in die zuvor eine 2ml Vorkultur (5h, 37°C) überführt wurde. Die präparierte Plasmid-DNA wurde in 200µl bis 500µl aq. dest aufgenommen. Anschließend wurde die Konzentration bestimmt und die Reinheit der Präparation mit einem spezifischen Restriktionsverdau und Auftragen auf ein Agarosegel überprüft.

Für die Präparation des pMD.G-Plasmids wurde die Vorkultur in 1 Liter LB-Amp-Medium überführt und in einem 3-Liter-Kolben mit Schikane ü. N. bei 37°C geschüttelt. Die Kultur wurde in drei Zentrifugenbecher aufgeteilt, jedes Pellett einzeln aufgearbeitet und die Plasmid-DNA zum Schluss vereinigt.

2.2.1.30 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Prinzip

Die Sequenzierung nach der Didesoxymethode von Sanger, entwickelt 1977, erfolgte in dieser Arbeit in einem automatisiertem Verfahren mit einem ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer. Dazu mußte die Plasmid-DNA durch Ethanol-fällung von störenden Agenzien bereinigt werden. Die eigentliche Sequenzierungsreaktion ist eine kontrollierte Unterbrechung der enzymatischen Replikation. Mit Hilfe einer DNA-Polymerase wird die gewünschte Sequenz so kopiert, dass durch den Einsatz von Didesoxyribonukleotiden (ddNTPs) unterschiedlich lange Abbruchfragmente entstehen. In dem hier verwendeten Reaktionsgemisch war jedes der Nukleotide der vier verschiedenen Basen mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Zur Anlagerung des Primers wurde eine im Plasmid enthaltene Promotorsequenz verwendet. Die Reaktion selbst verlief wie eine PCR, allerdings ohne abschließende Elongation.

Durchführung

Vor dem Einsatz in die Sequenzierungsreaktion wurde das aufgereinigte Plasmid auf ein 2%-Agarosegel aufgetragen. Es wurden etwa 200ng Plasmid eingesetzt und 2µl der BigDye-Lösung, 2µl des Primers (5pmol) und HPLC-Wasser zu einem Endvolumen von 10µl zupipettiert. Der Reaktionsansatz wurde in einem Thermocycler 5min bei 95°C denaturiert und für 26 Zyklen mit jeweils 30s bei 95°C, 15s bei 50°C und 4min bei 60°C sequenziert.

Nach dieser Reaktion mußten wiederum störende Faktoren aus dem Reaktionsansatz abgetrennt werden. Hierzu wurden die Nukleinsäurefragmente mit Ethanol gefällt oder über gefertigte Mikrosäulen zentrifugiert.

Der ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer ermöglichte durch Kapillarelektrophorese die Trennung der einzelnen Fragmente, wobei die Detektion über Fluoreszenz erfolgte. Die Daten wurden mit einer „Collection software“ im Computer erfaßt und konnten über das Programm „Sequence analysis“ ausgewertet werden.

Die Aufreinigung des Sequenzieransatzes sowie die Analysierung im ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer erfolgten überwiegend durch Dr. rer. nat. Andreas Czwalinna und der MTA Mandy Hofmann der Abteilung Hämostaseologie der MHH.

2.2.2 Phage Display

Das Phage Display-Verfahren wurde nach Angaben des Herstellers der Phagenbibliotheken (*New England Biolabs*) durchgeführt.

2.2.2.1 Peptidselektion

Um die RNA immobilisieren zu können, wurde Guanosin-5'-monophosphorothioat (GMPS) an das 5'-Ende der RNA eingebaut und dieses Nukleotid biotinyliert. Zur Immobilisation wurde die RNA über eine Biotin-Streptavidin-Verknüpfung an magnetische Kügelchen (*beads*) oder mit Streptavidin beschichtete Platten gebunden.

Vorbereitung

Zur Vorbereitung der Bindung der biotinylierten RNA an das Streptavidin wurden 40pmol der RNA in 40µl TE-Puffer pH 6,8 resuspendiert, 5min auf 65°C erhitzt und und 2h auf Eis inkubiert. Die Stammlösung der Streptavidin-Dynabeads wurde resuspendiert und 20µl (200µg) pro Ansatz abgenommen. Zur Bildung eines Pellets wurden die Kügelchen im MPC-M-Ständer ca. 2min belassen und der Überstand abgenommen. Die Kügelchen wurden auf diese Weise zweimal mit 20µl der Lösung A (0,1M NaOH, 0,05M NaCl) und einmal mit Lösung B (0,1M NaCl) gewaschen und in Lösung B im Ausgangsvolumen resuspendiert.

Immobilisation der RNA

Zur Immobilisation der RNA wurden die Kügelchen einmal mit BW-Puffer gewaschen und im doppelten Volumen mit einer Endkonzentration von 5µg/µl resuspendiert. Die vorbereitete RNA wird dazupipettiert und unter Rotation bei RT 15min inkubiert. Nach weiteren 15min im MPC-M-Ständer wurde der Überstand abgenommen und die Kügelchen dreimal mit BW-Puffer gewaschen.

Positive Selektion

Nach Vorbereitung der Kügelchen und Immobilisation von bcr-abl-100nt-RNA wurden die Kügelchen eine Stunde bei 4°C unter Rotation mit 500µl Superblock inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit 500µl PBS/0,05% Tween gewaschen und in die Kügelchen in 20µl PBS/0,05% Tween resuspendiert. Es wurden 10µl der Original-Phagenlösung, 50µl Superblock und 440µl TE-Puffer dazugegeben und ü. N. bei 4°C unter Rotation inkubiert.

Der Überstand wurde abgenommen, bei 4°C gelagert und die Kügelchen siebenmal mit 500µl PBS/0,05% Tween gewaschen. Die Waschüberstände wurden aufgehoben und später getitert. Die positiven Phagen wurden mit 100µl 0,2M Glycin-BSA-Puffer 5min bei RT unter Schütteln eluiert und zu 15µl Tris-HCl pH 9,1 in Eppendorfreaktionsgefäße gegeben.

Negative Selektion

Nach Vorbereitung neuer Kügelchen und Immobilisation der bcr-100nt-RNA wurde der Ansatz eine Stunde bei 4°C unter Rotation mit 500µl Superblock inkubiert und anschließend zweimal mit 500µl PBS/0,05% Tween gewaschen und in 20µl PBS/0,05% Tween resuspendiert. Nun wurden 100µl Eluat der positiven Selektion, 20µl Superblock und 80µl TE-Puffer hinzugegeben und ü. N. bei 4°C unter Rotation inkubiert. Die positiven Phagen befanden sich jetzt im Überstand, der nach 16h abgenommen wurde.

Auf die negative Selektion mit bcr-100nt-RNA folgte eine zweite negative Selektion mit abl-100-nt-RNA. Es wurden wieder neue Kügelchen vorbereitet und die abl-100nt-RNA daran immobilisiert. Nach zwei Waschschritten mit 500µl PBS/0,05% Tween wurden die Kügelchen in 20µl resuspendiert und mit dem 180µl Überstand der bcr-100nt-Negativ-Selektion ü. N. bei 4°C unter Rotation inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und darin enthaltenen Phagen amplifiziert.

2.2.2.2 Amplifikation und Fällung der Phagen

Amplifikation der Phagen mit *E.coli*-Zellen ER2738 host strain

Auf LB-Platten wurden 100µl der Tetrazyklinlösung ausgestrichen. Darauf wurden 2µl der *E.coli*-ER2738 *host strain*-Stammlösung (NEB) ausplattiert und ü. N. bei 37°C inkubiert. Diese Platten wurden ca. sechs Wochen verwendet.

Zur Vorbereitung einer Amplifikation wurde 15ml LB-Medium mit einem Klon der Platte inokuliert und ü.N. bei 37°C geschüttelt. Diese Bakterienlösung wurde 1:100 in 25ml LB-Medium verdünnt, 100µl Eluat bzw. Überstand hinzufügt und 4,5h bei 37°C geschüttelt.

Phagenpräzipitation

Nach Amplifikation wurden die Phagen präzipitiert. Die Bakterien wurden bei 10.000U/min, 10min bei 4°C abzentrifugiert, der Überstand erneut zentrifugiert und 80% des neuen Überstandes mit 1/6 des Volumens PEG-Lösung vermischt. Die Phagen wurden ü. N. bei 4°C gefällt und 15min bei 4°C und 10.000U/min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1ml TBS resuspendiert, 5min bei 4°C inkubiert und wiederum mit 1/6 des Volumens an PEG-Lsg. vermischt. Nach einer Stunde Fällung bei 4°C wurden die Phagen 10min bei 13.000U/min abzentrifugiert und das Pellet in 200µl TBS aufgenommen.

Bestimmung des Phagentiters und Bildung von einzelnen Phagenplaques

Von der positiven Selektion wurden die Phagentiter vom Überstand, der Waschschrritte und des Eluates, von der negativen Selektion die Titer der Überstände bestimmt. Diese einzelnen

Lösungen wurden 1:10 bis 1:1000 in PBS verdünnt. Nach Amplifikation und Fällung von Phagen wurden zur Titerbestimmung Verdünnungen zwischen 1: 10⁸ und 1:10¹¹ angesetzt.

Zur Vorbereitung des Titern wurden 15ml LB-Medium mit einem Klon der *E.coli*-ER2738-Platte inokuliert und ü.N. bei 37°C geschüttelt. Von den einzelnen Selektionen wurden vom Eluat (1:10⁸-1:10¹¹) und vom Überstand (10⁻²-10⁻⁵) Verdünnungen in PBS angesetzt.

Der Top-Agar wurde aufgekocht, auf 45°C abgekühlt, zu 3ml-Ansätzen pro Probe aliquotiert und 400µg X-gal und 15µl 0,5M IPTG dazupipettiert.

Von der Übernachtskultur wurden 200µl vorgelegt und 10µl der jeweiligen Verdünnung dazupipettiert, 5min bei RT inkubiert und zu dem Top-Agar gegeben. Der Ansatz wurde auf vorgewärmte LB-Platten ohne Antibiotikum ausgegossen und ü. N. bei 37°C inkubiert. Die blauen Plaques wurden gezählt und die *Plaque forming units* (Pfu) bestimmt.

$\text{Pfu}/\mu\text{l} = \text{Anzahl der Plaques} * \text{Verdünnungsfaktor} / 10\mu\text{l}$

Zur längeren Aufbewahrung wurden die Phagenlösungen 1:1 mit Glycerol verdünnt und bei -20°C gelagert.

2.2.2.3 ELISA

Um die spezifische Bindung der Phagen an die RNA überprüfen zu können wurde ein ELISA-Verfahren durchgeführt. Dazu wurden die Phagen der einzelnen Plaques amplifiziert, die Phagen über eine PEG/Ethanol-fällung präzipitiert und an die immobilisierte RNA gebunden. Der Nachweis bindender Phagen erfolgte mit einer Farbreaktion durch eine Peroxidase, gekoppelt an einen Anti-Phagen-Antikörper.

Amplifikation der Phagen

Eine Übernachtskultur des *E.coli*-ER2738-Stammes wurde 1:100 in 2ml LB-Medium pro Phage verdünnt und mit einem einzelnen Phagenplaque beimpft. Der Ansatz wurde 4,5h bei 37°C geschüttelt und in Eppendorfreaktionsgefäßen 10min bei 10.000U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in neuen Gefäßen wiederholt zentrifugiert und 160µl des erneuten Überstandes mit 27,5µl PEG/NaCl-Lösung gemischt und mindestens eine Stunde bei 4°C inkubiert. Die Phagen wurden 15min bei 4°C und 10.000U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet erneut zentrifugiert und der Rest des neuen Überstandes abpipettiert. Das Pellet wurde in 500µl TBS-Puffer resuspendiert und 5min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 85µl PEG/NaCl-Lösung vermischt und auf Eis 15-60min inkubiert. Danach wurde 10min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet erneut zentrifugiert und der Rest des neuen Überstandes abpipettiert. Das Pellet wurde in 50µl TBS resuspendiert.

Titern

Das Phagenamplifikat wurde wie beschrieben (2.2.4.2) getitert. Dabei wurde der Titer von Verdünnungen von $1:10^8$ - $1:10^{11}$ bestimmt.

Immobilisation der RNA

An die Oberfläche von Vertiefungen einer Maxisorb-96-Lochplatte wurden $3\mu\text{g}$ Streptavidin, gelöst in $100\mu\text{l}$ PBS gegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Platte wurde dreimal mit PBS gewaschen und mit 3% Magermilchpulver in PBS/ Tween zwei Stunden bei RT geblockt. Es folgte dreimal Waschen der Platte mit TBS.

50ng der biotinylierten RNA/ Vertiefung wurden in $100\mu\text{l}$ TE-Puffer (pH 6,8) 3min bei 85°C denaturiert und 20min auf RT abgekühlt. Pro Klon wurden 12 Vertiefungen der mit Streptavidin beschichteten Platte mit der RNA, zwei Vertiefungen mit dem Phagen-AK M13-Biotin ($50\text{ng}/100\mu\text{l}$ $0,1\text{M}$ NaHCO_3 , pH 8,6) 90min bei RT inkubiert. Die Überstände wurden verworfen, und sechsmal mit $1\times\text{TBS}/0,05\%$ Tween gewaschen.

Bindung der Phagen an die immobilisierte RNA

In einer Extraplatte, die vorher geblockt wurde, wurden von 10^{12} Virionen ausgehend vierfach Verdünnungen der Phagenklone in $200\mu\text{l}$ TBS/Tween angesetzt. Es ergaben sich folgende 12 Verdünnungen: 1×10^{12} , $2,5\times 10^{11}$, $6,25\times 10^{10}$, $1,6\times 10^{10}$, 4×10^9 , 1×10^9 , $2,5\times 10^8$, $6,25\times 10^7$, $1,6\times 10^7$, 4×10^6 , 1×10^6 , 2×10^5 Virionen. Die Verdünnungen wurden auf die RNA übertragen und ein bis zwei Stunden bei RT geschüttelt. Die Überstände wurden verworfen, und sechsmal mit $1\times\text{TBS}/0,05\%$ Tween gewaschen.

Detektion der gebundenen Phagen

Der HRP-anti-M13-AK wurde $1:5000$ in Blockpuffer verdünnt und davon $200\mu\text{l}$ auf jedem Ansatz eine Stunde bei RT unter Schütteln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden $100\mu\text{l}$ der OPD-Lösung dazugegeben, 7min inkubiert, die Reaktion mit $100\mu\text{l}$ 2N H_2SO_4 abgestoppt und die Platte im Photometer bei $492/620\text{nm}$ gemessen.

2.2.2.4 Sequenzierung

Um die DNA der Phagen sequenzieren zu können, wurden die Phagen amplifiziert, die DNA über eine PEG/Ethanol fällung präzipitiert und als Matrize in eine Sequenzierungsreaktion eingesetzt.

Eine Übernachtskultur des *E.coli*-ER2738-Stammes wurde $1:100$ in 1ml LB-Medium pro Phage verdünnt und mit einem einzelnen Phagenplaque beimpft. Der Ansatz wurde $4,5\text{h}$ bei 37°C geschüttelt und in Eppendorfreaktionsgefäßen 30s abzentrifugiert. $500\mu\text{l}$ des

Überstandes wurden mit 200µl PEG/ NaCl-Lösung gemischt und nach 10min Inkubation bei RT 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet erneut zentrifugiert und der Rest des neuen Überstandes abpipettiert. Das Pellet wurde in 100µl Iodid-Puffer resuspendiert und mit 250µl Ethanol 10min bei RT inkubiert. Nach 10min Zentrifugation wurde das Präzipitat mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30µl TE-Puffer aufgenommen. Zur Quantifizierung der Phagen-ssDNA (7250nt) wurden 2µl auf ein 1% Agarosegel aufgetragen und mit 0,5µg des M13mp18-ssDNA-Markers verglichen.

In die anschließende Sequenzierungsreaktion wurden 10µl (0,5µg) der Phagenlösung mit 4µl BigDye und 6pmol des Sequenzierungsprimers -96 (NEB) eingesetzt. Die Sequenzierungsreaktion verlief nach den Bedingungen in 2.2.1.30, wurde anschließend mit einer Ethanol-fällung aufgereinigt und in 25µl HPLC-Wasser aufgenommen.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Methoden, die in der Arbeit angewendet wurden, waren in der Arbeitsgruppe etabliert.

2.2.3.1 Allgemeine Zellkultur

Von jeder Zelllinie wurden nach Erwerb, Generierung oder Auftauen Aliquots in einer Mischung aus 45% des entsprechenden Zellkulturmediums, 45% FCS und 10% DMSO im Stickstofftank bei -196°C konserviert. Um für alle Versuche einen möglichst identischen Phänotyp zu garantieren, wurde eine aufgetaute Zellcharge nicht länger als zwei Monate in Kultur gehalten. Zur Sicherung des Bestands wurde spätestens nach der zweiten Passage dieser aufgetauten Zellen ein neues Aliquot eingefroren.

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte unter sterilen Bedingungen in Standardzellkulturflaschen in einem Brutschrank bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre mit 5% CO₂. Zum Schutz vor Kontaminationen wurden die Arbeiten grundsätzlich an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Zusätzlich wurden den Kulturmedien Antibiotika (Penicillin und Streptomycin) zugesetzt. Alle verwendeten Lösungen und Arbeitsgeräte wurden vor Gebrauch sterilisiert.

Adhärente Zellen bilden eine Einzelzellschicht am Gefäßboden aus. Nach drei bis vier Passagen wurden die Zellkulturen zur Vermeidung von Kontaminationen in eine neue Zellkulturflasche überführt.

Die Erhaltungskulturen von adhärennten Zelllinien wurden alle drei bis vier Tage subkultiviert. Dazu wurde das Medium entnommen, der Zellrasen mit 10ml PBS gewaschen, HeLa- und Meg01-Zellen mit *Cell Dissociation Buffer*, NIH3T3-Zellen mit Trypsinlösung überschichtet und 5min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS von der Oberfläche abgespült, in

ein Falconröhrchen überführt und 5min bei 1.000U/min zentrifugiert. Die 293T-Zellen wurden durch manuelles, kräftiges Klopfen an der Zellkulturflasche von der Oberfläche abgelöst. Durch Zugabe von 10ml PBS in die Zellkulturflasche wurden die restlichen Zellen abgespült und ebenfalls zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Medium resuspendiert, die Zellzahl mit dem Zellzählgerät bestimmt und die Zellen mit einer Dichte je nach Bedarf und Notwendigkeit in eine Flasche mit neuem Medium mit FCS/Penicillin/Streptomycin ausgesät. Die restliche Zellsuspension wurde entweder verworfen oder für die Anzucht der Zellen in weiteren Zellkulturflaschen (je nach Versuch) genutzt.

Für die Passage von Suspensionszellen (Ba/F3, K562, U937) wurden die Zellen in dem vorhandenen Medium resuspendiert, 95% der Suspension entnommen und durch neues Medium ersetzt. Zur Ernte für Versuche wurden die Zellen vorsichtig resuspendiert und abzentrifugiert und die Zellzahl bestimmt.

Präparation von murinem IL-3 nach Sekretion durch WEHI-3B-Zellen

Ba/F3-Zellen benötigen murines IL-3 für ein optimales Zellwachstum. Dieser Wachstumsfaktor wird von WEHI-3B-Zellen sezerniert. Der Überstand der WEHI-3B-Zellen wird somit bei Kultivierung von Ba/F3-Zellen eingesetzt.

1×10^7 -WEHI-3B-Zellen wurden in 50ml RPMI/ 10% FCS drei Tage bei 37°C kultiviert. Danach wurden die Zellen schonend sedimentiert und der Überstand bei 4°C gelagert. Die Zellen wurden erneut in 50ml Medium kultiviert und zwei Tage später abzentrifugiert. Die IL-3-haltigen Überstände wurden vereinigt, durch einen Sterilfilter 0,45µm gegeben und in Aliquots von 50ml und 15ml bei -20°C gelagert. Zum späteren Gebrauch wurde Zellkulturmedium mit 10% des WEHI-3B-Überstandes hergestellt.

2.2.3.2 Aufreinigung von genomischer DNA aus Zellsuspensionen

Für die Gewinnung genomischer DNA wurden Zellen der entsprechenden Linie in einer 75cm²-Zellkulturflasche herangezüchtet, mit PBS gewaschen und anschließend in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß 5min bei 1.000U/min pelletiert. Das Zellsediment (etwa 1×10^6 Zellen) wurde in 200µl PBS aufgenommen. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach den Herstellerangaben des verwendeten QIAamp DNA *Blood Minikits*. Die genomische DNA wurde mit 200µl aq. dest. eluiert.

2.2.3.3 Detektion und Beseitigung von Mycoplasmenkontaminationen

Aus einer Zellsuspension wurde genomische DNA isoliert, die Konzentration bestimmt und in eine PCR zur Amplifikation eines Mycoplasmen-spezifischen Gens eingesetzt. 100ng der DNA wurden in 25µl aq. dest. aufgenommen und mit 25µl eines PCR-Mastermixes (4µl dNTPs 10mM, 1µl pro Primer 100µM, 10x PCR-Puffer mit 15mM MgCl₂, 0,5µl Taq-Polymerase) vermischt. Die PCR verlief mit 5min Denaturierung, 35 Zyklen mit je 1min 95°C, 56°C und 72°C sowie 10min abschließender Elongation. Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel überprüft. Eine Mycoplasmen-positive Probe besaß eine Bande bei 560Bp. Die verunreinigte Zellkultur wurde über mindestens zwei Wochen mit Ciprofloxacin behandelt. Dazu wurden die Zellen in geringer Zelldichte alle 2 bis 3 Tage mit 5µl der Ciprobay-200-Lösung pro Milliliter Medium neu ausgesät. Anschließend wurde die Zellkultur erneut auf Mycoplasmen untersucht.

2.2.3.4 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Die transiente Transfektion ist eine Methode zum Einbringen von Plasmid-DNA in eukaryote Zellen, bei der die Plasmid-DNA nicht in das Genom integriert wird. In Abhängigkeit von den verwendeten Zelllinien und den durchzuführenden Versuchen wurde die Calciumchlorid-Transfektion, die Elektroporation oder die Lipofektion durchgeführt. Die aufgenommene DNA ist in der Zelle nur wenige Tage vorhanden, da sie Abbauvorgängen unterliegt.

Elektroporation

Die effizienteste Technik zum Einschleusen von DNA ist die Elektroporation, bei der durch ein starkes elektrisches Feld die Membran der eukaryontischen Zelle kurzfristig perforiert wird, sodass die DNA durch die Poren in die Zelle diffundieren kann.

Die Zellen wurden 1×10^7 /ml Medium aufgenommen. Pro Elektroporationsansatz wurden 100µl Zellen ($=1 \times 10^6$) mit 5µl siRNA-Duplex (20µM) in Küvetten (Biozym) mit dem EPI2500 elektroporiert. Die Bedingungen variierten je nach Zelllinie. Die Ansätze wurden in den Küvetten 15min bei RT inkubiert und anschließend mit 500µl Medium ausgespült und in 24-Lochplatten überführt.

Lipofektion

Für Lipofektionsversuche wurden 1×10^5 HeLa- oder BHK21-Zellen in 500 bis 1000µl Medium/FCS pro Vertiefung einer 24-Lochplatte ausgesät und mindestens vier Stunden bei 37°C inkubiert. Die Lipofektion wurde bei einer 90%igen Konfluenz der Zellen durchgeführt.

Für eine Lösung A wurden je 1 µg der zu testenden Plasmide mit 50 µl FCS-freiem Medium vermischt. Zur Kontrolle der Lipofektionseffizienz wurde 0,1 µg eines LNGFR-exprimierendem Plasmids dazupipettiert. Für die Lösung B wurden pro zu lipofizierendem Mikrogramm an Plasmid 3 µl des gut gemischten Lipofectamine 2000-Reagents ebenfalls zu 50 µl FCS-freiem Medium gegeben und 5 min bei RT und mehrmaligem Schütteln inkubiert. Nun wurden Lösung A und B zusammenpipettiert und 20 min bei RT inkubiert. Das Medium der Zellen wurde durch 400 µl an frischem Medium/10% FCS ersetzt, die Lösung AB dazupipettiert und die Zellen 24 bzw. 48 h bei 37°C bebrütet.

CaCl₂-Transfektion

Die CaCl₂-Transfektion wurde in 293T-Zellen durchgeführt. Dazu wurden Petrischalen (Ø 10 cm) 3 ml 0,1% Gelatine beschichtet. Danach wurden auf den Schalenboden 1x10⁶ 293T-Zellen in 10 ml DMEM-Medium gegeben und 3 d bei 37°C bebrütet (oder 3x10⁶ Zellen 1 d). In einem Reaktionsgefäß wurden 20 µg des zu transfizierenden Plasmids, 61 µl CaCl₂ und Wasser mit einem Endvolumen von 500 µl pipettiert und zu 500 µl 2x HBS tropfenweise unter Bläschenbildung gegeben. Zu 3 ml DMEM wurden 1,7 µl 0,1 M Chloroquine pipettiert und nach Abnahme des Mediums auf die Zellen gegeben. Danach wurde 1 ml Präzipitat auf die Zellen gegeben und 8 h (oder ü. N.) bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 10 ml neuem Medium überschichtet.

2.2.3.5 Markierung von Zellen mit Antikörper

Um Strukturen, die nicht fluoreszieren, im FACS-Gerät detektieren zu können, wurden diese mit einem spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörper gekoppelt. Nach der Lipofektion des LNSN-Plasmids in HeLa-Zellen wurde die Expression des LNGF-Rezeptors mit einem PE-NGFR-Antikörper überprüft. Dazu wurde von den Zellen das Medium im Überstand abgenommen und 200 µl des *Cell Dissociation Buffer* auf die Zellen gegeben und ca. 5 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden mit 1 ml PBS abgespült und in ein FACS-Röhrchen pipettiert. Nun erfolgte eine Zentrifugation von 5 min bei 1.000 U/min. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 5 µl des PE-NGFR-Antikörpers in 50 µl PBS nach Vortexen 20 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml PBS wurden die Zellen 5 min bei 1.000 U/min zentrifugiert und das Pellet in 300 µl PBS aufgenommen.

Anschließend erfolgte die Messung des Anteils fluoreszierender Zellen im FACS-Gerät.

2.2.3.6 Propidiumiodid-(PI)-Färbung

Der Anteil toter Zellen läßt sich im FACSCAN mit Hilfe der Aufnahme von Propidiumiodid (PI) messen. PI wird hierbei von toten Zellen aufgrund ihrer Membrandysfunktion aufgenommen und interkaliert in der DNA. Somit fluoresziert es stark.

Das PI wurde mit 5µg/ml in PBS gelöst. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und nach Zentrifugation 5min bei 1.000U/min in 100µl PI aufgenommen. Nach ca. 10min wurden die Zellen im FACS gemessen (FL2 oder FL3 versus FSC).

2.2.3.7 Präparation von rekombinanten retro- und lentiviralen Überständen

Die Virusproduktion erfolgte lentiviral in der Verpackungszelllinie 293T, retroviral in Φ Nx-GP-Zellen. Um die notwendigen Plasmide in die Zellen einzubringen, wurde eine CaCl_2 -Transfektion durchgeführt. Nach 24h wurde mit der Virusernte begonnen und der Virus über zwei Tage gesammelt. Die Viruskonzentrierung erfolgte in zwei Runden durch Ultrazentrifugation.

Um genügend Virus produzieren zu können wurden 175cm²-Zellkulturflaschen verwendet. Der Boden wurde mit 5ml Polylysin beschichtet, 5min bei RT inkubiert und wieder abgenommen. Nach einem Waschschrift mit 20ml PBS wurden die Flaschen 2h unter der Sterilwerkbank getrocknet. Je nach Bedarf wurden pro Flasche 3×10^6 bis 1×10^7 Zellen in 25ml DMEM/10%FCS ausplattiert. Nach ein bis drei Tagen war der Boden konfluent bewachsen und es erfolgte die Transfektion. Dazu wurden 1500µl in ein Röhrchen vorgelegt und ein DNA/ CaCl_2 -Gemisch (siehe Schema) unter Blasenbildung tropfenweise hinzupipettiert.

DNA/ CaCl_2 -Gemisch pro Flasche

Plasmide zur Expression des	Lentivirus	Retrovirus	
dcH1-shRNA-SR	80µg	pBabepuro	60µg
pCMVΔR8.9.1	52µg	M57 gag-pol	45µg
pMD.G	28µg	enveco-IRES-puro	25µg
2M CaCl_2	183µl	2M CaCl_2	183µl
aq. dest.	ad 1500µl	aq. dest.	ad 1500µl

Von den Zellen wurde das Medium abgenommen und durch 12ml DMEM/10%FCS mit 4µl 0,1M Chloroquine ersetzt. Das Präzipitat wurde hinzugefügt und die transfizierte Zellkultur bei 37°C inkubiert. Nach 8 bis 16h wurde das präzipitathaltige Medium entfernt und durch 25ml DMEM / 10% FCS mit 10mM Na-Butyrat ersetzt. Nach 8h erfolgte ein Mediumwechsel mit 16ml FCS-freiem RPMI-Medium zum Beginn der Virusernte. Die Virusernte erfolgte innerhalb der nächsten zwei Tage viermal. In Abständen von 8 bis 16h wurde der

Zellüberstand mit den Viren entnommen und neues RPMI-Medium auf die Zellen gegeben. Die Überstände wurden mit einem Sterilfilter (0,45µm) filtriert und das Virus portionsweise in der Ultrazentrifuge 14h bei 10.000U/min und 10°C pelletiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Virus mit 200µl RPMI-Medium durch Schütteln (15 bis 20min) resuspendiert. Das konzentrierte Virus wurde in Aliquots bei -80°C eingefroren oder direkt zur Transduktion von Zellen oder zur Titerbestimmung eingesetzt.

2.2.3.8 Transduktion von Zellen

Je nach Bedarf wurden 1×10^5 bis 1×10^6 Zellen in 200µl FCS-freiem RPMI-Medium in 96- oder 48-Lochplatten ausgesät, 5µl Protaminsulfat (100x) dazugegeben und mit 50 – 100µl Virus transduziert. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 2500U/min, 90min und 32°C. Danach wurden 250µl RPMI/10% FCS zu den Ansätzen pipettiert. Nach 4h Inkubation der Zellen bei 37°C wurde zu jedem Ansatz erneut 50 – 100µl Virus gegeben und zentrifugiert. Nach Inkubation bei 37°C ü. N. wurden die Zellen sedimentiert, mit PBS gewaschen und in 24- (1ml) bzw. 6-Lochplatten (3ml), oder in 25cm²-Zellkulturflaschen mit 10ml Medium überführt.

2.2.3.9 Virustiterbestimmung

Nach einmaliger Transduktion von 1×10^5 K562-Zellen mit 1µl bzw. 10µl Virus in 96-Lochplatten und Inkubation bei 37°C über Nacht wurden die Zellen in 24-Lochplatten mit 1ml Medium überführt. Nach 4d wurde der Anteil rotfluoreszierender Zellen im FACS (RFP %) gemessen. Der Virustiter wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Titer (cfu/ ml)} = (\text{RFP (\%)/100}) * (1 \times 10^5 / \text{Volumen (Virus in } \mu\text{l)})$$

2.2.3.10 Zellproliferationsbestimmung

Zu 10µl Trypanblau wurden 10µl Zellen der Ausgangszellkultur gegeben und die Anzahl der lebenden Zellen in der Zählkammer bestimmt. In einer neuen Vertiefung einer 24-Lochplatte wurden 50.000 lebende Zellen in 1000µl Medium pipettiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden aus dem neuen Ansatz je 10µl Zellen nach gutem Mischen entnommen und wiederum nach Zugabe von 10µl Trypanblau die Anzahl der lebenden Zellen in der Zählkammer bestimmt. Die Zellzahl in zwei großen Quadranten entspricht der Anzahl an Zellen in 0,1µl Kultur.

2.2.3.11 Durchflusszytometrische Analysen [154]

Fluoreszenzmarkierte Zellen wurden mit einem Zytofluorometer, dem „Fluorescence-activated cell sorter“ (FACS) von der Firma Becton Dickinson ausgewertet.

Es handelt sich dabei um ein optisches Messsystem von Streulicht und Fluoreszenzsignalen einzelner Partikel bis zu einer Größe von 100µm. Es können Zellen verschiedenster Herkunft untersucht werden, Voraussetzung ist allerdings eine Einzelzellsuspension. Im FACS-Gerät werden die zu untersuchenden Zellen in einer isotonischen Trägerflüssigkeit mit Druck in den sogenannten Mantelstrahl injiziert. Auf diese Weise werden sie beschleunigt und gelangen einzeln in eine Messkammer. Dort werden die Zellen von einem kohärenten Laserstrahl getroffen und das gestreute Licht bei 180° (FSC = forward light scatter) und bei 90° (SSC = sideward light scatter) gemessen. Die entstehende Streuung ist abhängig vom Zelltyp mit einer spezifischen Querschnittsfläche (FSC) sowie Granularität, Membranfaltung und äußerer Zellform (SSC). Das gestreute Laserlicht wird gesammelt, gefiltert, in bestimmte Wellenlängenbereiche eingeteilt und in elektronische Signale umgewandelt. So entstehen in einer Dot Plot Grafik im Computer abgegrenzte Punktwolken, die sich dann bestimmten Zellarten zuordnen lassen. Durch Einrichten von bestimmten Fenstern (gates) werden die gewünschten Zellen eingegrenzt und können von anderen Zellarten oder toten Zellen abgegrenzt werden.

Besitzen die Zellen ein fluoreszierendes Protein oder sind mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper gekoppelt, werden sie mit einem Laserstrahl bestimmter Wellenlänge angeregt. Sie geben dann ein für den Farbstoff charakteristisches Spektrum an Lichtstrahlen ab, das durch elektronische Detektoren als Signal aufgefangen und im Vervielfältiger verstärkt wird. Je mehr fluoreszierende Proteine sich in oder auf der Zelle befinden, desto größer ist die Fluoreszenzintensität der Zelle. Die Autofluoreszenz der Zellen wird durch nicht fluoreszierende Kontrollen bestimmt und am Computer diskriminiert. Da sich die Emissionsspektren verschiedener Farbstoffe, z. B. GFP und RFP überlappen, und die Trennung durch Lichtfilter nicht ausreichend ist, ist hier eine Korrektur notwendig. Ansonsten erscheinen rotleuchtende Zellen auch im grünen Kanal und grünleuchtende Zellen im roten Kanal. Zur Korrektur der spektralen Überlappung ist eine Kompensationselektronik installiert, die von jedem Signalimpuls den entsprechenden Fluoreszenzanteil subtrahiert. Die Kompensation wird vor jeder Messung mit gleich gefärbten Zellen eingestellt.

Auf diese Weise können fluoreszierende Zellen von nicht fluoreszierenden Zellen unterschieden werden. Die prozentuale Verteilung negativer und positiver Zellen wird ermittelt und die Expressionsdichte über die Höhe der Fluoreszenzintensität (Y Mean) bestimmt. Die Auswertung der FACS-Messung erfolgte mit dem Computerprogramm CELLQuest. Die erfassten Ergebnisse wurden in Abhängigkeit von der jeweiligen Fluoreszenz, FL-1 für GFP, FL-2 für RFP und PI als Histogramm, in Quadranten unterteilt oder als Dot Plots dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 *Phage Display* – Selektion eines *bcr/abl* inhibierenden Peptidliganden

3.1.1 Präparation der biotinylierten RNA

Mit der *Phage Display*-Methode sollte ein spezifisch an die *bcr-abl*-(b3a2-)mRNA bindendes Peptid selektioniert werden. Als positives Target wurde eine 100nt lange RNA-Struktur verwendet, die den Bruchpunkt im Philadelphia-Chromosom jeweils mit 50nt umspannt. Um unspezifisch bindende Phagen auszusortieren, wurde das Eluat mit den entsprechenden Wildtypsequenzen der jeweiligen *bcr*- bzw. *abl*-RNA von 100nt Länge inkubiert. Die RNAs wurden über *in vitro*-Transkription der pTRI-Kan-Vektoren pTRI-Kan-*bcr-abl*-100, pTRI-Kan-*bcr*-100 und pTRI-Kan-*abl*-100 hergestellt. Die RNAs wurden von der T3-RNA-Polymerase mit den verschiedenen pTRI-Kan-Konstrukten als Template in einer *in vitro*-Transkription mit GMPS synthetisiert. Nach Elution der Banden mit 100nt Länge aus einem Harnstoff-Polyacrylamidgel erfolgte die Biotinylierungsreaktion über einen Iodoacetamid-anker [153]. Zur Überprüfung der Reinheit der RNA wurden 4µg (=0,1OD) auf ein PAA-Gel aufgetragen und durch Silberfärbung detektiert. Die verschiedenen RNAs hatten immer einen hohen Reinheitsgrad (Daten nicht gezeigt).

Es konnten in einer Präparation 2-6µg biotinylierte RNA gewonnen werden. Bei einem Molekulargewicht von 32500g/mol entsprach die Ausbeute an RNA 60-180pmol. Für einen Selektionschritt im *Phage Display* wurden 40pmol (=1,3µg) biotinylierte RNA benötigt.

3.1.2 *Biopanning* und Sequenzierung der Phagen-DNA einzelner Plaques

Im ersten *Phage Display*-Ansatz wurde eine chemisch synthetisierte, biotinylierte *bcr-abl*-RNA von 24nt Länge an Streptavidin-*beads* immobilisiert und drei positive Selektionen mit beiden Phagenbibliotheken (Ph.D.-7 und -12) durchgeführt. Anschließend konnten für die Bibliothek Ph.D.-7 eine, für Ph.D.-12 zwei Aminosäureabfolgen durch Sequenzierung der Phagen identifiziert werden (Abb. 12).

Im zweiten *Phage Display*-Ansatz wurde eine biotinylierte RNA an Streptavidin-Kügelchen immobilisiert. Es erfolgten drei Selektionsrunden mit beiden Phagenbibliotheken (Ph.D.-7 und -12) nach folgendem Schema:

- 1.a) Positiv-Selektion mit *bcr-abl*-100nt-RNA
 - 1.b) Negativ-Selektion mit *bcr*-100nt-RNA
 - 1.c) Negativ-Selektion mit *abl*-100nt-RNA
- Amplifikation und Fällung der Phagen

2. Positiv-Selektion mit bcr/abl-100nt-RNA
 Amplifikation und Fällung der Phagen
 3.a) Positiv-Selektion mit bcr/abl-100nt-RNA
 3.b) Negativ-Selektion mit bcr-100nt-RNA
 3.c) Negativ-Selektion mit abl-100nt-RNA
 Amplifikation und Fällung der Phagen

Nach der dritten Selektion und Amplifikation der Phagen wurde dreimal getitert und bei entsprechend hohen Verdünnungen einzelne Phagenplaques erzeugt. Nach Sequenzierung der DNA konnten 14 verschiedene Peptidsequenzen aus der Bibliothek Ph.D.-7 und fünf Peptidsequenzen mit der Ph.D.-12-Bibliothek charakterisiert werden. Mit einer sequenzvergleichenden Funktion der *Gene Runner-Software* wurden die am häufigsten vorkommenden Aminosäuren (Aln) ermittelt (Abb. 12.).

Es konnte kein sich wiederholendes Motiv identifiziert werden. Sehr häufig kamen basische Aminosäuren, v.a. Histidin, aber auch das neutrale Prolin vor.

	Ph.D.-7		Ph.D.-12	
Aln	GQHPLAR	GHHPLAH	XXXKHHHHPAXA	XHXDHHHHPAXP
1	GSKPLAL	GSKPLAL	XTHVHHHHLAXI	XTHVHHHHLAXI
2	KLALAQI	KLALAQI	HPHTRHVERAL	HPHTRHVERAL
3	TVNSQRD	TVNSQRD	YSXKFHTKPLPH	YSXKFHTKPLPH
4	ALRTAPV	ALRTAPV	XHXXLXKHPRXA	XHXXLXKHPRXA
5	YPTMHWT	YPTMHWT	XXPKHIHMHARP	XXPKHIHMHARP
6	HTHSHKP	HTHSHKP		
7	HPFPAQP	HPFPAQP		
8	HHHLLHR	HHHLLHR		
9	GQKPRAQ	GQKPRAQ		
10	GQKPLAH	GQKPLAH		
11	XXEHMAH	XXEHMAH		
12	GSXALAR	GSXALAR		
13	SHPTLPX	SHPTLPX		
14	YRHHHGV	YRHHHGV		
bcr/abl 24nt		KHHQHIIH		YHTDTKLLPLLP DMPDELTDYWWS

Abb. 12: Sequenziererergebnisse nach *Phage Display* mit den Phagenbibliotheken Ph.D.-7 und – 12. Nach drei Selektionsrunden konnten mit der bcr-abl-100nt-RNA 14 bzw. 5 Sequenzen charakterisiert werden. Mit der bcr-abl-24nt-RNA 1 bzw. 2 Sequenzen. Die Abbildung zeigt den Sequenzvergleich und ermittelt die am häufigsten vorkommenden Aminosäuren der jeweiligen Positionen. Die Aminosäuren, die nicht damit übereinstimmten, sind grau unterlegt. Nicht eindeutig sequenzierbare Basen wurden als X-Aminosäure dargestellt.

Bei einem weiteren *Phage Display*-Verfahren wurde die biotinylierte 100nt-lange RNA an einer mit Streptavidin beschichteten Platte immobilisiert und je zwei Ansätze pro Phagenbibliothek durchgeführt. Positiv- und Negativ-Selektionen nach dem oben angegebenen Schema folgten in drei Runden nacheinander. Die Phagen wurden nach Amplifikation von einzelnen Plaques sequenziert. Bei der Ph.D.-7-Bibliothek konnte nach Sequenzierung mehrerer Phagenklone in jedem Ansatz eine Peptidsequenz mit identischer Nukleotidsequenz identifiziert werden. Bei der Selektion aus der Ph.D.-12- trat eine Kontamination durch 7-mer-Phagen auf, die die gleiche Sequenz wie ein Ansatz der Ph.D.-7-Selektion besaß. Sie wurde deshalb vorzeitig beendet.

3.1.3 Überprüfung der Spezifität der selektionierten Phagen im ELISA-Verfahren

Um die nach mehreren Selektionsschritten angereicherten Phagen erneut auf ihre spezifische Bindung an die b3a2-100nt-mRNA zu überprüfen, wurde ein ELISA-Verfahren entwickelt. Dabei wurde die Oberfläche einer maximal absorbierenden 96-Lochplatte mit Streptavidin beschichtet und daran die biotinylierte RNA gebunden. Die Phagen einzelner Plaques wurden auf die RNA gegeben und über einen Peroxidase-markierten Anti-M13-Antikörper mit Hilfe einer Farbreaktion detektiert. Als Positivkontrolle wurde anstelle der RNA ein biotinylierter Anti-M13-Antikörper verwendet.

Mit Hilfe der Positivkontrolle wurde der ELISA optimiert. Hier konnten positive Werte detektiert werden. Wurde das Verfahren mit RNA durchgeführt, konnte bei keiner Probe ein positives Signal gemessen werden.

Eine Optimierung des ELISA mit RNA war nicht möglich, da kein positiver Phage oder andere Proteine als Positiv-Kontrolle zur Verfügung standen. Zudem reichte eine Präparation von biotinylierter RNA nur für die Bestimmung von maximal fünf Klonen aus, da jede Bestimmung eines Phagen mit mehreren Phagenverdünnungen im Doppelansatz erfolgen sollte.

3.2 Sekundärstrukturanalyse der 100nt-langen *bcr-abl-(b3a2)mRNA*

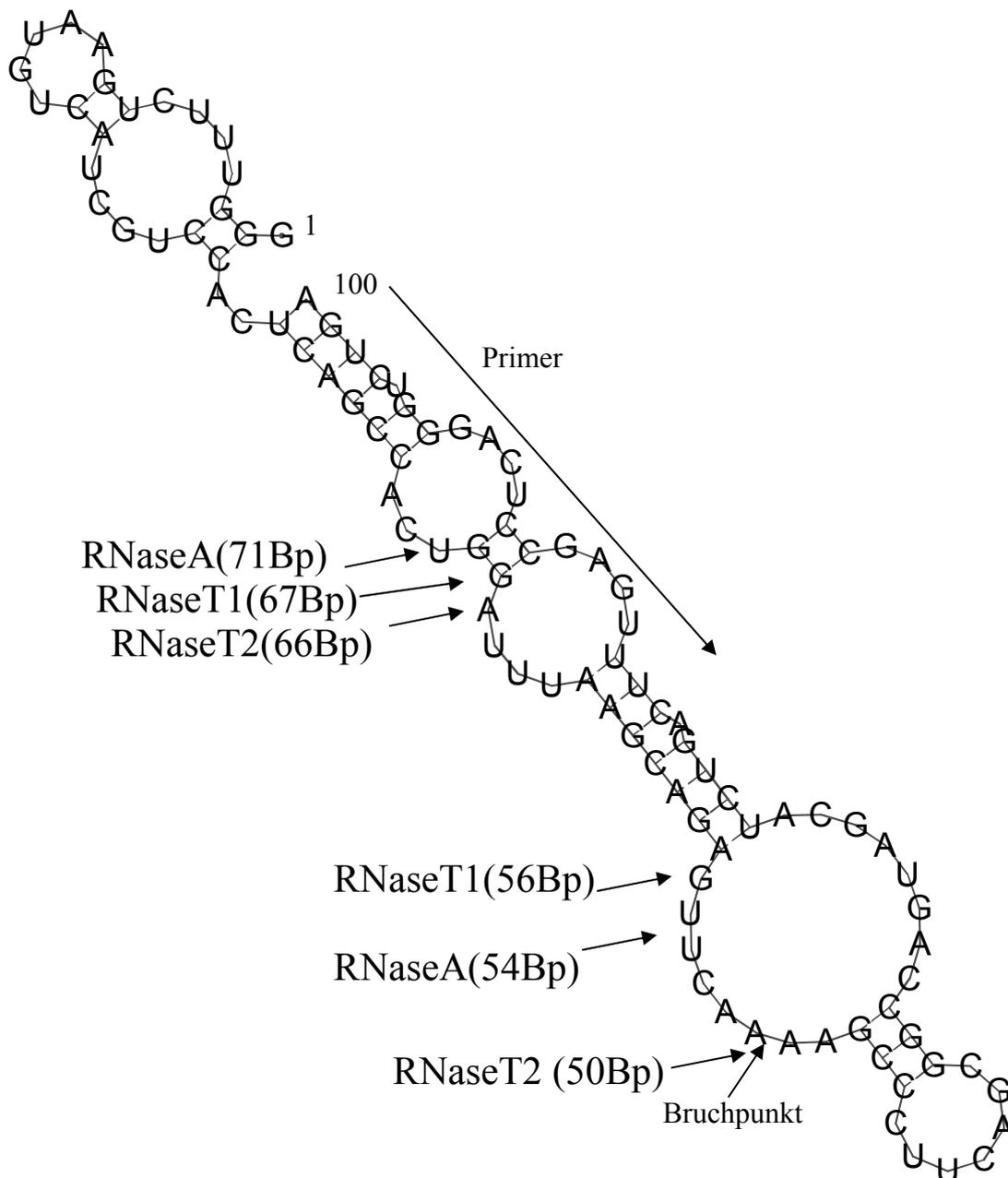


Abb. 13: cDNA-Fragmentlänge nach Spaltung mit den RNasen T1, T2 und A. Die Sequenz der 100nt langen b3a2-mRNA wurde nach theoretischer Strukturvorhersage mit der RNAfold-Software dargestellt und die im Experiment analysierten cDNA-Fragmente markiert.

In drei voneinander unabhängigen Versuchen wurden verschiedene, in der Abbildung markierte Fragmente analysiert. Die RNase T1 spaltet RNA-Moleküle nach einem einzelsträngigen Guanosen, die RNase T2 nach ssAdenosin und die RNase A nach ssCytosin und ssUracil. Dabei stimmte eine mit dem RNAfold-Programm theoretisch bestimmte Struktur mit 5 von 6 experimentell analysierten RNA-Strukturen überein. Nur das Guanosen an Position 67 war im Gegensatz zum Experiment in der Theorie doppelsträngig.

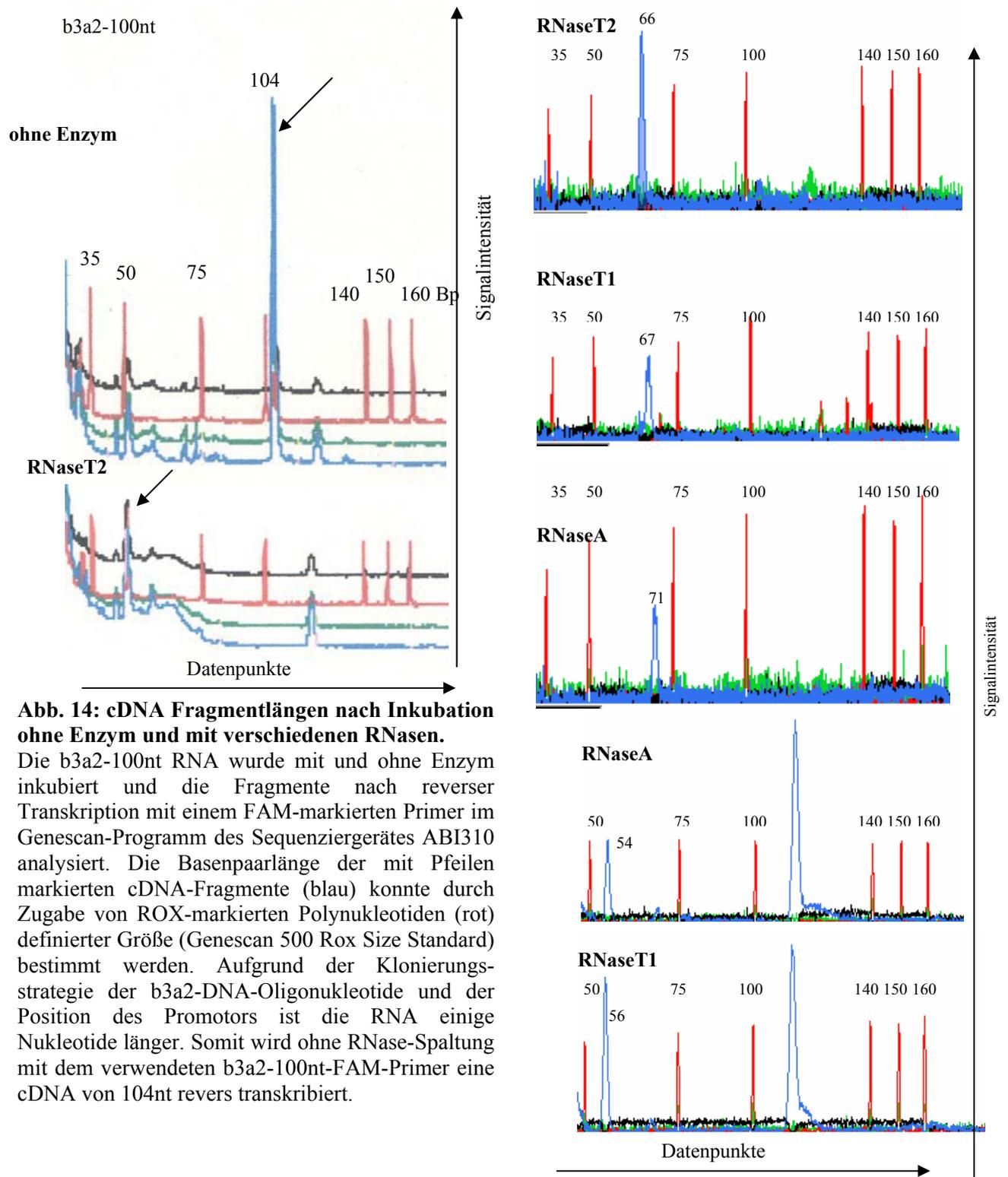


Abb. 14: cDNA Fragmentlängen nach Inkubation ohne Enzym und mit verschiedenen RNasen.

Die b3a2-100nt RNA wurde mit und ohne Enzym inkubiert und die Fragmente nach reverser Transkription mit einem FAM-markierten Primer im Genescan-Programm des Sequenziergerätes ABI310 analysiert. Die Basenpaarlänge der mit Pfeilen markierten cDNA-Fragmente (blau) konnte durch Zugabe von ROX-markierten Polynukleotiden (rot) definierter Größe (Genescan 500 Rox Size Standard) bestimmt werden. Aufgrund der Klonierungsstrategie der b3a2-DNA-Oligonukleotide und der Position des Promotors ist die RNA einige Nukleotide länger. Somit wird ohne RNase-Spaltung mit dem verwendeten b3a2-100nt-FAM-Primer eine cDNA von 104nt revers transkribiert.

3.3 *Suppression der bcr-abl-(b2a2)mRNA mit RNA-Interferenz*

3.3.1 Untersuchungen der Mauszelllinie Ba/F3-b2a2 mit STI571

Es wurde eine b2a2-positive Zelllinie verwendet, die erst bei Inhibition des stabil eingebrachten BCR-Abl-Proteins (z.B. durch den Tyrosinkinaseinhibitor STI571) einen Wachstumsfaktor braucht, um weiter proliferieren zu können.

Vier verschiedene Klone der bereits etablierten Zelllinie Ba/F3-b2a2 wurden auf BCR-Abl-Wachstumsabhängigkeit mit STI571 überprüft. 5×10^4 -Zellen wurden mit $1 \mu\text{M}$ inhibiert und über fünf Tage die Zellzahl mit Trypanblaufärbung bestimmt. Dabei zeigte sich, dass nur der Klon 3 hoch sensibel auf STI571 reagiert. Die anderen Klone schienen nur teilweise abhängig von BCR-Abl zu proliferieren. Bei Zugabe von $1 \mu\text{M}$ STI571 und IL-3-haltigem Medium zu den Zellen des Klon 3 zeigten die Zellen eine ungehinderte Zellproliferation. Demzufolge war das Zellsterben durch die Inhibition von BCR-Abl ausgelöst und konnte durch IL-3-Gabe verhindert werden. Alle weiteren Experimente erfolgten mit Ba/F3-b2a2-Zellen des Klon 3.

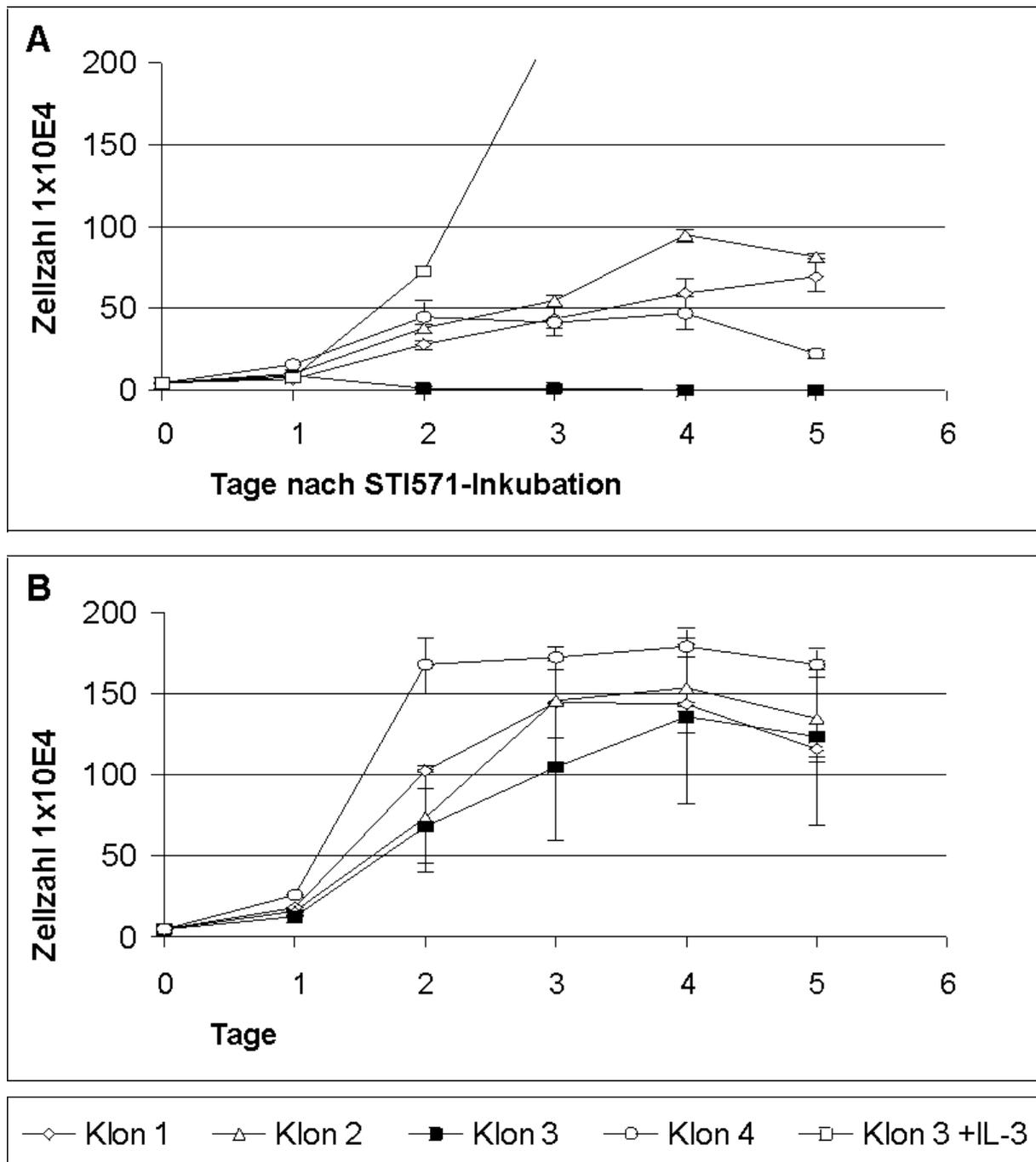


Abb. 15: Inkubation der Ba/F3-b2a2-Zellklone mit und ohne STI571. Es wurden 5×10^4 Zellen ausgesät, mit (A) bzw. ohne (B) STI571 $1 \mu\text{M}$ inkubiert und die Zellzahl über fünf Tage bestimmt. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

Zur Überprüfung der b2a2-Expression wurde aus allen vier Klonen der Ba/F3-b2a2-Zellen RNA isoliert und nach Reverser Transkription eine *Real Time-PCR* durchgeführt. Die Amplifikation der b2a2-cDNA war erfolgreich. Es zeigte sich ein positiver Anstieg bei 15 oder 16 Zyklen.

3.3.2 Klonierung der GFP-Fusionsproteins sb3a2-EGFP

Die Effektivität der siRNAs sollte schnell und relativ einfach getestet werden können. Dazu wurde ein 500Bp langes bcr-abl-Fragment, das die Bruchpunktregion einschließt, an ein GFP-Protein fusioniert. Für das 500Bp lange bcr-abl-Fragment wurde die Region so ausgewählt, dass sie mit der PH-Domäne des BCR-Proteins begann und mit der SH3-Domäne des Abl-Proteinanteiles endete. Es wurden zwei PCR-Primer konstruiert, die diese Sequenz amplifizierten und *EcoRI*-Schnittstellen einführten, die für die weiteren Klonierungen genutzt wurden. Gleichzeitig führte der reverse Primer eine *NotI*-Schnittstelle ein, über die das EGFP-Protein fusioniert werden sollte. Das EGFP-Protein besitzt eine veränderte Halbwertszeit von nur vier Stunden. Dadurch können Reduktionen auf mRNA-Ebene in kürzerer Zeit detektiert werden. Als Matrize für die PCR-Reaktion diente der pGD210-Vektor.

Aus dem pd4EGFP-N1-Vektor wurde die GFP-Sequenz mit komplementären Oligonukleotiden amplifiziert, die jeweils am 5'-Ende durch *NotI*-Schnittstellen flankiert werden. Außerdem führte der Vorwärtsprimer einen Linker von einigen Glycinen ein, über den das bcr-abl-Fragment mit dem EGFP fusioniert werden sollte.

Die PCR-Produkte wurden einzeln in pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert. Anschließend wurden bei einem pcDNA3.1/Zeo-Vektor, die in der multiplen Klonierungsstelle (MCS) vorhandene *NotI*-Schnittstelle zerstört. Dies erfolgte durch Doppelverdau mit *EcoRV* und *XhoI*, anschließendem Auffüllen der überhängenden Enden durch die Klenow-DNA-Polymerase I und Religation des Vektors. Über die verbliebene *EcoRI*-Schnittstelle wurde zuerst das sb3a2-PCR-Produkt eingesetzt, das nun wiederum eine *NotI*-Schnittstelle einbrachte. Danach erfolgte die Fusion an das 4hEGFP-PCR-Produkt über die drei *NotI*-Schnittstellen in den pcDNA3.1-Vektor. Die folgende Abbildung veranschaulicht die Klonierungsstrategie.

Das sb2a2-gfp-Fusionsprotein wurde in gleicher Weise kloniert bereitgestellt.

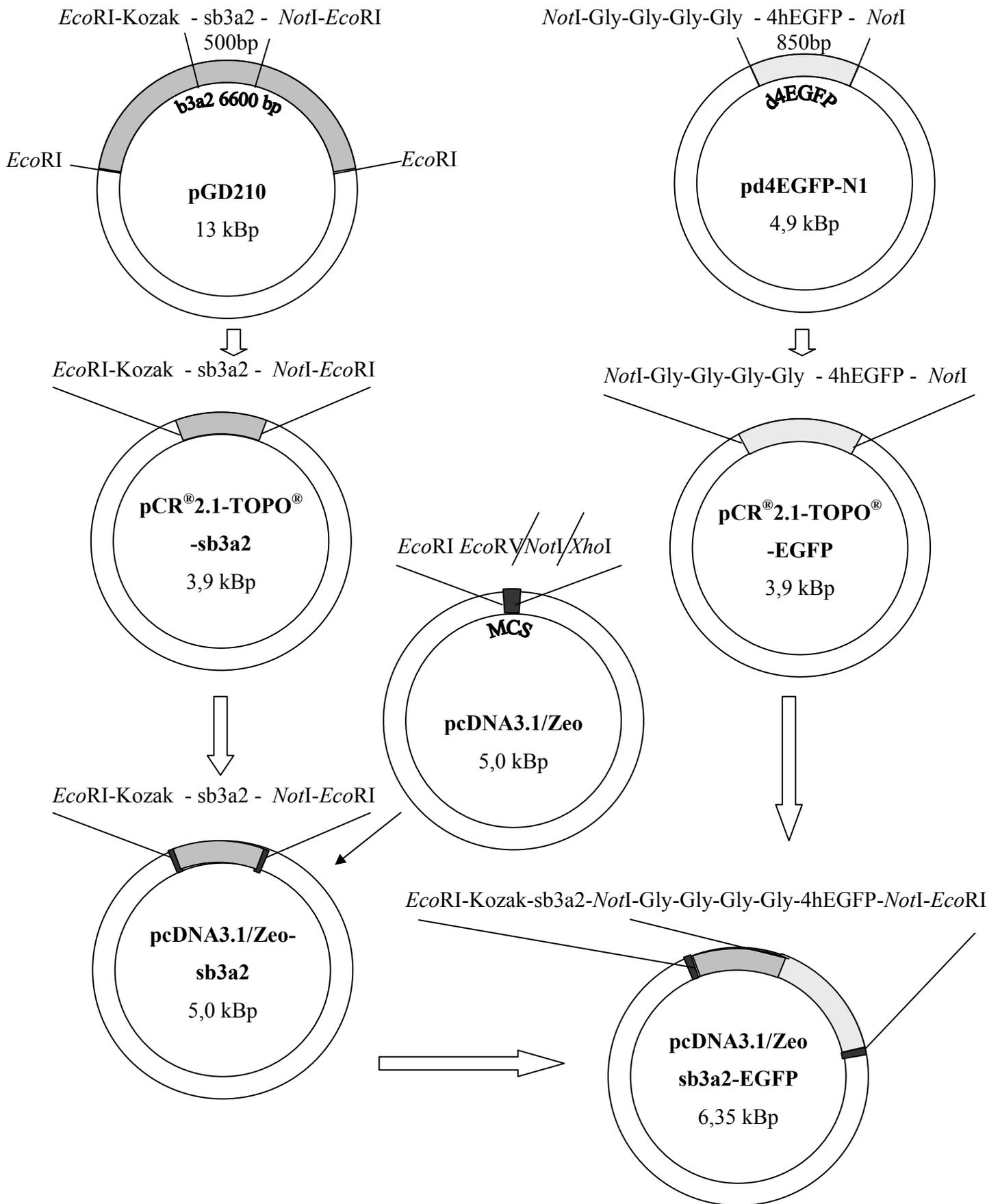


Abb. 16: Klonierungsstrategie des sb3a2-gfp-Fusionproteins

3.3.3 Transiente BCR-Abl-Suppression mit chemisch synthetisierten siRNAs

Zunächst wurde mit chemisch synthetisierten siRNAs versucht, die bcr-abl mRNA zu inhibieren. Es wurden zwei Sequenzen ausgewählt und im Reportersystem mit dem sb2a2-EGFP-Protein auf ihre Effektivität untersucht. Als Kontrollen wurden zwei siRNAs, invGL2 (KO) und anti-GL2 (GL2), nach Elbashir *et al.* [149] mitgeführt, die eine Inhibition des Luciferase-Gens bewirken.

3.3.3.1 Selektion effizienter siRNAs

Um eine effiziente siRNA gegen das b2a2-Target zu selektionieren, wurden zwei verschiedene siRNAs mit je 19 Nukleotiden und zentraler Bruchpunktregion chemisch synthetisiert (Abb. 17).

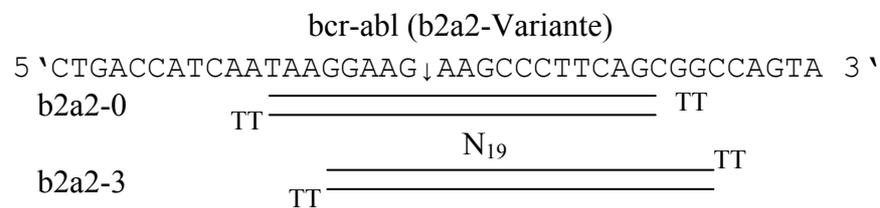


Abb. 17: Sequenzfolgen der chemisch synthetisierten siRNA-Moleküle

Zur Überprüfung der siRNA-Effizienz wurden diese zusammen mit dem sb2a2-EGFP-Konstrukt und dem LNSN-Plasmid zur Bestimmung der Transfektionsrate in HeLa-Zellen kotransfiziert. Nach Expression des LNGF-Rezeptor wurde dieser mit einem PE-markierten anti-LNGFR Antikörper markiert und die resultierende Rotfluoreszenz im FACS gemessen. Die Bestimmung der Transfektionsrate ist notwendig, um den Effekt der GFP-Reduktion durch siRNAs auch bei verschiedenen Transfektionsansätzen vergleichen zu können. Die GFP-Reduktion dient als indirektes Maß für die Wirksamkeit der siRNA, da sb2a2 an GFP fusioniert ist und mit Zerstörung der b2a2-mRNA auch GFP nicht mehr translatiert werden kann.

Die GFP-Fluoreszenzen verschiedener Transfektionsansätze mit den Kontroll-siRNAs wurde gemittelt und als 100% GFP-Fluoreszenz angenommen. Die b2a2-3-siRNA zeigte eine gute Effizienz. Der Anteil grünfluoreszierender Zellen lag bei 44%, was eine Reduktion um mehr als die Hälfte bedeutet. Im Vergleich dazu war die b2a2-0-siRNA deutlich weniger effizient; es wurden noch 89% grünfluoreszierende Zellen detektiert (Abb. 18), also nur ein Rückgang um 11%.

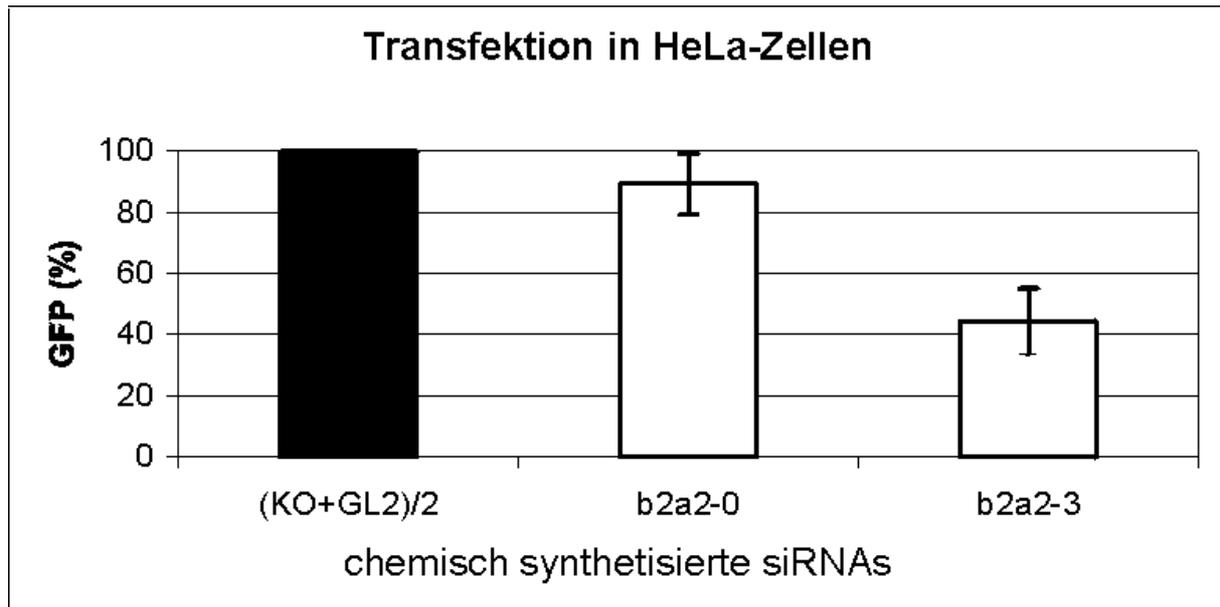


Abb. 18: Reduktion der GFP-Fluoreszenz durch chemisch synthetisierte siRNAs nach Kotransfektion mit dem sb2a2-EGFP-Reportergen in HeLa-Zellen. Die Transfektionseffizienz wurde durch Expression des LNGF-Rezeptors bestimmt und die GFP-Fluoreszenzen entsprechend verändert. Aus diesen Werten wurde zwischen den Kontroll-siRNAs ein Mittelwert gebildet und als 100% GFP-Expression angenommen.

3.3.3.2 Effekte der siRNAs in Ba/F3-b2a2-Zellen

Anschließend wurde die gemessene Reduktion durch Elektroporation der siRNAs in Ba/F3-b2a2-Zellen und Bestimmung der Zellproliferation im biologischen Zellsystem mit dem Wildtyp-BCR-Abl-Protein getestet. Durch Inhibition des BCR-Abl-Proteins wurde den Zellen ein wichtiges Proliferationssignal entzogen. Zur Kontrolle wurde den Zellen nach Elektroporation mit siRNAs in einem weiteren Ansatz IL-3 zugefügt. Dies sollte dafür sorgen, dass eine Zellproliferation auch dann möglich ist, wenn BCR-Abl reduziert ist.

Dazu wurde 0,5µg siRNA-Duplex in 1×10^6 -Ba/F3-b2a2-Zellen elektroporiert und je 1×10^5 -Zellen in verschiedenen Ansätzen mit und ohne IL-3-Zusatz in neue Platten überführt. Die Zellen wurden über fünf Tage jeweils mit Hilfe von Trypanblaufärbung gezählt. Als Kontrollen wurden die Zellen ohne siRNA, mit der GL2- und der b2a2-0-siRNA elektroporiert und gezählt. Es wurden die Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Versuchen gebildet und in der Abbildung 19 dargestellt.

Die Zellen nach Elektroporation mit der b2a2-3-siRNA und ohne IL-3-Gabe zeigten eine Verzögerung des Zellwachstums zwischen dem ersten und dritten Tag im Vergleich zu den Kontrollzellen mit der GL2-siRNA. Am zweiten Tag war die Zellzahl auf 30% vermindert. Dieser Wert ist vergleichbar mit der Reduktion im Reportersystem in HeLa-Zellen. Die verringerte Anzahl lebender Zellen war nur ein transienter Effekt, dadurch wuchsen die Zellen am Tag 4 nach Elektroporation wieder parallel zu den Kontrollzellen an. Nach der

Elektroporation mit der b2a2-0-siRNA verlief das Zellwachstum vergleichbar mit GL2-siRNA-Transfektion. Hier ist keine Verzögerung meßbar. Die Zellen, die ohne siRNA elektroporiert wurden, zeigten ein schnelleres Wachstum als die Zellen mit siRNA-Elektroporation.

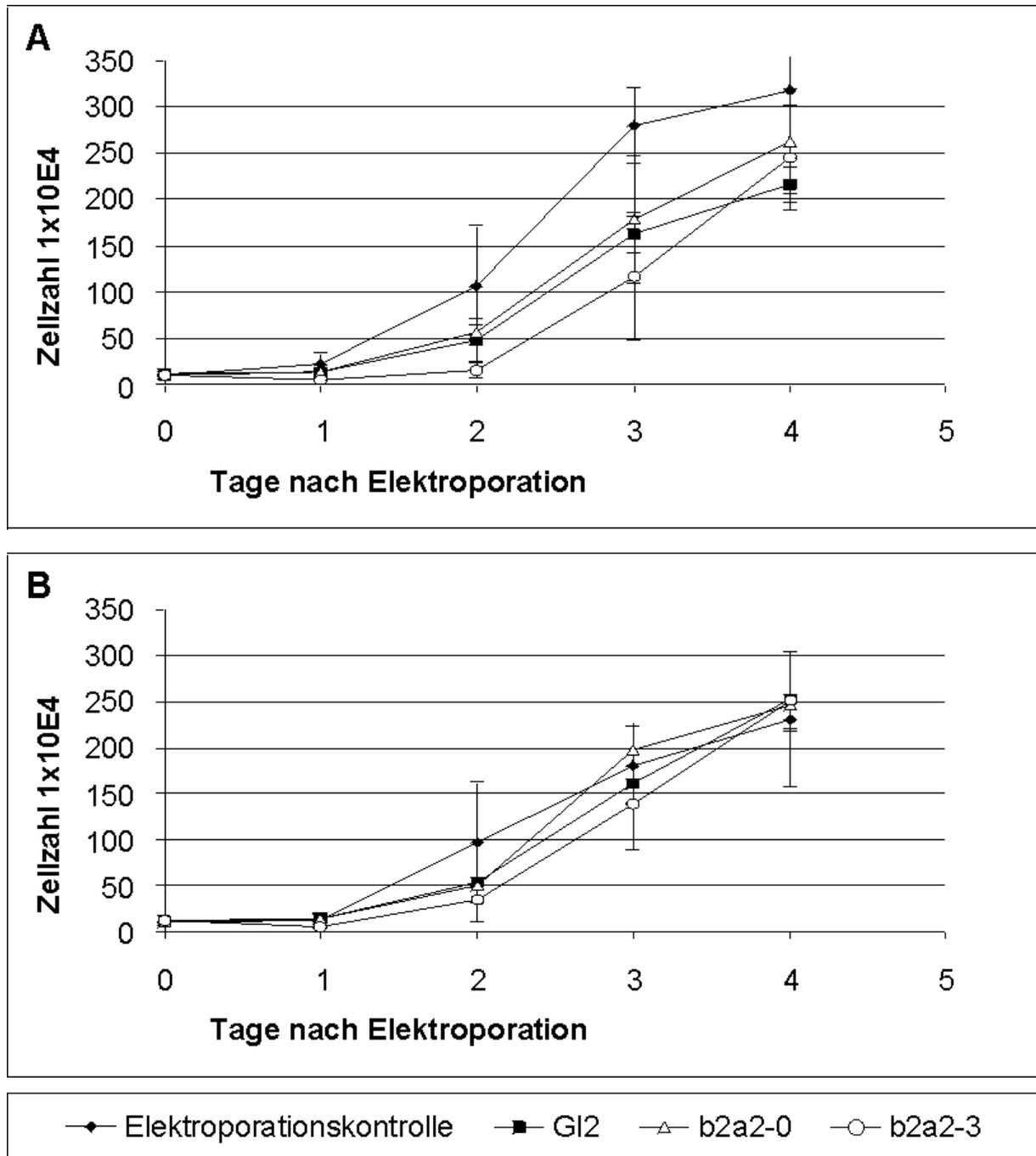


Abb. 19: Effekte der siRNAs auf die BCR-Abl-vermittelte Zellproliferation. Die Zellen wurden mit GL2-, b2a2-0- und b2a2-3-siRNA-Duplizies elektroporiert, in Medium mit (B) und ohne (A) IL-3 inkubiert und fünf Tage mit Trypanblaufärbung gezählt.

Um zu zeigen, dass der Effekt der Zellproliferationsverzögerung BCR-Abl-abhängig ist, bekam ein Teil der Zellen nach der Elektroporation IL-3-haltiges Medium. Demzufolge

sollten auch die Zellen mit BCR-Abl-Reduktion überleben. Die Abbildung 19 zeigt, dass die Wachstumskurven der verschieden elektroporierten Zellen sehr dicht beieinander liegen. Auch die Kontrolle ohne siRNA ist nicht wesentlich verändert im Vergleich zu den Zellen mit siRNA. Allerdings lag bei den Zellen mit der b2a2-3-siRNA am zweiten Tag eine Verzögerung des Zellwachstums auf 65 % vor.

3.3.3.3 Effekte der siRNAs in humanen b2a2-positiven Zellen

Mit weiteren Zelllinien wurde untersucht, ob durch die Elektroporation von chemisch synthetisierten siRNAs auch in humanen b2a2-positiven Zellen eine Proliferationsverzögerung erreichen. Zur Verfügung standen die leukämische Zelllinien BV173, JK-1 und Meg01. Meg01 konnte für Elektroporationsversuche nicht verwendet werden, da diese Zellkultur in Suspension und adhärent wächst. Bei dieser Zelllinie sind tägliche Zellzahlbestimmungen nur mit parallelen Ansätzen möglich. Zudem müssten die Zellen vor jeder Messung erst abgelöst werden, wodurch die Zellzahlbestimmung fehleranfällig wird. Um sicherzustellen, dass alle drei Zelllinien BCR-Abl-abhängig wachsen, wurden sie mit 1 μ M STI571 inkubiert. BV173 und Meg01 zeigten nach drei Tagen ein komplettes Zellsterben, während die JK-1-Zellen unbeeinflusst blieben.

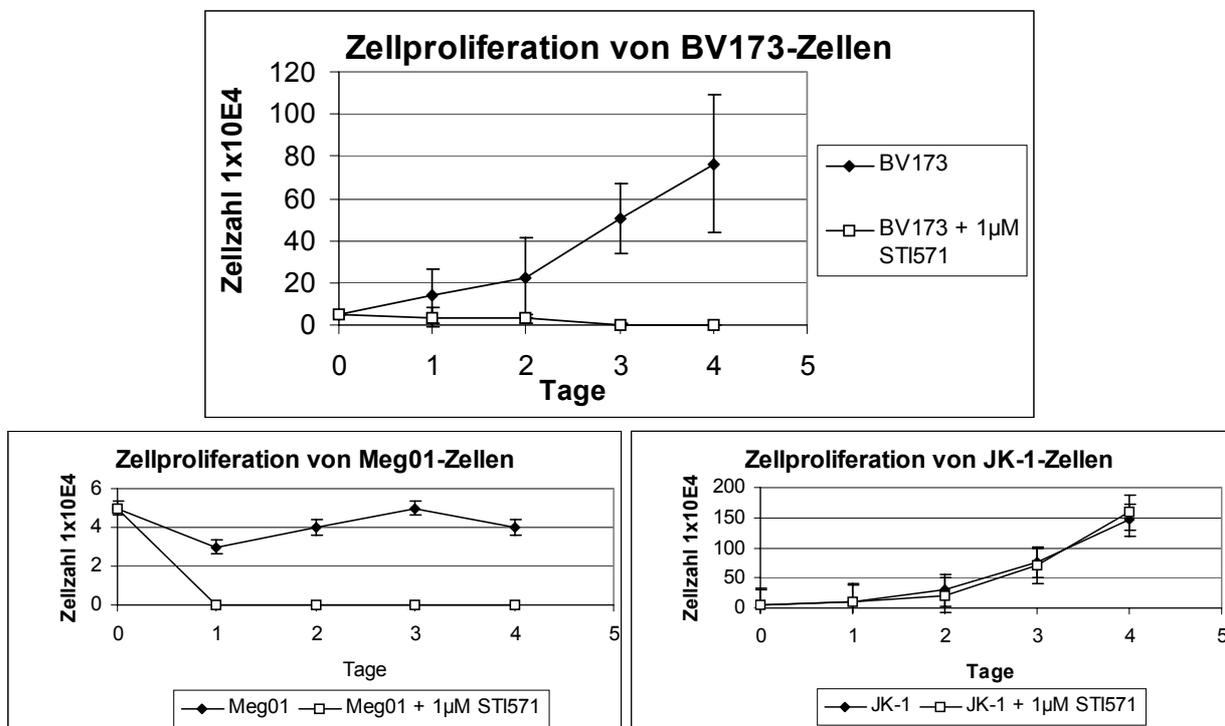


Abb. 20: Zellproliferation von BV173, Meg01 und JK-1-Zellen nach Inkubation mit STI571. Es wurden 1×10^5 Zellen ausgesät, jeweils Ansätze ohne Zusatz und mit 1 μ M STI571 pipettiert und über mehrere Tage die Zellzahl mit Trypanblaufärbung bestimmt.

Die Abbildung 20 zeigt deutlich, dass sich bei den Meg01-Zellen auch ohne Tyrosinkinaseinhibitor die meisten Zellen adhären auf der Oberfläche anlagerten. Um sich die sonst notwendige und zudem fehlerbehaftete Ablöseprozedur zu ersparen wurden die Meg01-Zellen im nächsten Experiment stattdessen unter dem Mikroskop beobachtet.

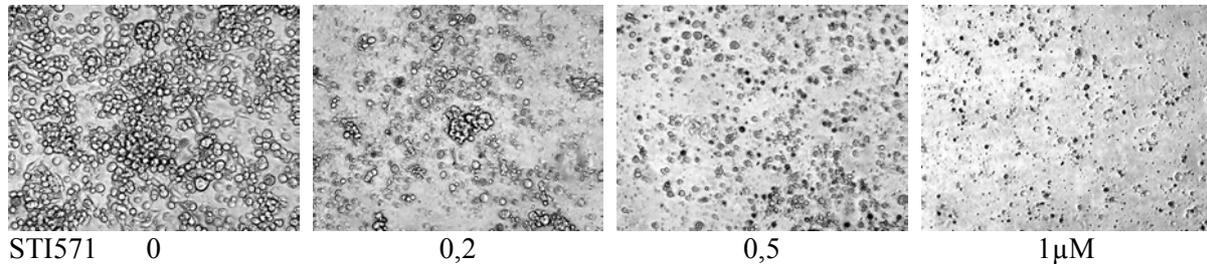


Abb. 21: Zellproliferation von Meg01-Zellen nach Inkubation mit STI571. Es wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen ausgesät, nach 48 Stunden der Überstand abgenommen, gegen Medium ausgetauscht und nach weiteren 24 Stunden Medium mit 0; 0,2; 0,5 und 1 μM STI571 zu den Zellen gegeben. Die Fotos wurden sieben Tage nach STI-Gabe aufgenommen.

Bei den BV173-Zellen wurden drei voneinander unabhängige Experimente zur Überprüfung der STI571-Sensibilität durchgeführt. In diesen Zellen sollte nun die Reduktion des b2a2-Proteins durch chemisch synthetisierte siRNAs untersucht werden. Die siRNAs wurde durch Elektroporation in die Zellen transfiziert und die Zellproliferation durch Zählen der Zellen bestimmt. Es wurden $0,5 \mu\text{g}$ siRNA-Duplex in 1×10^6 -BV173-Zellen bei 250V/ 10ms elektroporiert und je 1×10^5 -Zellen in neue Platten überführt und die Zellzahl über mehrere Tage bestimmt. Die Zellen, die mit der b2a2-3-19nt siRNA elektroporiert wurden, zeigten eine Wachstumsverzögerung von 50% gegenüber den Kontrollzellen, die mit der GL2-siRNA elektroporiert wurden. Die Proliferationskurve der Zellen ohne Elektroporation ist in der Abbildung 20 mit der STI-Sensibilität dargestellt.

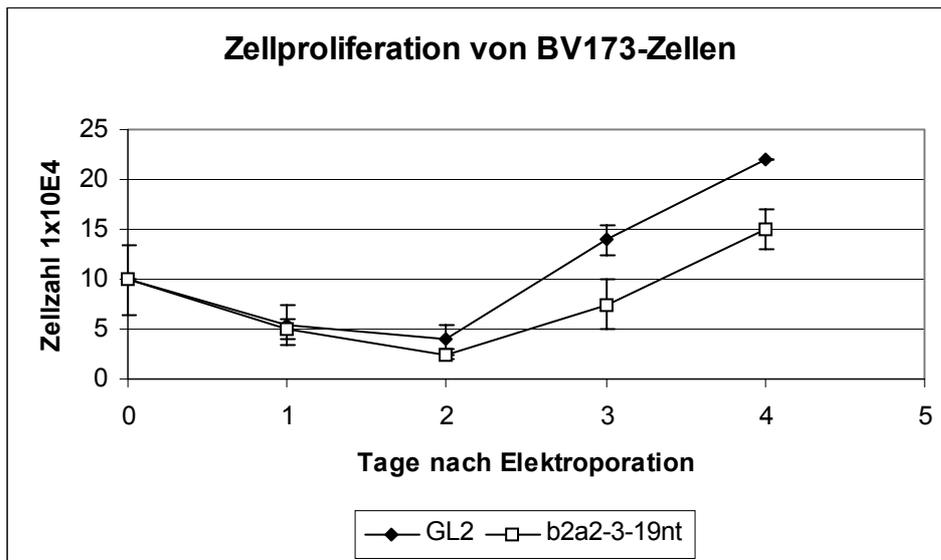


Abb. 22: Zellproliferation von BV173-Zellen nach Elektroporation mit den chemisch synthetisierten siRNAs GL2 als Kontroll-siRNA und b2a2-3-19nt. Es wurden 1×10^6 Zellen elektroporiert und ausgesät, 1×10^5 Zellen in Vertiefungen einer 24-Lochplatte ausgesät und die Zellzahl mit Trypanblaufärbung über mehrere Tage bestimmt. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

3.3.4 shRNA-Expression durch pSuper-Plasmide

Da mit chemisch synthetisierten siRNAs eine maximale Reduktion von 56% erreicht werden konnte, sollten weitere siRNA-Sequenzen ausgewählt und untersucht werden. Um eine spätere stabile siRNA-Expression vorzubereiten, wurden DNA-Oligonukleotide so konstruiert und hinter einen H1-Promotor in das pSuper-Plasmid kloniert, dass siRNA-Sequenzen in Form von *short hairpin* RNAs exprimiert wurden. Die Effizienz dieser shRNAs wurde im Reportersystem mit sb2a2-EGFP und in Ba/F3-b2a2-Zellen untersucht.

3.3.4.1 Klonierung von Oligonukleotiden in pSuper

Die Abbildung 23 zeigt die ausgewählten Sequenzbereiche für die Generierung weiterer shRNAs.

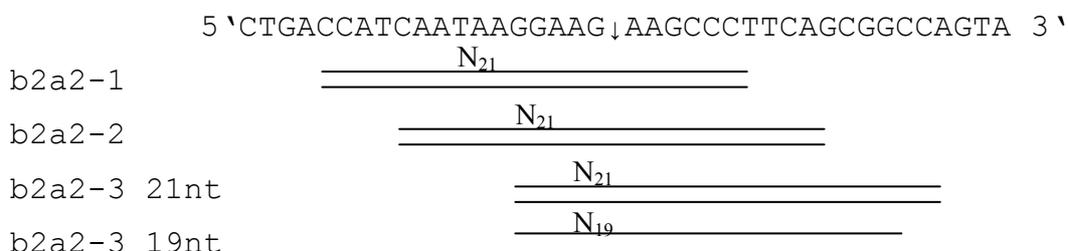


Abb. 23: Sequenzbereiche der neu ausgewählten shRNAs

Diese siRNAs sollten von einem stabilen System produziert werden. Dazu wurde das pSuper-Plasmid verwendet (s. Anhang), welches auf einem pBluescript-Vektor basiert und zusätzlich

einen H1-RNA-Promotor enthält. Für die shRNA-Klonierung wurden für jede siRNA zwei Oligonukleotide (Sense- und Antisense-Strang) synthetisiert, hybridisiert und passend in den Vektor ligiert. Die Oligonukleotide sind so konstruiert, dass nach der Transkription die shRNA entsteht. Demzufolge besitzen der Sense- und der Antisense-Strang des Plasmides jeweils die volle Sequenz des Duplex, wobei die beiden Duplex-Stränge durch eine Loop-Sequenz verbunden werden (Abb.24). Am Ende der Sequenz stehen fünf Thymidine, die als Stoppsignal den Abbruch der Aktivität der Polymerase III erzeugen.

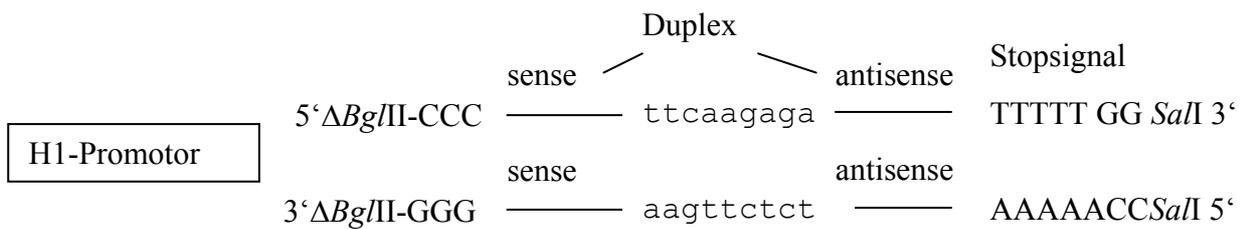


Abb. 24: Oligonukleotidstruktur für die Klonierung in pSuper

Der Vektor pSuper wurde mit den Restriktionsenzymen *Bg*III und *Sal*I geschnitten, dephosphoryliert und mit den phosphorylierten und hybridisierten Oligonukleotiden ligiert. Nach der Transformation und Selektion positiver Klone wurde die shRNA-Sequenz mit Hilfe einer automatischen Sequenzierung überprüft.

3.3.4.2 Test der Effizienz der shRNAs in einem Reportersystem

Um die Effizienz der shRNAs in pSuper zu bestimmen, wurde erneut die Kointransfektion der Plasmide mit dem sb2a2-EGFP-Reportergen durchgeführt und die Reduktion der grünleuchtenden Zellen im FACS gemessen. Als Kontrollen wurde der pSuper-Vektor allein und ein irrelevantes pSuper-shRNA-Konstrukt (GL4) verwendet.

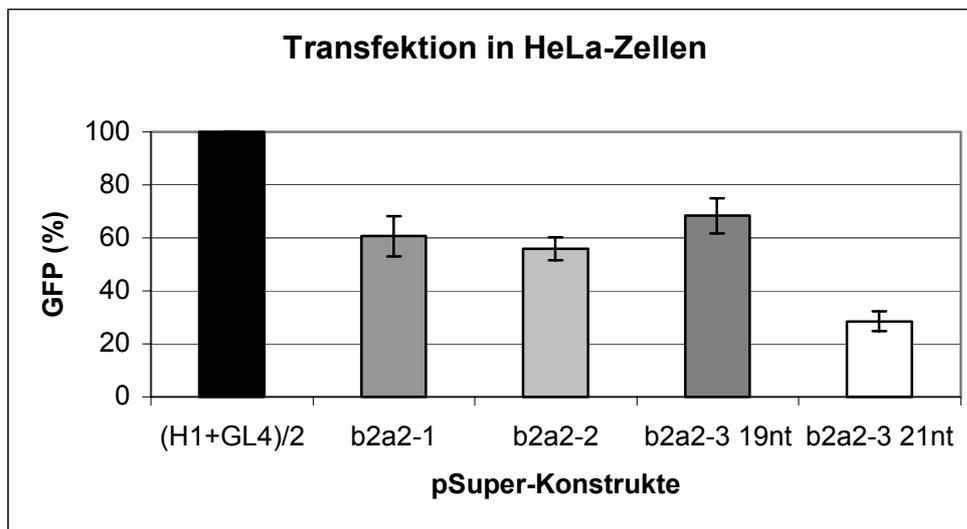


Abb. 25: Reduktion der GFP-Fluoreszenz durch shRNA-Expression von pSuper-Plasmiden nach Kotransfektion mit dem sb2a2-EGFP-Reportergen in HeLa-Zellen. Die Transfektionseffizienz wurde durch Expression des LNGF-Rezeptors bestimmt und die GFP-Fluoreszenzen der Effizienz angepaßt. Aus diesen Werten wurde zwischen dem Leer-Vektor und dem pSuper-GL4-Plasmid ein Mittelwert gebildet und als 100% GFP-Expression angenommen.

Die Abbildung 25 zeigt, dass auch hier die b2a2-3-21nt-shRNA am effektivsten die GFP-Fluoreszenz auf 28% reduzierte. Die anderen shRNAs erreichten Reduktionen zwischen 56 und 68%. Es wurden die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen zusammengefasst.

3.3.4.3 Effekte der shRNAs in einer hämatopoetischen Zelllinien

Zusätzlich sollte untersucht werden, ob die von pSuper exprimierten shRNAs die bcr-abl-Wildtyp-mRNA reduzieren. Durch Expression der b2a2-3-21nt-shRNA sollte die BCR-Abl-Expression der Ba/F3-b2a2-Zelllinie inhibiert und damit das Zellwachstum unterdrückt werden.

Jeweils 1×10^6 Ba/F3-b2a2-Zellen wurden mit dem pSuper-b2a2-3-21nt-shRNA-Plasmid, dem Kontrollplasmid pSuper-GL4 und ohne Plasmid elektroporiert, 5×10^4 Zellen pro Elektroporationsansatz in 24-Lochplatten überführt und sowohl mit als auch ohne IL-3 kultiviert. Fünf Tage wurde die Zellzahl nach Trypanblaufärbung bestimmt (Abb.26).

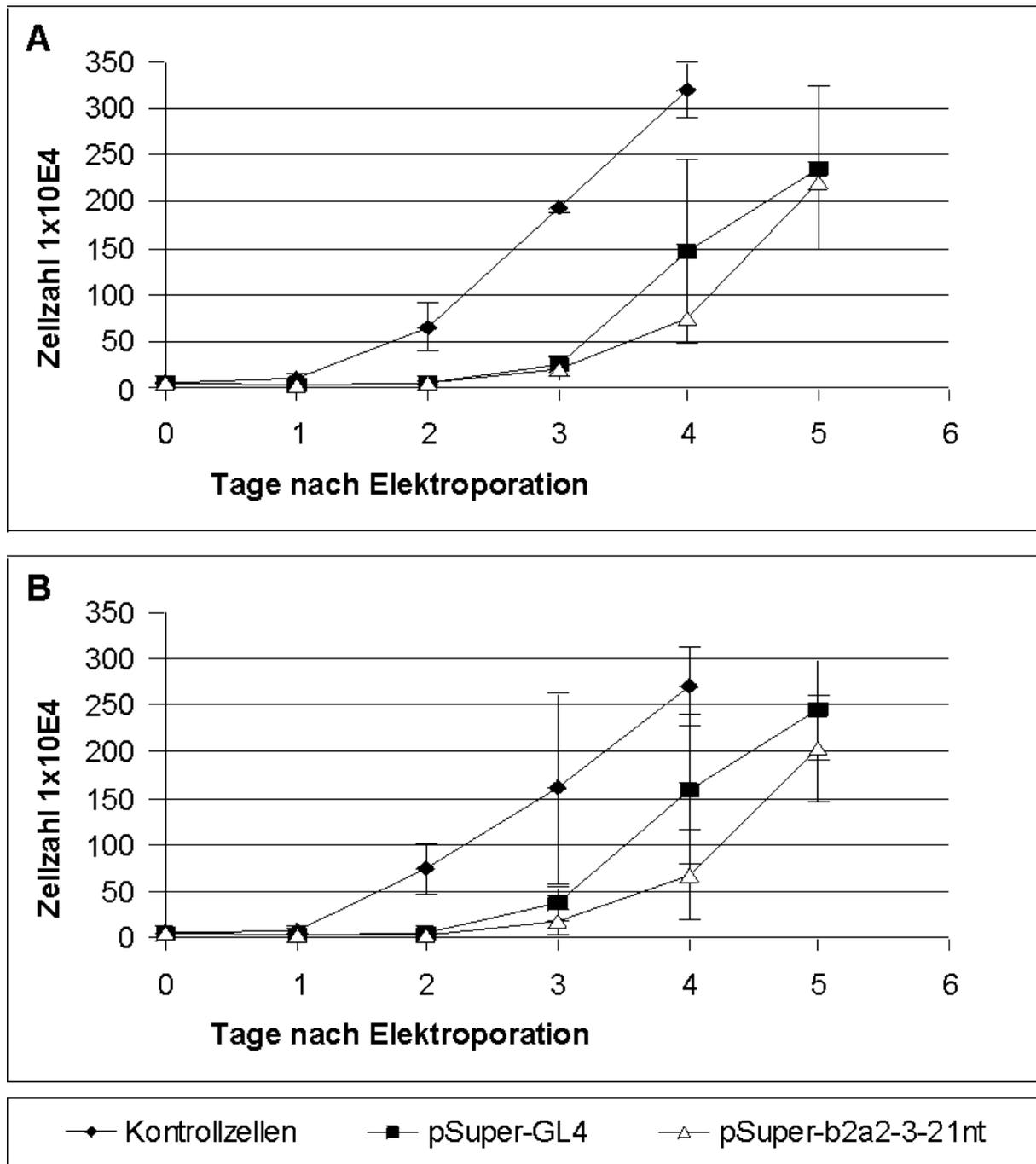


Abb. 26: Effekte der von pSuper exprimierten shRNAs auf die BCR-Abl-vermittelte Zellproliferation. Die Ba/F3-b2a2-Zellen wurden ohne Plasmid, mit pSuper-GL4 und mit pSuper-b2a2-3-21nt elektroporiert, in Medium (A) mit und (B) ohne IL-3 inkubiert und an fünf aufeinanderfolgenden Tagen mittels Trypanblaufärbung gezählt. In der Abbildung sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

Die Kontrollzellen mit Elektroporation ohne Plasmid zeigen im Vergleich zu den Zellen, die mit Plasmid elektroporiert wurden, ein deutlich schnelleres Wachstum.

Bei Elektroporation von kurzen siRNAs (3.3.3.2) war kein Unterschied im Zellwachstum mit und ohne siRNA-Transfektion zu erkennen. Im Vergleich zu den Zellen, die mit dem pSuper-GL4-Plasmid elektroporiert wurden, zeigten die Ba/F3-b2a2-Zellen mit b2a2-3-21nt-shRNA-

Expression eine deutliche Wachstumsverzögerung (50-60%) am Tag 3 und 4 in den Ansätzen ohne IL-3. In parallel mit IL-3 durchgeführten Ansätzen zeigte sich ebenfalls eine Wachstumsverzögerung.

3.3.5 shRNA-Expression durch das retrovirale Plasmid pBabepuro

Bisher konnte mit den verschiedenen siRNAs nur eine transiente Reduktion der bcr-abl-mRNA gezeigt werden. Um eine stabile shRNA-Expression zu erreichen, wurden die Zellen mit einem shRNA-exprimierenden Retrovirus transduziert.

3.3.5.1 Klonierung der shRNA-Expressionskassette in das retrovirale Plasmid

Für die Klonierung des transgenen pBabepuro-Plasmids wurde der Vektor mit dem *NheI*-Restriktionsenzym gespalten, um doppelte Kopien der shRNA-Expressionskassetten zu bekommen. Die überhängenden Nukleotide wurden mit dem Klenow-Enzym aufgefüllt und dephosphoryliert. Die H1-Promotor-shRNA-Kassette des jeweiligen pSuper-Plasmids wurde mit den *blunt-end* spaltenden Enzymen *SmaI* und *HincII* herausgeschnitten und in den linearisierten Vektor ligiert. Nach Transformation und Anreicherung des Plasmids konnten die positiven Klone mit einem *EcoRI*-Verdau identifiziert werden. Da die shRNA-Kassette zu Beginn eine Schnittstelle aufweist und im Vektor primär eine *EcoRI*-Schnittstelle vorhanden ist, entstehen bei positiven Klonen mit der richtigen Orientierung zwei Fragmente mit 1100 und 4000 Bp. Mit dieser Methode wurden die siRNAs anti-GL4 und b2a2-3-21nt, sowie der H1-Promotor allein in das pBabepuro-Plasmid kloniert.

Die Vektorkarten für das pBabepuro-Plasmid und das pSuper-Plasmid befinden sich im Anhang.

3.3.5.2 Effizienz der exprimierten shRNAs in einem Reportersystem

Die Effizienz der shRNA nach Expression durch das retrovirale Plasmid wurde im Reportersystem durch Kotransfektion in HeLa-Zellen mit sb2a2-EGFP kontrolliert. Die b2a2-3-21nt-shRNA reduzierte den Anteil grünfluoreszierender Zellen auf 35%, vergleichbar mit der Reduktion durch das entsprechende pSuper-Plasmid (28%).

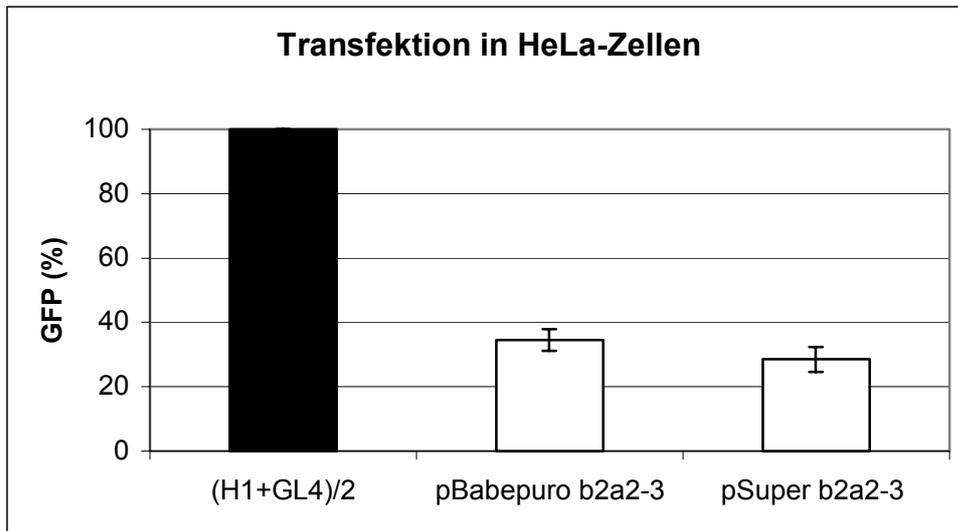


Abb. 27: Reduktion der GFP-Fluoreszenz durch shRNA-Expression des pBabepuro-Plasmids nach Kotransfektion mit dem sb2a2-EGFP-Reportergen in HeLa-Zellen. Die Transfektionseffizienz wurde durch Expression des LNGF-Rezeptors bestimmt und die GFP-Fluoreszenzen entsprechend verändert. Aus diesen Werten wurde zwischen dem pBabepuro-H1 und dem pBabepuro-GL4-Plasmid ein Mittelwert gebildet und als 100% an GFP-Expression angenommen.

3.3.5.3 Nachweis der siRNA im Northern Blot

Um zu zeigen, dass die b2a2-3-21nt-shRNA von den Plasmiden pBabepuro und pSuper exprimiert wurde, wurde ein Northern Blot durchgeführt. Die shRNA-exprimierenden Plasmide wurden mit Lipofektion in HeLa-Zellen transfiziert und nach 48 Stunden die RNA mit der Trizol-Methode isoliert. Nach Auftrennung der RNA (je 10µg) auf einem PAA-Gel, Übertragung auf eine Nylon-Membran und Hybridisierung mit den spezifischen Sonden konnten die Banden für die b2a2-3-21nt-siRNA in *hairpin*-Form (51nt) und den prozessierten Antisense-Strang (21nt) detektiert werden (Abb.28). Als Ladungskontrolle wurde die Membran zusätzlich mit einer U6-Promotor-Sonde hybridisiert und die entsprechenden Banden detektiert (106nt). Als Positiv-Kontrolle wurde der Antisense-Strang der chemisch synthetisierten siRNA b2a2-3 (10pmol) aufgetragen und als Einzelmolekül (19nt) sowie in Duplexform (38nt) detektiert. Die radioaktiven Arbeiten wurden von Frau K. Battmer durchgeführt.

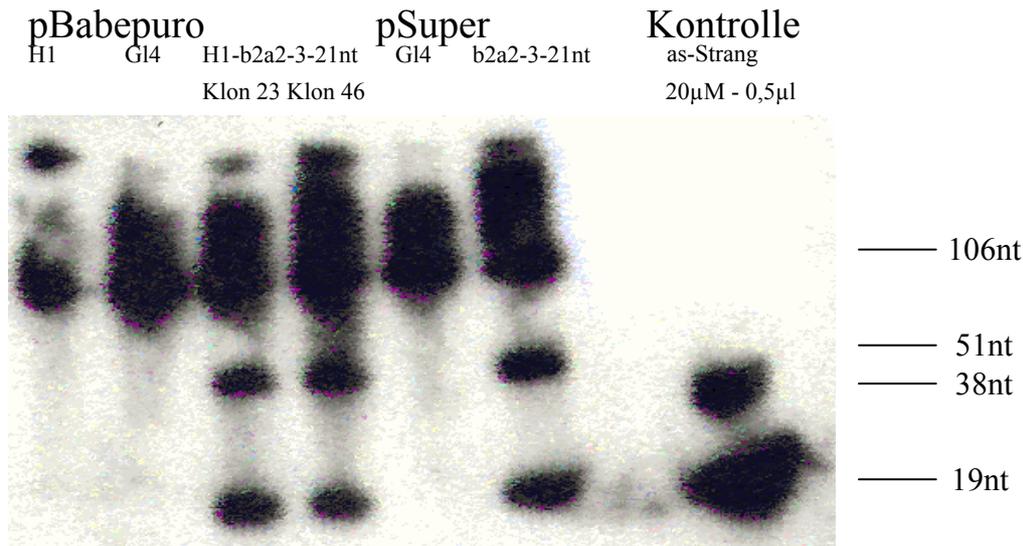


Abb. 28: Northern Blot der exprimierten shRNAs nach Transfektion der Plasmide pBabepuro und pSuper in HeLa-Zellen. Nach Lipofektion der Plasmide in HeLa-Zellen wurde die RNA nach 48h isoliert und mit spezifischen Sonden auf einer Membran hybridisiert. Als Positivkontrollen dienen der U6-Promotor (106nt) und der Antisense-Strang der chemisch synthetisierten b2a2-3-19nt siRNA.

3.3.5.4 Virustransduktion in Ba/F3-b2a2-Zellen

Virusproduktion und Transduktion in Ba/F3-b2a2-Zellen

Der b2a2-3-21nt-shRNA-exprimierende Retrovirus wurde nach Transfektion der Plasmide ecoenv-IRES-puro, M57 gag-pol und pBabepuro von der Verpackungszelllinie Φ Nx-GP produziert. Nach Konzentrierung der Viruspartikel durch Ultrazentrifugation wurden 1×10^5 Ba/F3-b2a2-Zellen in zwei verschiedenen Ansätzen mit A: $5 \mu\text{l}$ sowie B: $50 \mu\text{l}$ Virussuspension transduziert. Retroviren mit dem H1-Promotor allein (pBabepuro-H1) und mit einer H1-anti-GL4-shRNA-Kassette (pBabepuro-GL4) im pBabepuro-Plasmid dienten als Kontrollviren. Am Tag nach der Transduktion wurden die Ansätze mit $3 \mu\text{g/ml}$ Puromycin versetzt und somit die infizierten Zellen selektioniert. Um ein Zellsterben durch den inhibitorischen Effekt der b2a2-3-21nt-siRNA auf das BCR-Abl-Protein zu verhindern, wurden die Zellen mit IL-3 inkubiert.

Sechs Tage nach der Transduktion bildeten die im Ansatz B infizierten Zellen aufgrund ihrer Puromycinresistenz eine einheitliche Zellkulturpopulation, die Zellen des Ansatzes A nach 12 Tagen. Die Ba/F3-b2a2-Kontrollzellen ohne Virustransduktion waren unter der Puromycingabe gestorben. Interessanterweise wuchsen die H1- und GL4-Kontrollzellen unter Puromycin schneller an, als die b2a2-3-21nt-shRNA-exprimierenden Zellen.

Die Ba/F3-b2a2-Zellen wurden nochmals am Tag 20 (2 TD) und 23 (3 TD) nach der ersten Transduktion mit $50 \mu\text{l}$ des b2a2-3-21nt-shRNA-exprimierenden Virus inkubiert.

Zellproliferation der transduzierten Ba/F3-b2a2-Zelllinie

Um einen inhibitorischen Effekt der b2a2-3-21nt-shRNA auf die BCR-Abl-positiven Zellen beobachten zu können, wurde den puromycinresistenten Zellen 10 bzw. 14 Tage nach Transduktion 1 der Wachstumsfaktor IL-3 entzogen und die Zellproliferation über mehrere Tage beobachtet (Abb. 29). Die Zellen mit dem b2a2-3-21nt-shRNA-Virus zeigten den gleichen Wachstumsverlauf, wie die Kontrollzellen. Um sicherzustellen, dass die Zellen noch Wachstumsfaktor-abhängig wuchsen, wurde STI571 (1 μ M) in einem weiteren Ansatz zu den Zellen mit dem b2a2-3-21nt-shRNA-Virus gegeben. Diese Zellen zeigten bereits am Tag 1 eine verringerte Zellzahl und waren am Tag 3 nicht mehr nachweisbar.

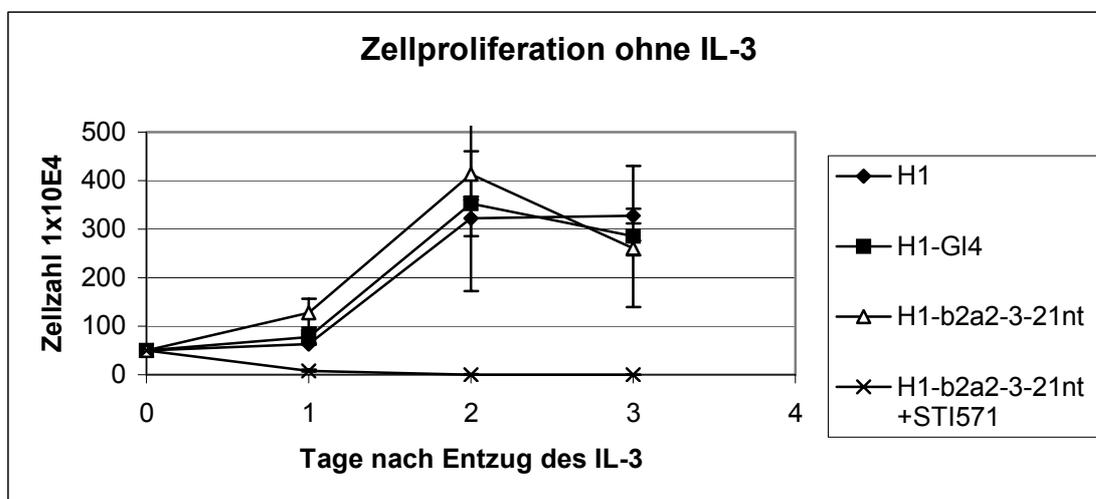


Abb. 29: Zellproliferation der Ba/F3-b2a2-Zellen nach Transduktion mit drei verschiedenen Retroviren (pBabepuro-H1, pBabepuro-H1-GL4, pBabepuro-H1-b2a2-3-21nt). Am 10. Tag (bei 50 μ l Virus) bzw. 14. Tag (5 μ l Virus) nach Transduktion wurde den puromycinresistenten Zellen das IL-3 entzogen, 5×10^5 Zellen pro Zelllinie vorgelegt und über mehrere Tage mit Trypanblaufärbung die Zellzahl bestimmt.

Färbung mit Propidiumiodid (PI)

In einem weiteren Experiment wurde direkt das Zellsterben nach Entzug von IL-3 beobachtet. Den Ba/F3-b2a2-Zellen wurde nach Transduktion mit den verschiedenen Retroviren (pBabepuro-H1, GL4, b2a2-3-21nt) und Selektion mit Puromycin zwischen vier und elf Tagen nach Transduktion der Wachstumsfaktor IL-3 entzogen. Nach weiteren drei Tagen wurde der Zellkultur ein Aliquot entnommen und mit dem PI-Reagenz angefärbt. Die Zellen wurden mit dem FACS detektiert. Das Ergebnis dieser Untersuchungen war vergleichbar mit der Zellproliferation. Der Anteil toter Zellen war in allen mit verschiedenen pBabepuro-Konstrukten transduzierten Ba/F3-b2a2-Zellen gleich. Auch nach mehrfachen Virustransduktionen waren gleiche Populationen abgestorbener Zellen bei den Kontroll- und den b2a2-3-21nt-shRNA transduzierten Zellen sichtbar (Abb. 30). Zusätzliche Messungen zeigten auch

hier eine Wachstumsfaktor-Abhängigkeit der Zellen, da in allen Populationen 90% der Zellen nach Zusatz von 1 μ M des Tyrosinkinaseinhibitors STI571 abstarben.

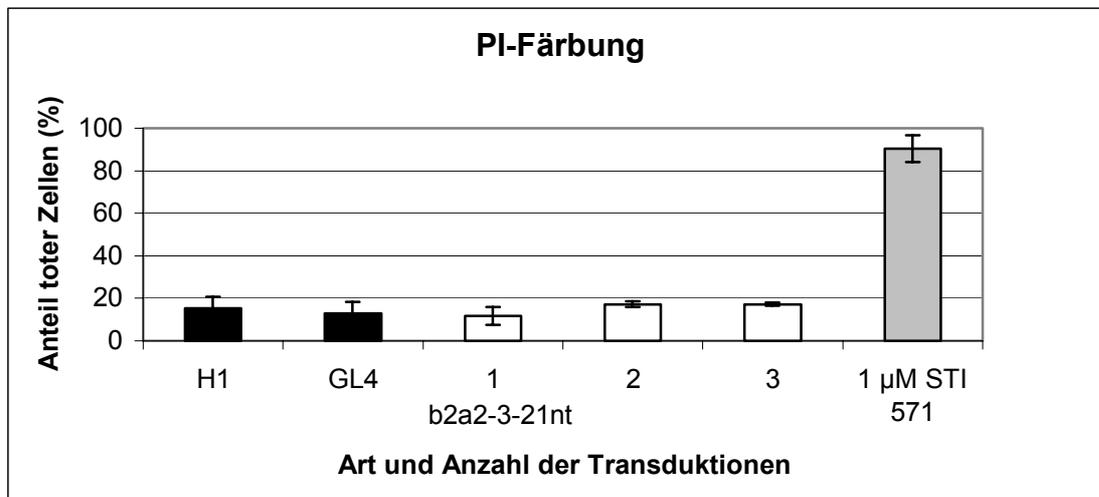


Abb. 30: Anteil toter Zellen drei Tage nach IL-3-Entzug. Den mit den Virusarten pBabepuro-H1, -H1-GL4 und -H1-b2a2-3-21nt transduzierten Ba/F3-b2a2-Zellen wurde zwischen vier und 11 Tagen nach der letzten Transduktion der Wachstumsfaktor IL-3 entzogen und nach weiteren drei Tagen der Anteil toter Zellen mit dem FACS nach PI-Färbung gemessen. In parallelen Versuchen wurde zu einem Aliquot jeder Zellpopulation 1 μ M STI571 gegeben und ebenfalls nach drei Tagen der Anteil toter Zellen bestimmt. Der Datenpunkt im Diagramm entspricht dem Mittelwert aller Messungen.

Reduktion der b2a2-mRNA-Expression

In den vorangegangenen Experimenten war in den transduzierten Ba/F3-b2a2-Zellen nach IL-3-Entzug kein Zellsterben zu beobachten. In einem weiteren Versuch wurde aus den Zellen mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) zytosolische RNA aufgereinigt und nach DNase-Verdau und reverser Transkription eine quantitative *Real Time*-PCR für b2a2 und GAPDH durchgeführt. Für die Standardisierung der Werte beider Gene wurde eine Eichkurve aus cDNA eines definierten Ba/F3-b2a2-/TonB-Zell-Mix aufgenommen. Um die b2a2-mRNA-Werte der verschiedenen Proben vergleichen zu können, wurde die Anzahl der b2a2-mRNA-Kopien auf die GAPDH-Werte bezogen berechnet. Die Abbildung 31 zeigt die b2a2-GAPDH-Quotienten der Proben der Ba/F3-b2a2-Zellen, die mit den Viren der Transgene pBabepuro-H1, -GL4 und -b2a2-3-21nt transduziert wurden. Die Transduktion mit dem b2a2-3-21nt-shRNA-exprimierenden Virus wurde zweimal wiederholt (2 TD, 3 TD). Zellen zur RNA-Isolierung wurden vier Tage nach der jeweils letzten Transduktion entnommen. Nach drei Transduktionen konnte eine Reduktion der b2a2-mRNA auf 67 % im Vergleich zu den Kontrollen gemessen werden.

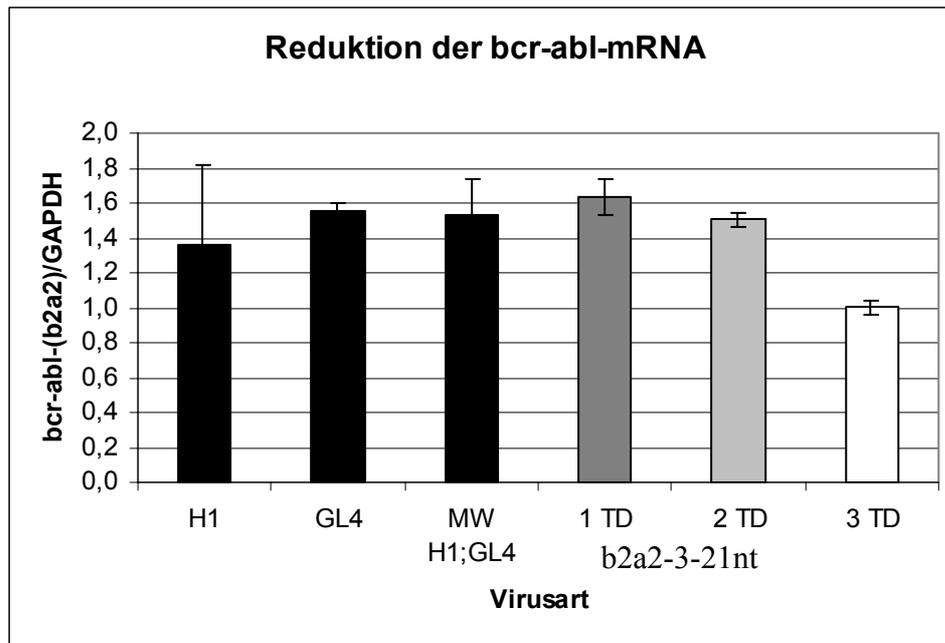


Abb. 31: Reduktion der b2a2-mRNA in Ba/F3-b2a2-Zellen nach Virustransduktion. Nach Transduktion mit den Retroviren pBabepuro-H1, -GL4 und -b2a2-3-21nt wurde aus den Zellen RNA-isoliert und über eine *Real Time*-RT-PCR quantifiziert. Der Quotient aus dem b2a2- und GAPDH-Wert jeder Probe gibt den normierten b2a2-Gehalt der Zelle an.

3.3.6 shRNA-Expression durch das lentivirale Plasmid dcH1-shRNA-SR

3.3.6.1 Klonierung des H1-Promotor-shRNA-Konstruktes aus pSuper in das lentivirale Plasmid

Für die lentivirale Transduktion der Zellen wurde das Plasmid dcH1-shRNA-SR verwendet. Dieses Plasmid wurde von Frau M. Scherr konstruiert, in dem nach Elimination der EGFP-WPRE-Kassette das RFP aus dem pCMV-DsRed-Express-Plasmid [Clontech] in den pHR⁺SINcPPT-SEW-Vektor eingesetzt wurde [62].

Die shRNA-Expressionskassette wird über die Restriktionsschnittstelle *Sna*BI in die LTR-Region des transgenen Plasmids kloniert. Daraus erzeugt die Reverse Transkriptase beim Umschreiben in die cDNA zwei Kopien. Der Vektor wurde dephosphoryliert, die H1-shRNA-Kassette wurde mit *Sma*I und *Hinc*II aus dem pSuper-Vektor herausgeschnitten, die überhängenden Enden mit dem Klenow-Enzym aufgefüllt und so *blunt end* in den lentiviralen Vektor ligiert. Die positiven Klone konnten nach einem *Eco*RI-Restriktionsverdau durch zwei Fragmente mit 1330 Bp und 8460Bp identifiziert werden. Auf diese Weise wurden die b2a2-3-shRNAs mit 19 und 21 Nukleotiden Länge, sowie die Kontroll-shRNA GL4 in den lentiviralen Vektor kloniert.

3.3.6.2 Effizienz der exprimierten shRNAs in einem Reportersystem

Die shRNA-Expression durch das lentivirale Plasmid wurde wieder mit dem bereits beschriebenen Reportersystem durch Kotransfektion mit sb2a2-EGFP überprüft. Die Abbildung 32 zeigt die Reduktion des GFP durch die lentiviralen Plasmide im Vergleich zu den pSuper-Plasmiden. Die b2a2-3-21nt-shRNA zeigte auch im lentiviralen Plasmid eine starke Reduktion des GFP auf 20-30%. Die b2a2-3-19nt-shRNA war, wie schon im pSuper-Plasmid, weniger effizient.

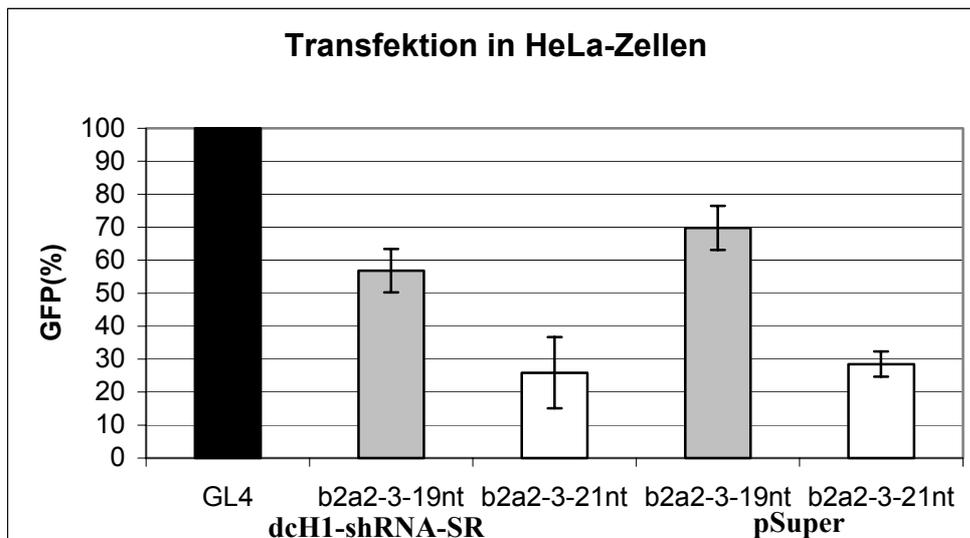


Abb. 32: Reduktion der GFP-Fluoreszenz durch Expression von shRNAs durch das lentivirale Plasmid dcH1-shRNA-SR im Vergleich zu den entsprechenden pSuper-Plasmiden nach Kotransfektion mit dem sb2a2-EGFP-Reportergen in HeLa-Zellen. Die Transfektionseffizienz wurde durch Expression des LNGF-Rezeptors bestimmt und die GFP-Fluoreszenzen der Effizienz angeglichen. Die GFP-Expression der Kontroll-GL4-shRNA entsprach 100%.

3.3.6.3 Effekte der Plasmid-exprimierten shRNAs in Ba/F3-b2a2-Zellen

Wie effektiv die shRNA-Expression durch die lentiviralen Plasmide dcH1-b2a2-3-19nt-SR und dcH1-b2a2-3-21nt-SR im b2a2-positiven Zellsystem ist, sollte durch Elektroporation der Plasmide in die Ba/F3-b2a2-Zelllinie gezeigt werden. Die Zellen wurden mit den b2a2-3-shRNA-Plasmiden, dem Kontrollplasmid dcH1-GL4-SR und ohne Plasmid unter Standardbedingungen elektroporiert, zu je 5×10^4 Zellen in neue Platten umgesetzt und in den folgenden Tagen mittels Trypanblaufärbung gezählt. Dabei wurden pro Elektroporationsansatz Wachstumsbedingungen mit und ohne IL-3 gewählt. Die Abbildung 33 zeigt keinen Unterschied in der Zellproliferation zwischen den dcH1-shRNA-Plasmiden mit GL4 bzw. b2a2-3-19nt (Abb. 33: A/B), aber eine deutliche Wachstumsverzögerung der Zellen mit dem b2a2-3-21nt-Plasmid (Abb. 33: C). Auch IL-3 im Medium der Zellen konnte diese Wachstumsverzögerung nicht aufheben (Abb. 33: D). Dieses Ergebnis spiegelt die

deutlich bessere Reduktionseffizienz der 21nt langen siRNA sowie einen unspezifischen, nicht mit IL-3 regenerierbaren Effekt wieder. Auch hier hat sich gezeigt, dass die Elektroporation von Plasmid allein bereits zu einer Wachstumsverzögerung der Zellen führt.

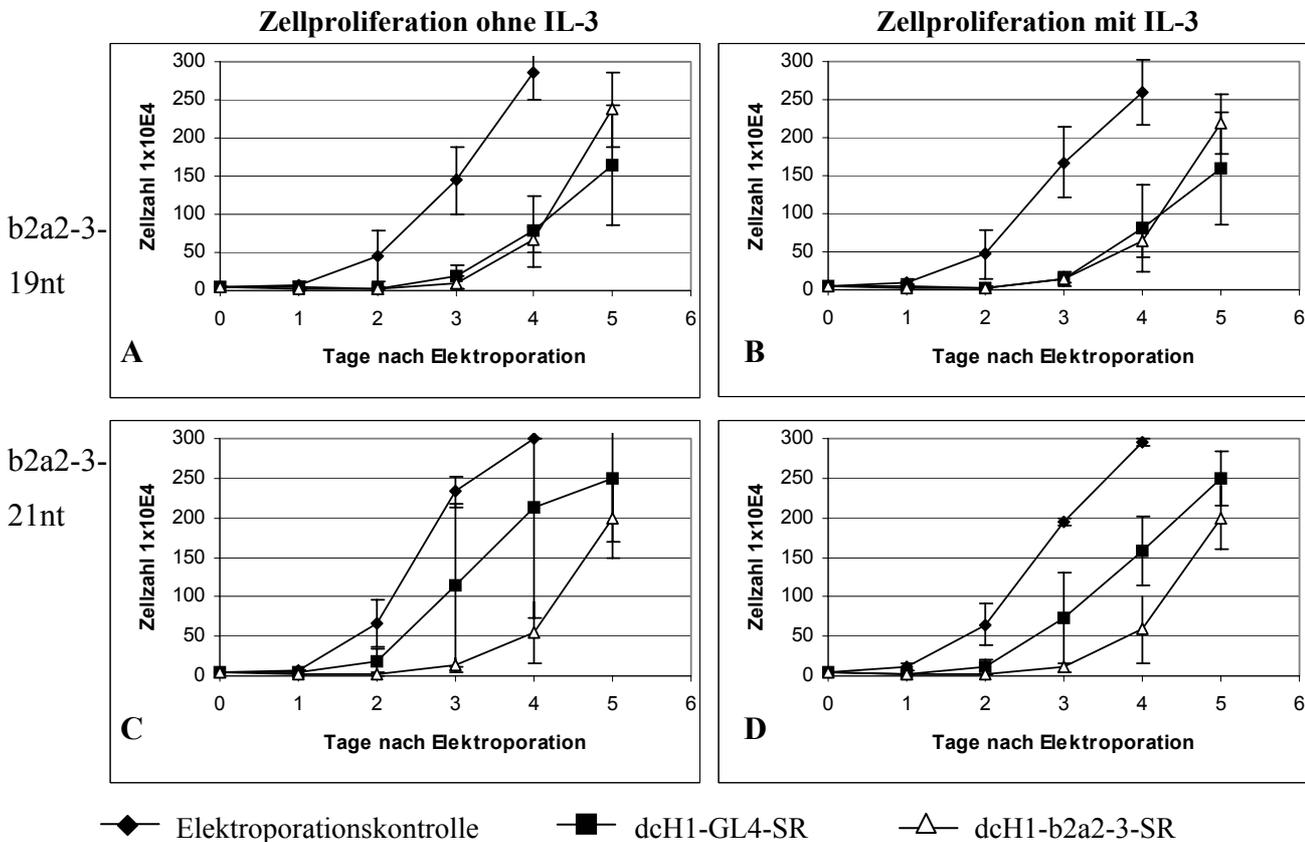


Abb. 33: Einfluss der Plasmid-exprimierten shRNAs auf die BCR-Abl-vermittelte Zellproliferation. Die Ba/F3-b2a2-Zellen wurden ohne Plasmid, mit dcH1-GL4-SR und dcH1-b2a2-3-SR (19 bzw. 21nt) elektroporiert, in Medium mit und ohne IL-3 inkubiert und über einen Zeitraum von fünf Tagen mittels Trypanblaufärbung gezählt. In der Abbildung sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

3.3.6.4 Virustransduktion in hämatopoetische Zelllinien

Die Präparation der Lentiviren erfolgte mit dem dcH1-shRNA-SR-Plasmid als Transgen, pCMV Δ R8.9.1 für die Produktion der Proteine und dem pMD.G-Plasmid zur Expression des VSV.G-Hüllproteins in 293T-Zellen. Nach Titerbestimmungen in K562-Zellen wurden Titer von $1 \cdot 10^6$ - $5 \cdot 10^7$ Viruspartikel/ml erreicht. Es wurden Transduktionen in verschiedene murine und humane b2a2-positive Zellen sowie Kontrollzelllinien durchgeführt.

Transduktion des Lentivirus in murine Zelllinien

- **Virustransduktion in Ba/F3-b2a2-Zellen**

Messung der RFP-Expression

Für diese Messungen wurde die 21nt-lange siRNA verwendet, die experimentell die höchste Effizienz gezeigt hat. Ba/F3-b2a2-Zellen wurden mit GL4- und b2a2-3-21nt-shRNA-exprimierenden Viren mit einer MOI von 15 transduziert und der Anteil an rotfluoreszenzierenden Zellen über einen Zeitraum von 30 Tagen im FACS-Gerät gemessen. Der Anteil RFP-exprimierender Zellen mit der b2a2-3-21nt-shRNA nahm im Gegensatz zu der GL4-shRNA-Kontrolle innerhalb der ersten zehn bis zwölf Tage um etwa 50% ab. Dabei war kein Unterschied zwischen den Zellen mit bzw. ohne IL-3-Inkubation nach Transduktion zu sehen (Abb.34).

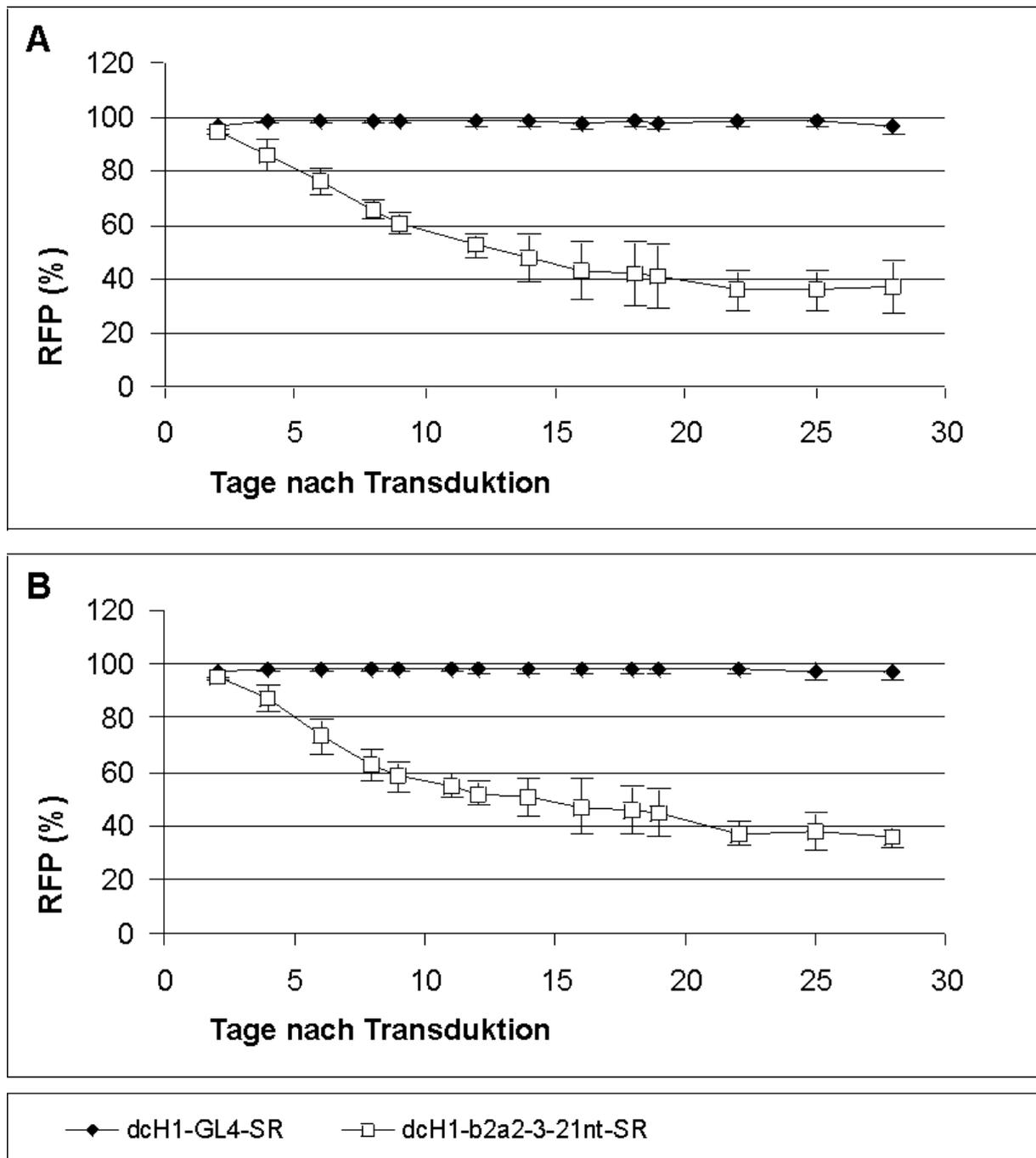


Abb. 34: Messung des Anteils rotfluoreszenzierender Ba/F3-b2a2-Zellen im FACS nach Transduktion mit dem Lentiviren dcH1-GL4-SR und dcH1-b2a2-3-21nt-SR, Wachstum der Zellen mit (A) und ohne (B) IL-3. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

Bei Betrachtung der durchschnittlichen Rotfluoreszenzintensität der transduzierten Zellen, ist ebenfalls ein starker Verlust innerhalb der ersten Woche zu beobachten (Abb. 35). Die Zellen zeigten in den verschiedenen Versuchen eine unterschiedlich starke Rotfluoreszenzintensität (durch hohe Fehlerindikatoren zu erkennen) zwei Tage nach der Transduktion im Vergleich zu den Kontrollzellen. Nach einer Woche sank die Intensität jeweils auf 10 bis 20% ab.

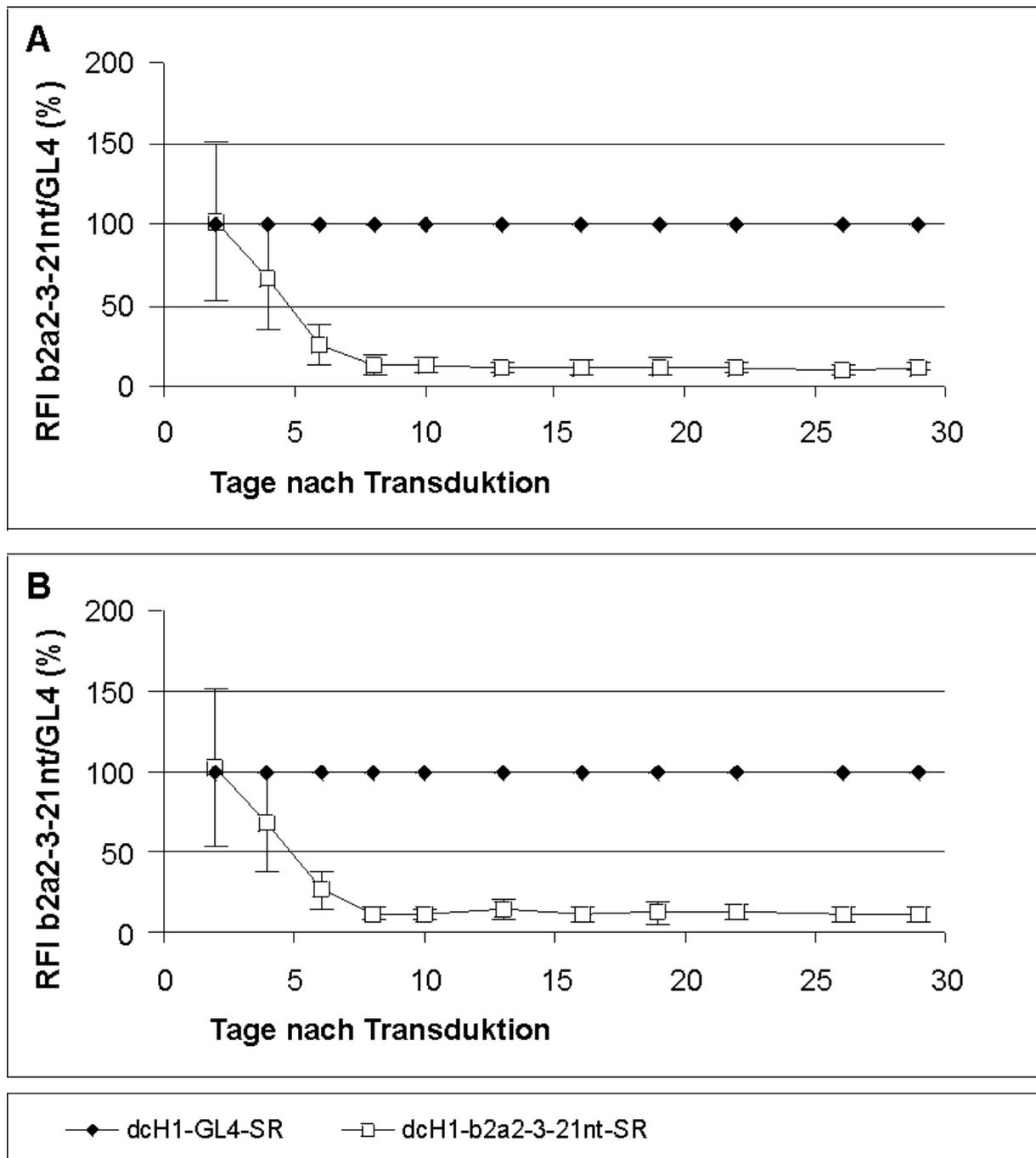


Abb. 35: Durchschnittliche Rotfluoreszenzintensität der Ba/F3-b2a2-Zellen nach Transduktion mit dem Lentiviren dcH1-GL4-SR und dcH1-b2a2-3-21nt-SR, Wachstum der Zellen mit (B) und ohne (A) IL-3. Es wurde das Verhältnis der Rotfluoreszenzintensitäten von b2a2-3-21nt-shRNA-transduzierten Zellen zu GL4-Kontrollzellen (%) aufgetragen. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

Die Abnahme der Rotfluoreszenzintensität der b2a2-3-21nt-shRNA-transduzierten Zellen war vor allem durch das Absterben der stark rotleuchtenden Zellen bedingt (Abb.36).

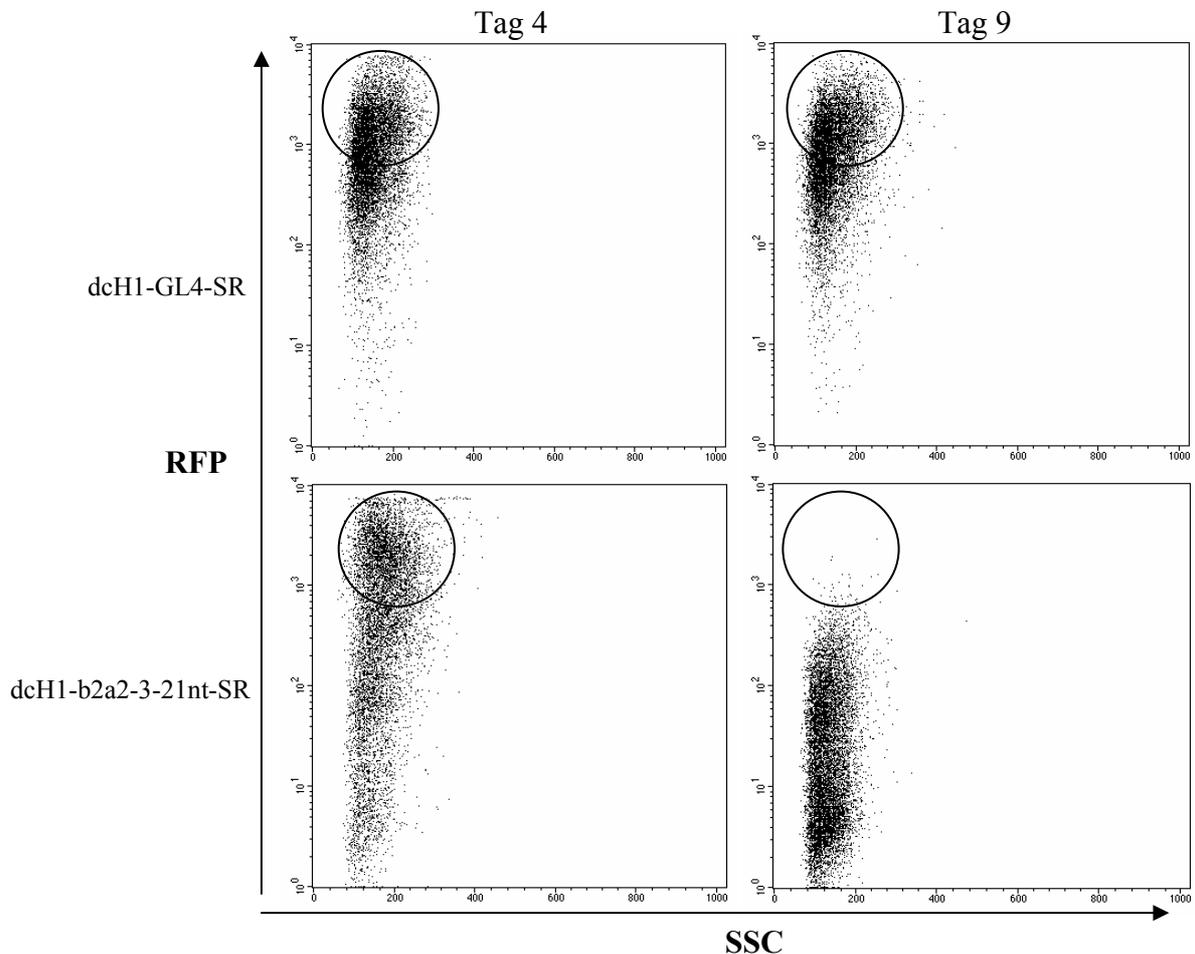


Abb. 36 : FACS-Daten von Tag 4 und Tag 9 der Virustransduktion mit den Transgenen dcH1-GL4-SR und dcH1-b2a2-3-21nt-SR, Wachstum unter IL-3.

Die Abbildung 36 zeigt die FACS-Daten von zwei Tagen eines Versuches mit IL-3.

Hier wird deutlich erkennbar, dass bereits am Tag 9 keine Fraktion mit stark rotleuchtenden Zellen, in denen die b2a2-3-21nt-shRNA exprimiert wird, mehr meßbar war.

Eine Transduktion in Ba/F3-b2a2-Zellen wurde mit dem dcH1-b2a2-3-19nt-SR-Plasmid als Transgen durchgeführt. Dabei sank der Anteil rotfluoreszierender Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen innerhalb einer Woche nur um 5%, nach 14 Tagen um 15% und nach 30 Tagen um 30% (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis spiegelt die geringere Effizienz der b2a2-3-19nt-shRNA wieder.

Zellproliferation nach Virustransduktion

Um festzustellen, wie sich die Zellproliferation nach der Virustransduktion verhält, wurden pro Viruskonstrukt 5×10^4 Zellen am Tag nach der Transduktion in neue Platten ausgesät und

jeweils an aufeinanderfolgenden Tagen mittels Trypanblaufärbung gezählt. Die Abbildung 37 zeigt, dass das Wachstum der Zellen mit der b2a2-3-21nt-shRNA im Vergleich zu den Kontrollzellen in den ersten Tagen stark verzögert ist. Dabei zeigt die Proliferation der Zellen mit IL-3 keinen nennenswerten Unterschied zu den Zellen ohne IL-3-Gabe. Die Wachstumsverzögerung verläuft zeitlich parallel zu der Abnahme der stark rotleuchtenden Zellpopulation.

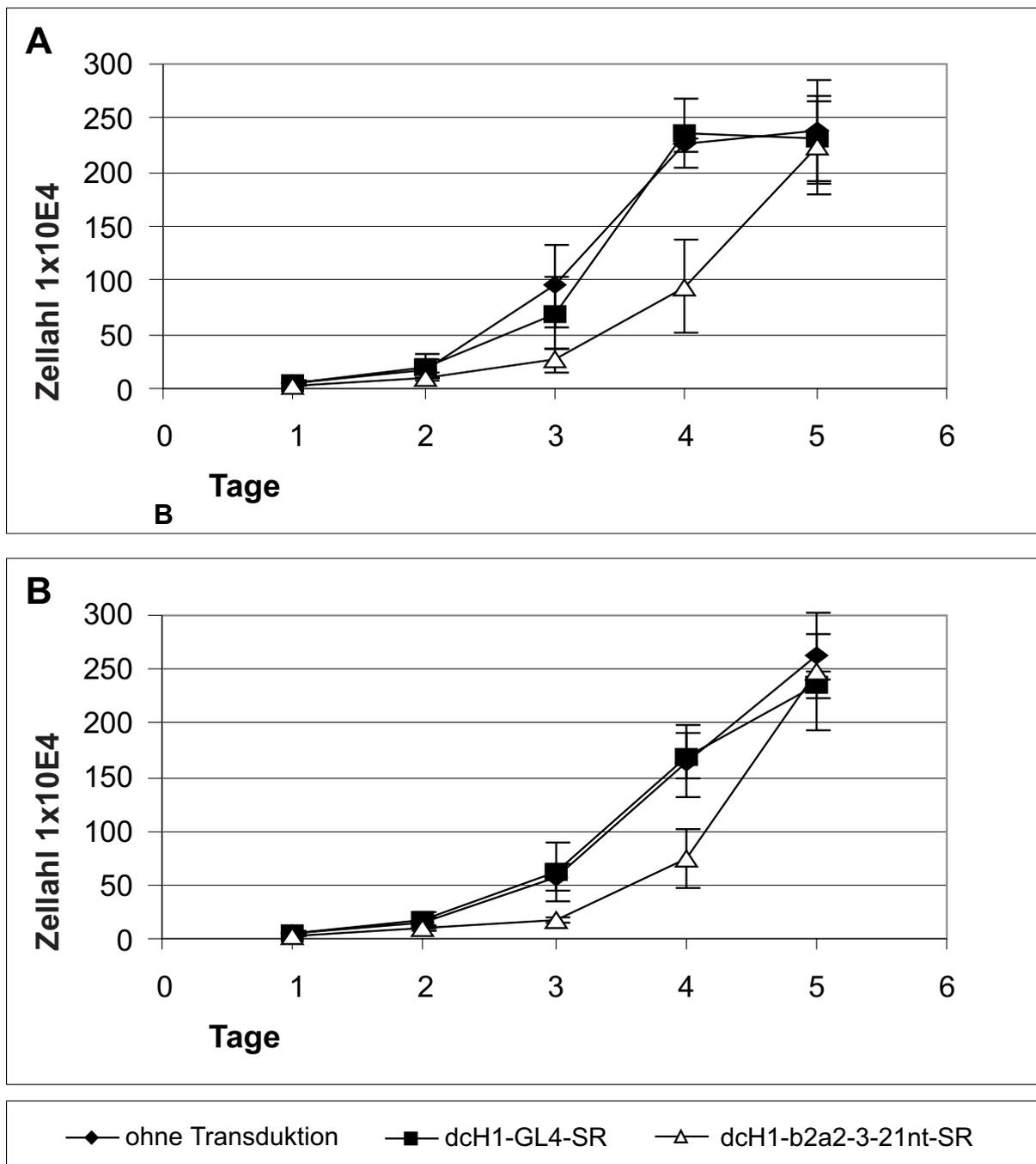


Abb. 37: Wachstum der Ba/F3-b2a2-Zellen nach Transduktion mit dem shRNA gegen b2a2 exprimierenden Lentivirus ohne (A) und mit IL-3 (B). Am Tag nach der Transduktion wurden 5×10^4 Zellen pro Zelllinie vorgelegt und die Zellzahl über mehrere Tage mittels Trypanblaufärbung bestimmt.

Nachweis der b2a2-mRNA-Reduktion

Nach verschiedenen Transduktionen von Lentiviren mit b2a2-3-21nt-shRNA-Expression in Ba/F3-b2a2-Zellen wurden am jeweils zweiten, dritten und vierten Tag nach Transduktion Zellen zur Gesamt-mRNA-Aufreinigung nach der Trizolmethode entnommen. Die RNA der Zellen mit der anti-b2a2- sowie GL4-shRNA wurde mit DNase gespalten und in cDNA umgeschrieben. Die cDNA der b2a2-mRNA wurde mit einer quantitativen PCR-Reaktion im Taqman amplifiziert und durch fluoreszenzmarkierte Sonden detektiert. Um den Gehalt der b2a2-mRNA der einzelnen Proben vergleichen zu können, wurde parallel eine PCR-Reaktion zur Amplifikation von murinem GAPDH (ein zelleigenes Gen) durchgeführt. Der Quotient aus dem Wert der b2a2-mRNA und der GAPDH-mRNA ergab den relativen b2a2-mRNA-Anteil der Zellen. Die Abbildung 38 zeigt die ermittelten Quotienten.

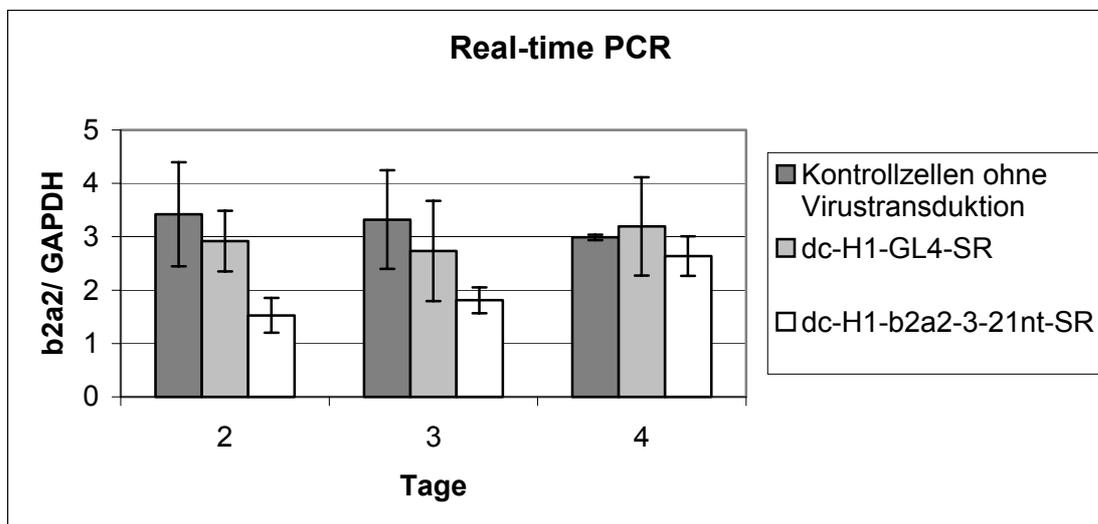


Abb. 38: Quantitative Bestimmung der b2a2-mRNA-Reduktion mit *Real Time*-PCR.

Es wurde der RNA-Gehalt pro Zelle an b2a2 und GAPDH bestimmt. Der Quotient gab den genauen Wert der b2a2-mRNA an. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

Die b2a2-mRNA der Zellen, die mit dem anti-b2a2-Lentivirus transduziert wurden, war zwei Tage später im Vergleich zu den Zellen mit dem GL4-Virus um 48% reduziert. Im Vergleich zu den Kontrollzellen ohne Virustransduktion betrug die Reduktion sogar 55%. Die Inhibition der b2a2-mRNA nahm im Verlauf der folgenden zwei Tage ab. Am Tag 4 nach Transduktion betrug die b2a2-mRNA-Reduktion nur noch 18% (im Vgl. zu GL4) bzw. 12% (im Vgl. zu Kontrollzellen ohne Virustransduktion).

- **Virustransduktion in Ba/F3-Wildtyp-Zellen**

Messung der RFP-Expression

In Kontrollexperimenten wurden Ba/F3-Zellen mit den b2a2-3-21nt-shRNA-exprimierenden sowie mit den Kontrollviren (dcH1-GL4-SR) mit einer MOI von 20 transduziert. Während der Anteil rotfluoreszierender Zellen bei den Kontrollzellen mit der GL4-shRNA über 30 Tage gleich blieb, sank er bei den Zellen mit der shRNA gegen b2a2 innerhalb von sieben Tagen von 73% auf 45%, nach zwei Wochen auf 32% ab (Abb.39).

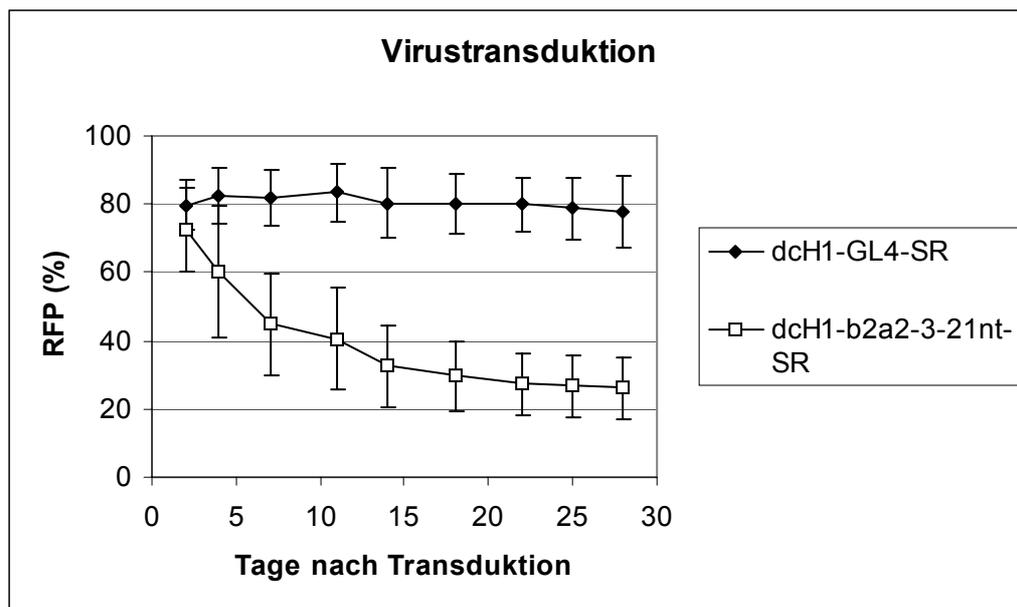


Abb. 39: Messung des Anteils rotfluoreszenzierender Ba/F3-Zellen im FACS nach Transduktion mit den Lentiviren dcH1-GL4-SR und dcH1-b2a2-3-21nt-SR. Dargestellt sind zwei von drei unabhängigen Versuchen.

Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Ba/F3-b2a2-Zellen nach Transduktion mit der gleichen Virusart. Hier sank der Anteil rotfluoreszierender Zellen sowohl mit als auch ohne IL-3-Gabe innerhalb der ersten Woche auf etwa 50 % nach zwei Wochen auf etwa 30%.

Bei Betrachtung der Rotfluoreszenzintensität zeigte sich die gleiche Tendenz wie bei den Ba/F3-b2a2-Zellen. Im Verhältnis zur Intensität der Kontrollzellen (transduziert mit dcH1-GL4-SR) sank die Fluoreszenzstärke bei den b2a2-3-21nt-shRNA-exprimierenden Zellen von 90% auf 40% innerhalb einer Woche.

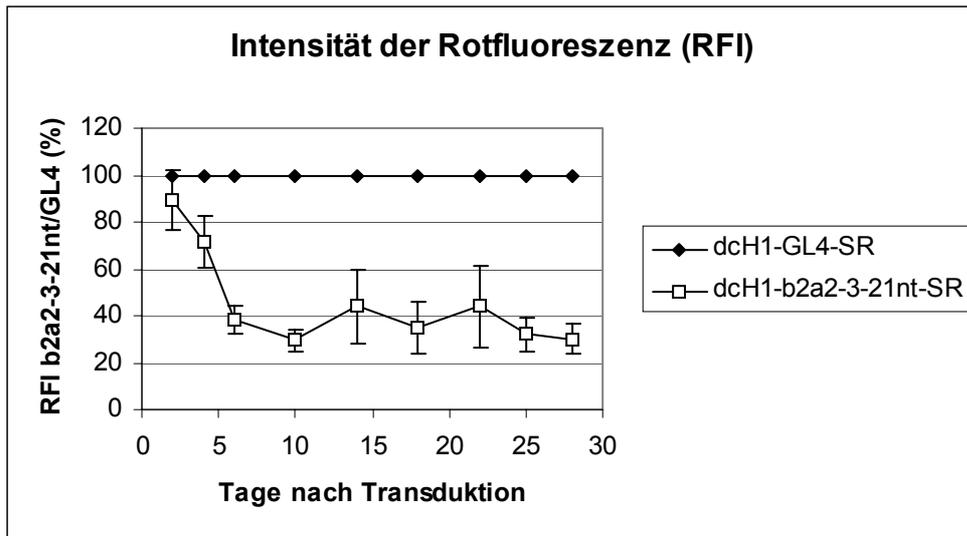


Abb. 40: Durchschnittliche Rotfluoreszenzintensität der Ba/F3-Zellen nach Transduktion mit dem Lentiviren dcH1-GL4-SR und dcH1-b2a2-3-21nt-SR. Es wurde das Verhältnis der Rotfluoreszenzintensitäten von b2a2-3-21nt-shRNA-transduzierten Zellen zu GL4-Kontrollzellen (%) aufgetragen. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

Die Abnahme der Rotfluoreszenzintensität der b2a2-3-21nt-shRNA-transduzierten Zellen war auch bei diesen Zellen durch das Absterben der stark rotleuchtenden Zellen erklärbar, was durch FACS-Messungen belegt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Zellproliferation nach Virustransduktion

Parallel zur Messung der Rotfluoreszenz der Zellen im FACS wurde die Zellproliferation beobachtet. Die Zellproliferation der Zellen mit dem anti-b2a2-Virus war im Vergleich zu den GL4-Kontrollzellen nach drei und vier Tagen um 60% verzögert. Allerdings wuchsen die Zellen mit dem irrelevanten GL4-Virus etwas langsamer als die Zellen ohne Virustransduktion (Abb. 41). Das Ergebnis ist vergleichbar mit der Zellproliferation von Ba/F3-b2a2-Zellen nach der Virustransduktion und wurde nach Beobachten der Abnahme der Rotfluoreszenz auch bei Ba/F3-Zellen erwartet.

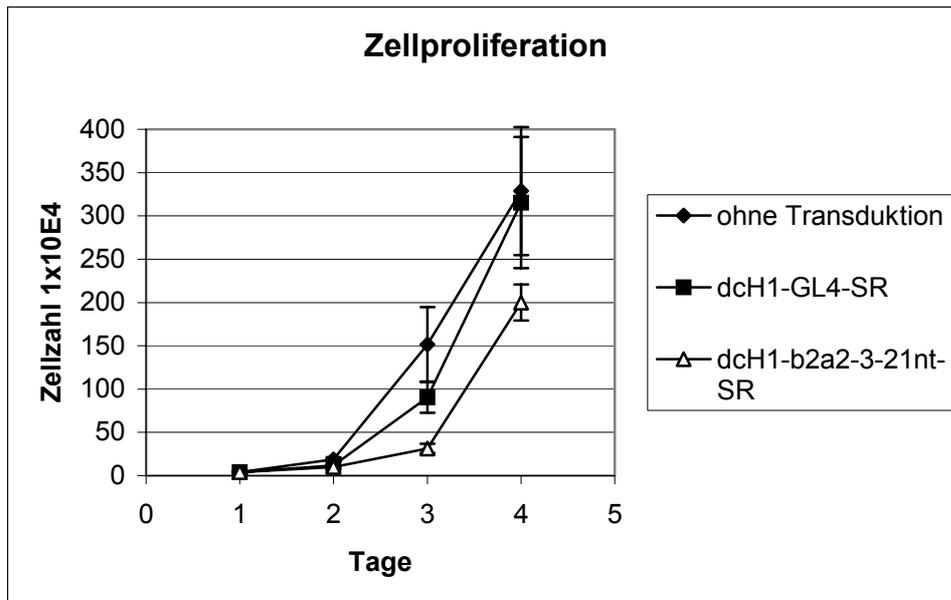


Abb. 41: Wachstum der Ba/F3-Zellen nach Transduktion mit den Lentiviren dcH1-GL4-SR und dcH1-b2a2-3-21nt-SR. Am Tag nach der Transduktion wurden 5×10^4 Zellen pro Zelllinie vorgelegt und die Zellzahl an aufeinanderfolgenden Tagen mittels Trypanblaufärbung bestimmt. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

- **Virustransduktion in NIH3T3-Zellen**

Es sollte überprüft werden, ob die siRNA b2a2-3-21nt generell in allen murinen Zellen eine Reduktion eines für die Zellproliferation wichtigen Proteins bewirkt oder nur speziell in Ba/F3-Zellen. Dazu wurde die Fibroblastenzelllinie NIH3T3 mit den Lentiviren gegen b2a2 und GL4 als Kontrolle transduziert.

Die Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop zeigten drei Tage nach der Transduktion über 90% stark rotleuchtende Zellen bei beiden verwendeten Transgenen. Am Tag 10 dagegen sah man bei den Zellen, die mit den dcH1-b2a2-3-21nt-SR-Viren transduziert wurden, nur noch wenige schwach leuchtende Zellen. Die Durchlichtaufnahme zeigt eine konfluente Zellpopulation, das heißt, Zellen mit wenig oder gar keiner shRNA-Expression hatten einen deutlichen Wachstumsvorteil. Bei den Kontrollzellen war die Rotfluoreszenzintensität am Tag 10 wesentlich stärker als am dritten Tag.

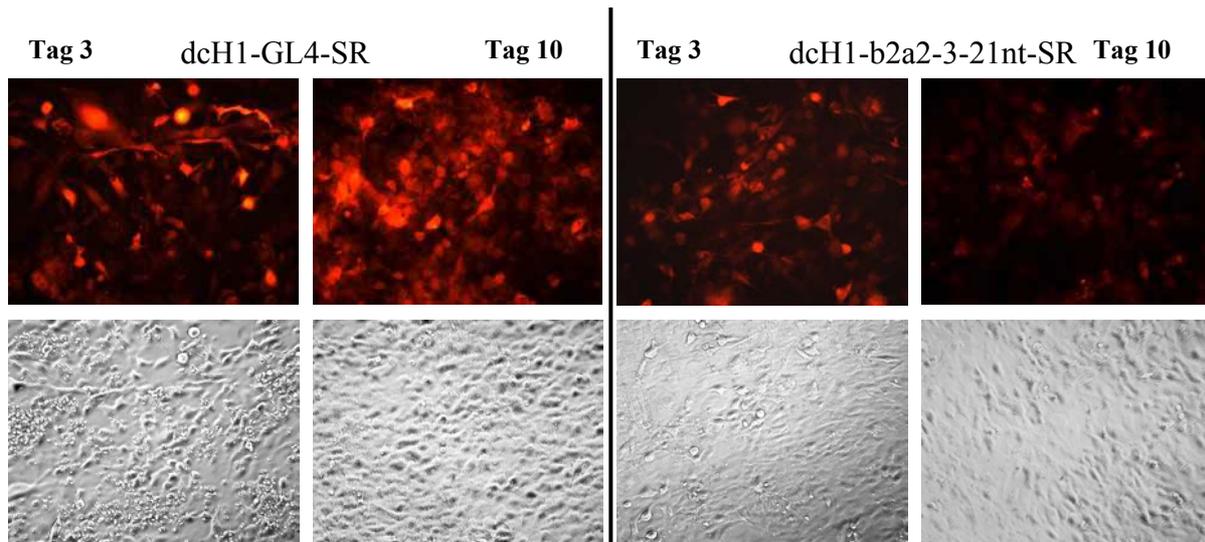


Abb. 42: NIH3T3-Zellen drei und zehn Tage nach Transduktion mit den Lentiviren dcH1-GL4-SR und dcH1-b2a2-3-21nt-SR. Es wurden 1×10^5 Zellen in 24-Lochplatten ausgesät und nach Erreichen von 90% Konfluenz mit 1×10^6 Viruspartikeln transduziert. Nach Mediumwechsel und Waschen der Zellen wurden an mehreren darauffolgenden Tagen Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop mit Fluoreszenzlicht und Durchlicht angefertigt.

Humane Zelllinien

In murinen Zellen zeigte die Transduktion der b2a2-3-21nt-siRNA ein BCR-Abl unabhängiges Zellsterben aller Zelltypen. Es sollte nun untersucht werden, wie spezifisch die siRNA in humanen Zellen eine Reduktion des b2a2-Proteins bewirkt. Dazu wurden b2a2-positive Meg01-Zellen sowie die leukämischen Kontrollzelllinien K562 mit der b3a2-Translokation und die U937 ohne BCR-Abl-Expression verwendet.

• **Virustransduktion in Meg01-Zellen**

Die b2a2-positiven Meg01-Zellen wurden mit den shRNA-exprimierenden Lentiviren transduziert, um ein Zellsterben durch Inhibition des BCR-Abl-Proteins zu zeigen.

Die Zellen wurden mit den Lentiviren dcH1-b2a2-3-21nt-SR und dcH1-GL4-SR als Kontrolle transduziert und der Anteil rotfluoreszierender Zellen sowie die Fluoreszenzintensität am Mikroskop und mit FACS-Messungen an mehreren Tagen überprüft. Die Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop zeigten fünf Tage nach der Transduktion einen hohen Anteil stark fluoreszierender Zellen. Zwölf Tage nach der Transduktion lebten noch 10% der Zellen mit der shRNA-Expression gegen b2a2. Bei den Kontrollzellen waren noch 90% der Zellen vital. Diese Zellen zeigten eine noch intensivere Rotfluoreszenz (Abb.43).

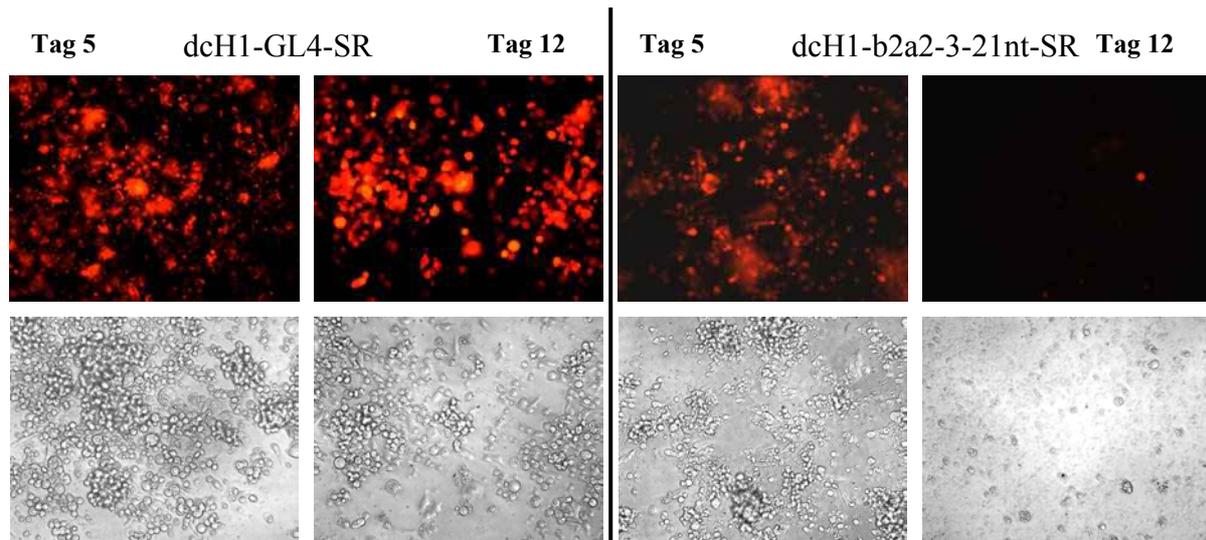


Abb. 43: Meg01-Zellen fünf und zwölf Tage nach Transduktion mit den Lentiviren dcH1-GL4-SR und dcH1-b2a2-3-21nt-SR. Es wurden 5×10^5 Zellen in 24-Lochplatten ausgesät und nach Erreichen von 90% Konfluenz mit 1×10^6 Viruspartikeln transduziert. Nach drei Tagen wurden die Zellen von der Oberfläche abgelöst und mit 3×10^5 Zellen pro Vertiefung einer 24-Lochplatte neu ausgesät. An mehreren darauffolgenden Tagen wurden Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop mit Fluoreszenzlicht und Durchlicht angefertigt.

Die FACS-Messung spiegelt diese Ergebnisse wieder. In der Abbildung 44 ist (A) der Anteil rotfluoreszierender Zellen, (B) das Verhältnis der Rotfluoreszenzintensitäten sowie (C) der Anteil toter Zellen bis neun Tage nach der Transduktion dargestellt.

Der Anteil rotleuchtender Zellen lag bei allen Experimenten sowohl bei den b2a2-reduzierten als auch bei den Kontrollzellen an allen Tagen zwischen 90 und 100%. Bei Betrachtung der Rotfluoreszenzintensität zeigte sich, dass das Verhältnis der RFI b2a2-3-21nt/GL4 von anfänglich $>200\%$ auf 40% neun Tage nach der Transduktion absank. Der Anteil toter Zellen lag bei der ersten FACS-Messung drei Tage nach Transduktion bei allen Zelllinien zwischen 40 und 60%. Neun Tage nach Transduktion lag der Anteil toter Zellen den Zellen ohne Transduktion und mit dcH1-GL4-SR-Transduktion bei 30%, wohingegen er bei den Zellen mit dem anti-b2a2-Virus bei 90% lag (Abb. 44).

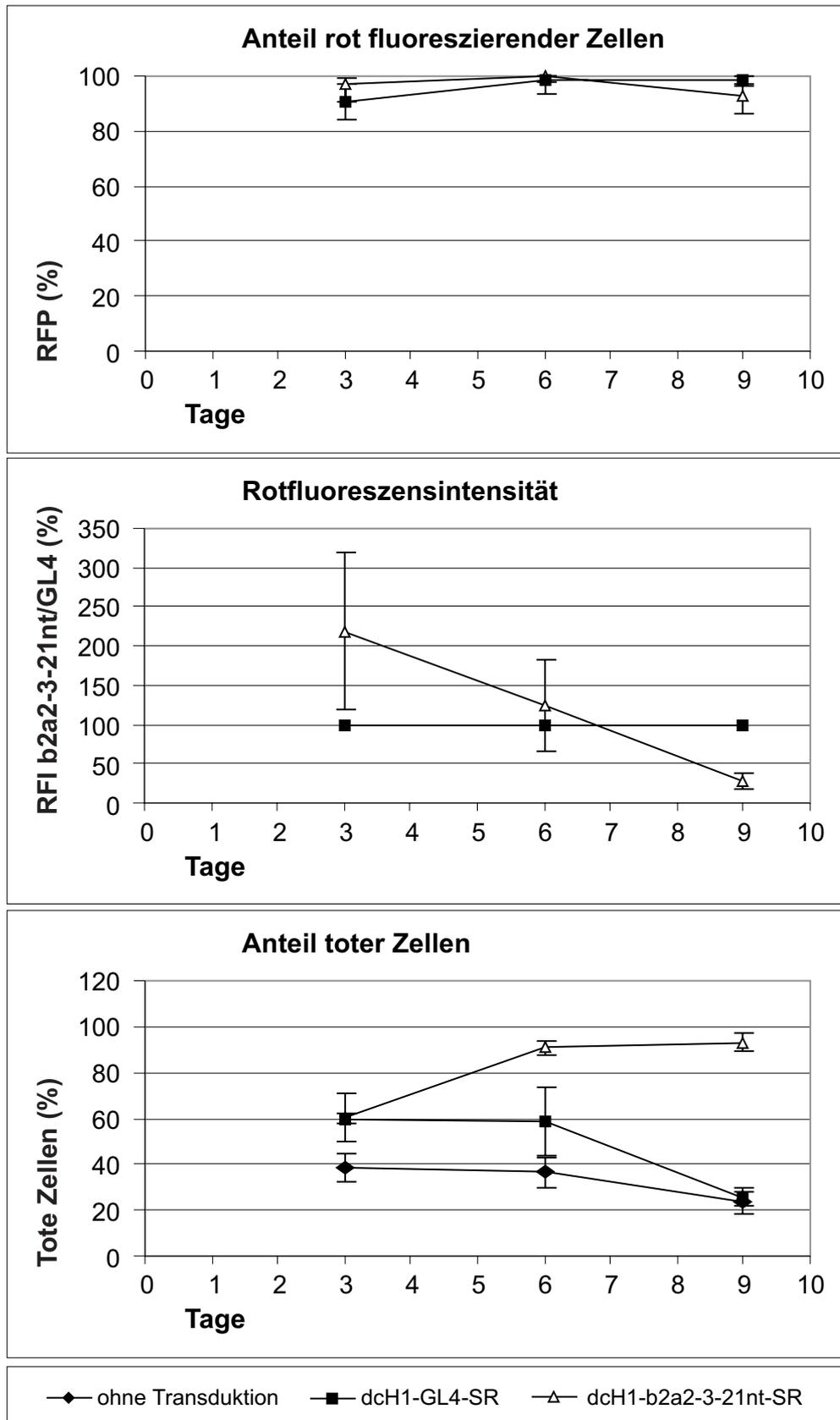


Abb. 44: FACS-Messung der Meg01-Zellen nach Transduktion mit den Lentiviren dcH1-GL4-SR und dcH1-b2a2-3-21nt-SR. Es wurden 5×10^5 Zellen in 24-Lochplatten ausgesät und nach Erreichen von 90% Konfluenz mit 1×10^6 Viruspartikeln transduziert. Nach drei Tagen wurden die Zellen von der Oberfläche abgelöst und mit 3×10^5 Zellen pro Vertiefung einer 24-Lochplatte neu ausgesät. Nach sechs und neun Tagen wurden die Zellen im Überstand im FACS-Gerät gemessen. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

RFP-Expression der Zellen

Die humanen Zelllinien K562 und U937 wurden mit den Lentiviren dcH1-b2a2-3-21nt-SR und dcH1-GL4-SR transduziert und der Anteil rotfluoreszierender Zellen im FACS-Gerät über einen Zeitraum von 30 Tagen gemessen. Die K562-Zellen, die die b3a2-Variante des BCR-Abl-Proteins exprimieren, konnten in drei voneinander unabhängigen Versuchen zu 99% sowohl mit dem GL4-Kontrollvirus, als auch mit dem anti-b2a2-shRNA-Virus mit MOI-Werten zwischen 5 und 50 transduziert werden. Der Anteil rotfluoreszierender Zellen nahm innerhalb mehrerer Wochen nicht ab (Abb.45A).

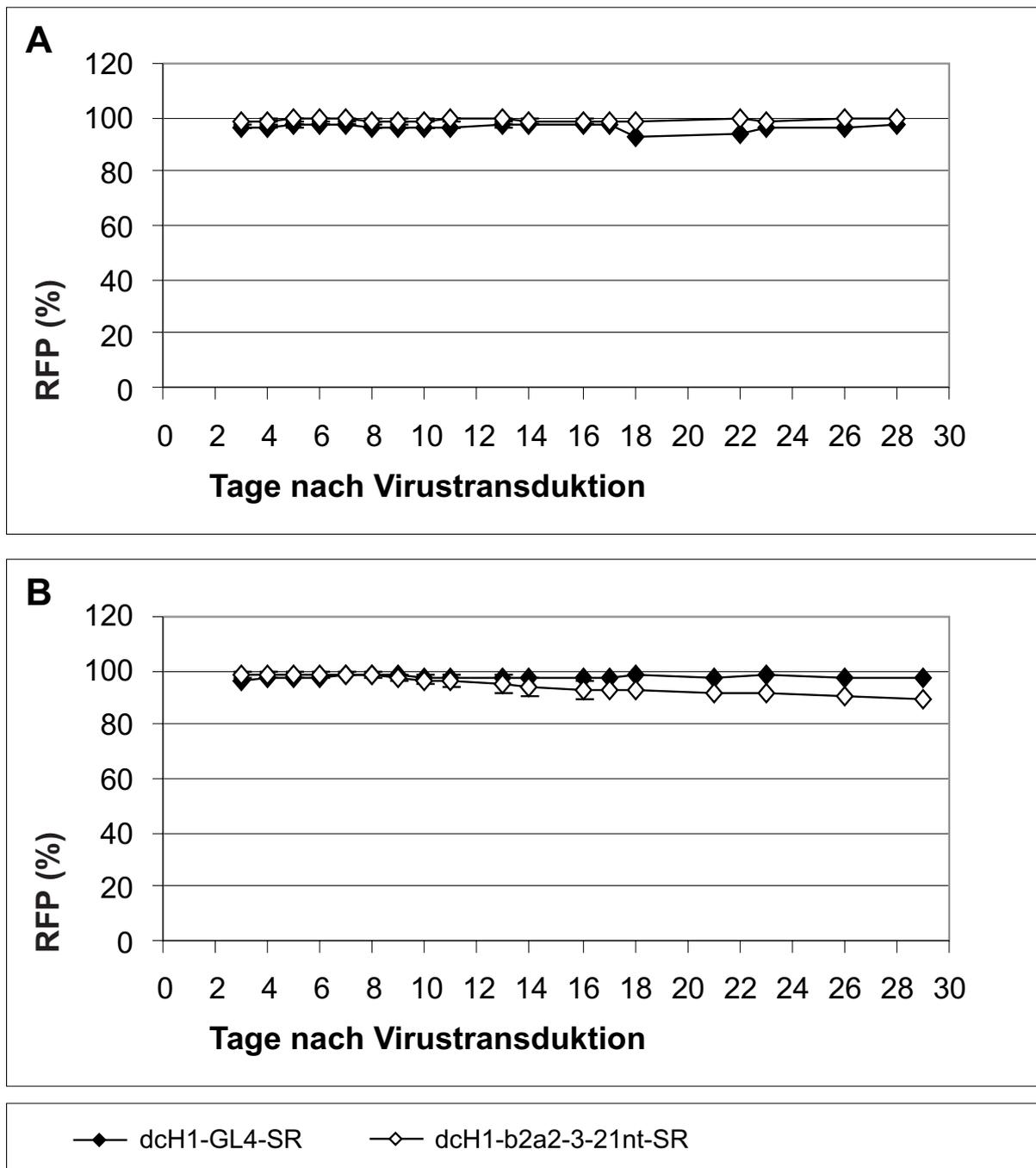


Abb. 45: Anteil rotfluoreszenzierender A: K562- und B: U937-Zellen im FACS nach Transduktion mit den Lentiviren dcH1-GL4-SR und dcH1-b2a2-3-21nt-SR

U937-Zellen konnten in drei voneinander unabhängigen Versuchen ebenfalls zu 99% mit den verschiedenen Lentiviren transduziert werden. Hier sank der Anteil rotfluoreszierender Zellen mit anti-b2a2-shRNA-Expression innerhalb von 30 Tagen auf 85% ab. Die Zellen, die mit dem Kontrollvirus transduziert wurden, zeigten dagegen keine Veränderung in der RFP-Expression (Abb. 45B).

Betrachtete man bei beiden Zelllinien die Intensität der Rotfluoreszenz (Y Mean), so konnte man jeweils eine Abnahme des prozentualen Anteils der Rotfluoreszenzintensität von Zellen mit dem dcH1-b2a2-3-21nt-SR-Virus an den Kontrollzellen (dcH1-GL4-SR) beobachten (Abb.46). Bei den K562-Zellen war diese Abnahme von 124% auf 70% in 18 Tagen gleich stark wie bei den U937-Zellen (von 85% auf 30%). In den Abbildungen sind die einzelnen Messungen (A-C) sowie der Mittelwert (MW) dargestellt. Die Intensität der Rotfluoreszenz der GL-4-Kontrollzellen entspricht 100%. In den einzelnen Transduktionsversuchen war, prozentual gesehen, die Rotfluoreszenzintensität der Zellen mit dem b2a2-3-21nt-shRNA-Virus im Vergleich zu den Kontrollzellen sehr unterschiedlich. Die Werte schwankten zwischen 60% und 180%.

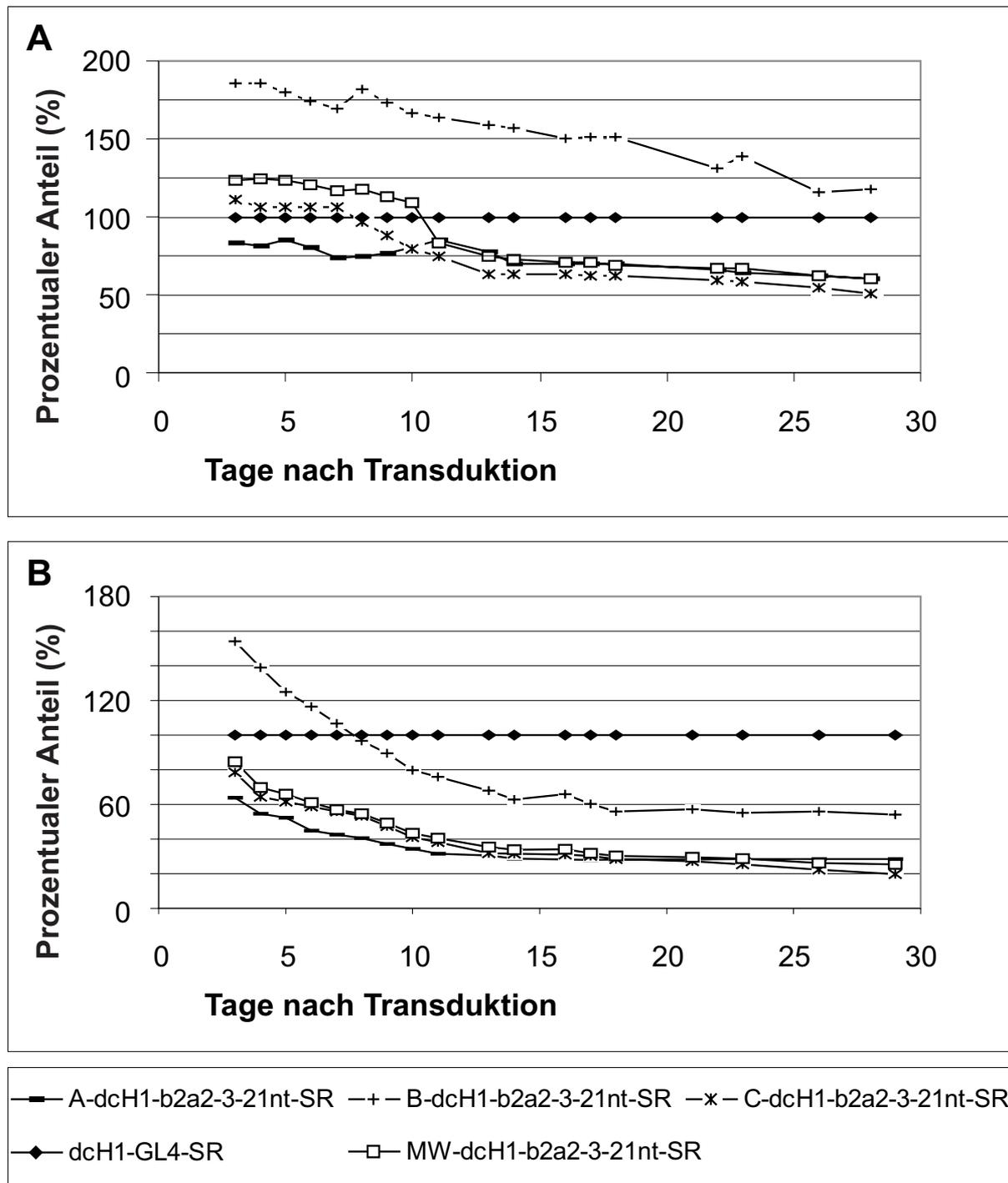


Abb. 46: Prozentualer Anteil der Intensität der Rotfluoreszenz der A: K562- und B: U937-Zellen mit dem dcH1-b2a2-3-21-SR-Virus an den Kontrollzellen, transduziert mit dcH1-GL4-SR-Lentivirus. Es wurde in jedem der drei voneinander unabhängigen Experimente der prozentuale Anteil der Intensität der Rotfluoreszenz (YMean) der b2a2-3-21nt-transduzierten Zellen an der Intensität der GL4-Kontrollzellen bestimmt und daraus ein Mittelwert gebildet.

Bei den K562-Zellen erreichte der Absolutwert der Rotfluoreszenzintensität wenige Tage nach der Transduktion der Zellen mit dem anti-b2a2-Virus, bei den verschiedenen Experimenten sehr unterschiedliche Ausgangswerte. Diese schwankten zwischen 1000 (A, B) und 4000 (C). Dementsprechend unterschiedlich war auch die Abnahme der Intensität im Verhältnis zu den Zellen mit dem GL4-Virus. Bei Versuch A nahm die Intensität von 80% auf

60%, bei B von 180% auf 150% ab. Bei dem Versuch C dagegen nahm die Intensität von 110% auf 60% ab. Die Rotfluoreszenzintensitätsabnahme war bei dem Versuch mit einer dreifach höheren absoluten Ausgangsfluoreszenzintensität nach 18 Tagen demzufolge doppelt so hoch wie bei den niedrigeren Ausgangswerten.

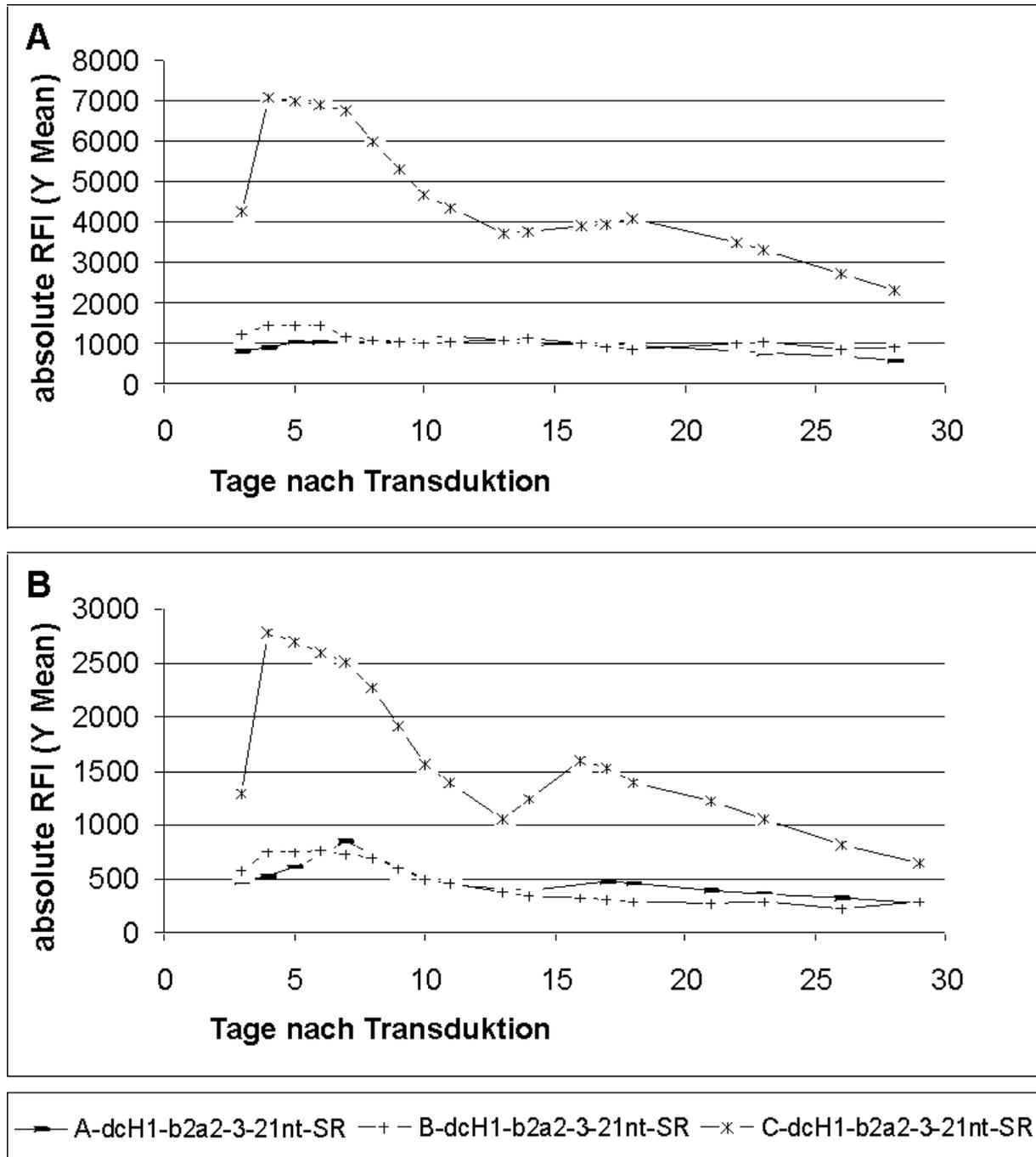


Abb. 47: Absolute Werte der Intensität der Rotfluoreszenz der A: K562- und B: U937-Zellen nach Transduktion mit dem dcH1-b2a2-3-21-SR-Virus. Es wurde in der drei voneinander unabhängigen Experimenten der Absolutwert der Intensität der Rotfluoreszenz (YMean) der b2a2-3-21nt-transduzierten Zellen gezeigt.

Entsprechend ähnlich verhielten sich die U937-Zellen. Auch hier war der Absolutwert der Fluoreszenzintensität nach Transduktion bei einem der Versuche sehr viel höher (2600) als

bei zwei anderen Versuchen (ca. 750). Allerdings war die Abnahme der Intensitätsverhältnisse nach 30 Tagen bei allen Versuchen sehr ähnlich. Sie lag zwischen 55 und 65%.

Zellproliferation

Parallel zur Messung der RFP-exprimierenden Zellen im FACS wurde deren Proliferation beobachtet und die Zellen an aufeinanderfolgenden Tagen mittels Trypanblaufärbung gezählt. Die K562-Zellen mit der anti-b2a2-shRNA zeigten eine Verzögerung der Zellproliferation nach ca. einer Woche (Abb. 48). Allerdings wuchsen die Zellen mit dem Kontrollvirus bereits im Vergleich zu den nicht transduzierten Zellen langsamer. Demnach lag eine Proliferationsverzögerung schon allein durch Transduktion mit dem Lentivirus vor.

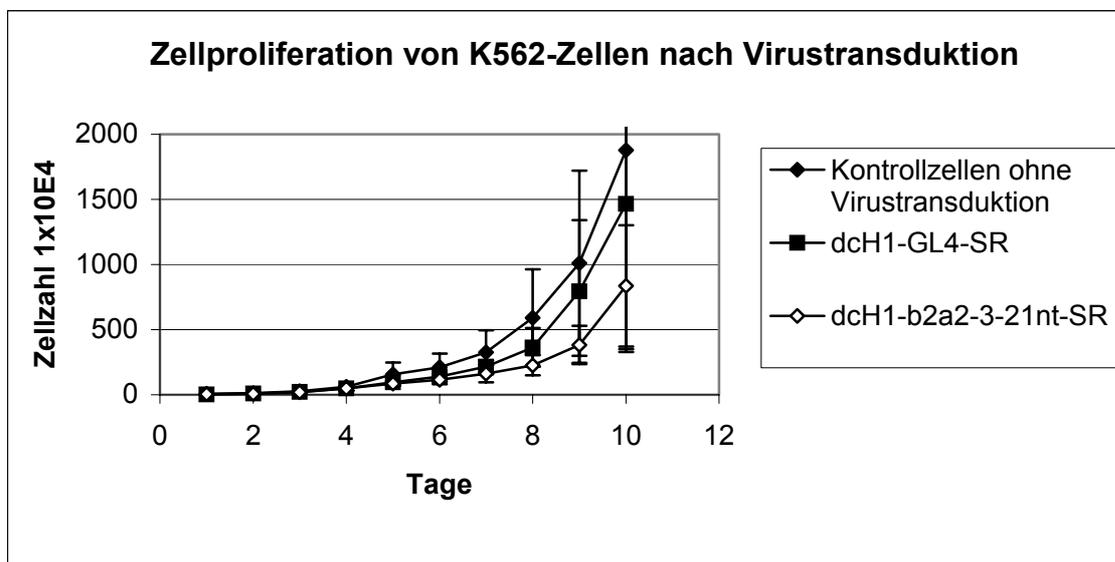


Abb. 48: Wachstum der K562-Zellen nach Transduktion mit dem anti-b2a2-shRNA-exprimierenden Lentivirus. Am Tag nach der Transduktion wurden 5×10^4 Zellen pro Zelllinie vorgelegt und die Zellzahl an aufeinanderfolgenden Tagen mittels Trypanblaufärbung bestimmt. In der Abbildung wurden alle drei Experimente in Mittelwertkurven zusammengefasst.

Die U937-Zellen zeigten aufgrund der unterschiedlichen Ausgangsfluoreszenzintensitäten nach Transduktion mit dem anti-b2a2-Virus ein unterschiedliches Proliferationsverhalten in den verschiedenen Versuchen. In dem Experiment mit hohen Intensitätswerten (C) fiel die Zellzahl nach einer Woche auf Null ab. In den beiden anderen Versuchen mit der durchschnittlichen Rotfluoreszenzintensität von 750 konnte nur eine Verzögerung des Zellwachstums um 50% im Vergleich zu den GL4-Kontrollzellen beobachtet werden. Demnach war es entscheidend, wie stark die U937-Zellen mit dem Lentivirus infiziert waren. Die Darstellung zeigt deutlich eine Verzögerung des Zellwachstums mit dem b2a2-3-21nt-shRNA-Virus im Vergleich zu den Kontrollzellen. Auch hier war die Zellproliferation der GL4-shRNA-transduzierten Zellen im Vergleich zu den Zellen ohne Virus leicht verzögert.

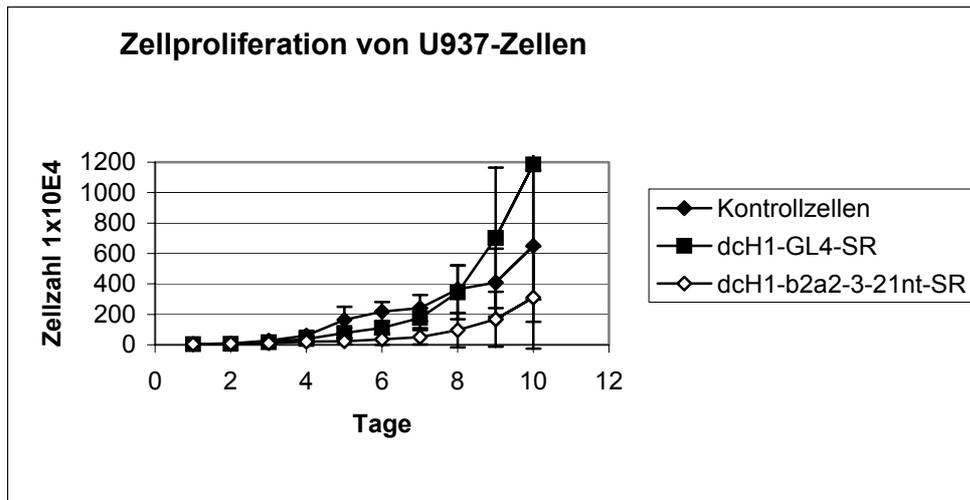


Abb. 49: Wachstum der U937-Zellen nach Transduktion mit dem anti-b2a2-shRNA-exprimierenden Lentivirus. Am Tag nach der Transduktion wurden 5×10^4 Zellen pro Zelllinie vorgelegt und an aufeinanderfolgenden Tagen mittels Trypanblaufärbung die Zellzahl bestimmt.

Die humanen Zellen zeigten im Vergleich zum murinen Zellsystem eine Verzögerung in der Zellproliferation und eine Abnahme der Rotfluoreszenzintensität der Zellen, aber kein Abfall des Anteils rotfluoreszierender Zellen.

3.3.7 Einführung einer Basenfehlpaarung in shRNA-Konstrukte

Da zwar eine effiziente aber auch unspezifische siRNA gegen b2a2 gefunden wurde, sollte in weiteren Experimenten die Effizienz einer shRNA durch Einführen einer Basenfehlpaarung am 3'-Ende des Sense-Stranges erhöht werden.

Die im Absatz 3.2 beschriebene shRNA b2a2-1, durch pSuper exprimiert, zeigt im Gegensatz zur shRNA b2a2-3 keine signifikanten Übereinstimmungen mit der humanen c-abl-Sequenz oder sonstigen Bereichen des humanen oder murinen Genoms. Im pSuper-Plasmid zeigte sie allerdings nur eine Reduktion von 39% der grünfluoreszierenden Zellen nach der Kotransfektion mit dem sb2a2-EGFP-Plasmid in HeLa-Zellen.

Um eine höhere Effizienz dieser b2a2-1-shRNA-Sequenz zu erreichen, wurden an das 3'-Ende des Sense-Stranges des shRNA-Duplex eine Basenfehlpaarung durch Mutagenese eingefügt [30]. Gleichzeitig wurde in der *Loop*-Sequenz die Base Cytosin gegen Guanin ausgetauscht, um eine *XmnI*-Schnittstelle zu zerstören und dadurch einen Selektionsmarker für eine erfolgreiche Mutagenesereaktion zu erhalten (Abb. 50).

b2a2-1 shRNA sense loop antisense

5 `CCATCAATAAGGAAG↓AAGCCC-ttcaagaga-GGGCTT↓CTTCC... 3 `

1MKC-F CATCAATAAGGAAG↓AAGCCA-ttgaagaga-GGGCTT↓CTTCC

Abb. 50: Darstellung des Primers für die Mutagenesereaktion. Die Sequenz der b2a2-1-shRNA, wie sie im pSuper Plasmid vorliegt, sollte mit einer Mutagenesereaktion dahingehend verändert werden, dass eine mismatch-Basenpaarung am 3'-Ende des Sense-Stranges vorliegt. Der Primer 1MKC-F sowie der komplementäre reverse-Primer wurden für eine Mutagenesereaktion mit dem *QuikChange XL site-directed Mutagenesis Kit* von Stratagene verwendet.

Mit einer gezielten Mutagenese mit dem *QuickChange XL site-directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) wurde mit zwei Primern, die die entsprechenden Veränderungen besitzen, die Fehlbasenpaarung in das Amplifikat eingefügt. Das neu gewonnene Plasmid pSuper-b2a2-1C wurde durch Kotransfektion mit dem sb2a2-EGFP-Plasmid in HeLa-Zellen getestet und eine um 50% verminderte Effizienz der shRNA beobachtet (Abb.51).

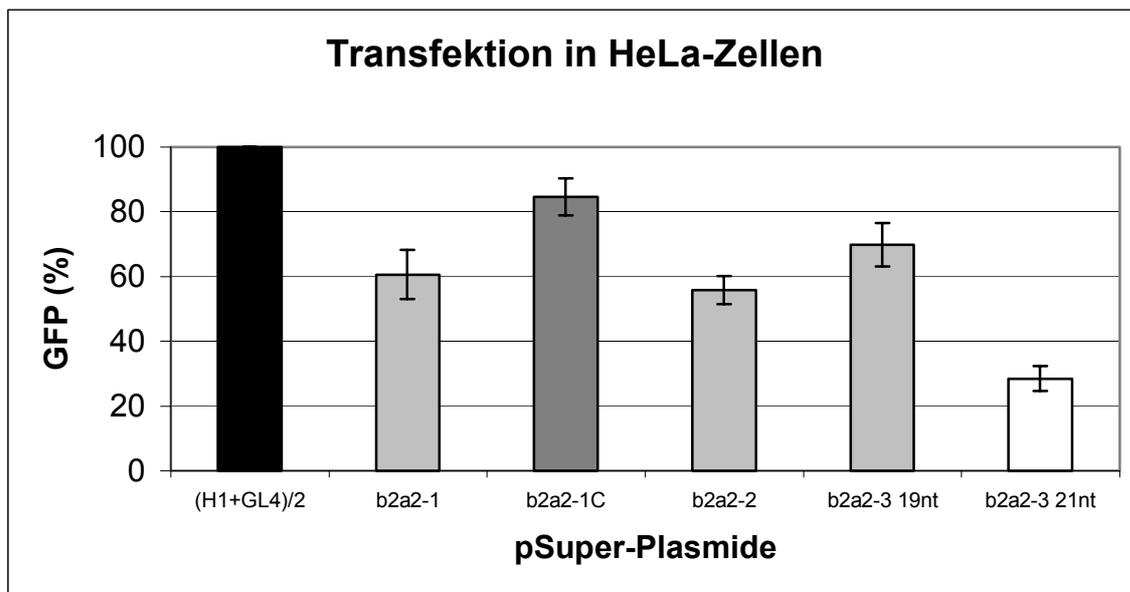


Abb. 51: Effizienz der durch Mutagenese entstandenen shRNAs im Vergleich zu den anderen in pSuper exprimierten shRNAs. Die durch Mutagenesereaktionen veränderten pSuper-Plasmide wurden mit pcDNA3.1-sb2a2-EGFP und LNSN in HeLa-Zellen kotransfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit einem anti-LNGFR-Antikörper markiert und die Rot- und Grünfluoreszenz der Zellen im FACS gemessen. Die Reduktion des GFP, mit der Transfektionseffizienz an LNGFR normalisiert, entspricht der shRNA-Effektivität.

Tab. 1: Vergleich der siRNA-Sequenzen mit in Datenbanken verfügbaren Gensequenzen.

siRNA	Gen im Vergleich	Übereinstimmungen	Datenbankname
siRNA b2a2-1			
murin	-/-	-/-	
human	baculoviral IAP repeat-containing (BIRC4) mRNA (Apoptoseinhibitor)	17	NM 001167
	c-abl1	15	M14752
	bcr	17	X02596 M24603
siRNA b2a2-2			
murin	G-bindendes Protein Gna-rs1	16	Mm. 335754
human	c-abl1	17	M14752
	bcr	14	X02596 M24603
siRNA b2a2-3-19			
murin	G-bindendes Protein Gna-rs1	18	Mm. 335754
	ribosomales Protein RPL6	17	Mm. 262021
human	c-Abl1	19	M14752
	tel/abl	18	Z 35761
siRNA b2a2-3-21			
murin	G-bindendes Protein Gna-rs1	18	Mm. 335754
	RIKEN cDNA gene	18	Mm. 40036
	ribosomales Protein RPL6	17	Mm. 262021
	v-abl-homolog	12	L 10656
human	c-abl1	21	M14752
	tel/abl	18	Z 35761
	bcr	9	X02596 M24603

4 Diskussion

4.1 Phage Display

Mit der *Phage Display*-Technologie sollte ein spezifisch an die b3a2-mRNA bindender Peptidligand selektiert werden. Es wurden drei Selektionsrunden mit zwei verschiedenen Phagenbibliotheken durchgeführt, die Peptide mit einer Länge von sieben bzw. zwölf Aminosäuren exprimierten. Entgegen Herstellerangaben konnte nach drei Selektionsrunden kein sich wiederholendes spezifisch RNA-bindendes Motiv identifiziert werden. Stattdessen enthielten die Konstrukte vermehrt basische Aminosäuren (v.a. Histidin, aber auch Lysin) sowie Glycin, Alanin und Prolin. Die Anreicherung von Histidin und Lysin ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die positiv geladenen Aminosäuren bevorzugt an die negativ geladenen Phosphatgruppen der RNA und damit weniger spezifisch binden. Dieser Effekt wird in bekannten RNA-bindenden Motiven durch Arginin-reiche Sequenzen zur Erleichterung der Suche nach hochaffinen Bindungsstellen genutzt. Prolin und Histidin können aufgrund ihrer raumfordernden Ringstrukturen, Glycin und Alanin aufgrund ihrer geringen Größe in der Sekundärstruktur der RNA ebenfalls besser binden. Alle diese Aminosäuren befinden sich häufig an Wendepunkten wie z.B. zwischen zwei β -Faltblättern.

Da kein deutliches Motiv selektiert werden konnte, werden nachfolgend mögliche Ursachen diskutiert: Zum einen hätte eventuell mit zusätzlichen Selektionsschritten ein spezifisch bindendes Peptid isoliert werden können. Da aber bereits nach drei Selektionsrunden nur Histidin- und Prolin-reiche Sequenzen analysiert wurden, lag die Überlegung nahe, dass fälschlicherweise Streptavidin-bindende Phagen (HPQ-Motiv) isoliert wurden.

Weiterhin bestehen die verwendeten *Phage Display*-Bibliotheken nur aus 2×10^9 elektroporierten Sequenzen. Damit sind die meisten der möglichen Peptidsequenzen mit sieben Aminosäuren ($20^7 = 1,28 \times 10^9$) eingeschlossen, aber bei den Peptiden mit 12 Aminosäuren wird von $20^{12} = 4,1 \times 10^{15}$ Möglichkeiten nur ein kleiner Teil abgedeckt. Selbst bei Verwendung einer größeren Bibliothek kann jedoch nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass ein spezifisch an die mRNA-Region bindender Phage selektiert wird.

Außerdem wird innerhalb der *Phage Display*-Technologie eine *in vitro*-Selektion und keine *in vitro*-Evolution durchgeführt. Dementsprechend werden alle Phagen gleichermaßen nach einem Selektionsschritt amplifiziert. So kann die Varietät der angebotenen Peptide nicht

nachträglich erweitert werden und es ist möglich, dass Phagen, die in der ersten Runde an die mRNA gebunden haben, beim zweiten Selektionsschritt verloren gingen.

Zum anderen ist nicht geklärt, ob die immobilisierte RNA hinsichtlich der Struktur und der Länge Instabilitäten unterlag. Der RNA-Abbau durch Verunreinigungen wie z.B. RNasen oder die Veränderung der Sekundärstruktur z.B. durch Temperaturschwankungen oder Pufferwechsel muss hier in Betracht gezogen werden. Auch bei der experimentellen Strukturanalyse der RNA konnten Instabilitäten dadurch gezeigt werden, dass bei mehrfacher Durchführung gleicher Restriktionsansätze mit dem gleichen Enzym und unter identischen Bedingungen verschiedene Fragmente entstehen.

Insgesamt war die Menge der zur Immobilisation an magnetische Kügelchen verwendeten RNA ein limitierender Faktor, da zur Überprüfung der spezifischen Bindung selektionierter Phagen in einem ELISA-Verfahren sowie für weitere Selektionsrunden jeweils eine bestimmte Menge erforderlich war, die aufwändig aufgereinigt werden musste. So wurden in jedem Selektionsansatz 40pmol (1,3µg) RNA eingesetzt. Pustowka *et al.* [14] verwendeten für die Immobilisation an Streptavidin-beschichteten Zellkulturplatten für jeden Ansatz nur 50ng RNA. Bei dem Versuch, diesen Ansatz zu verwenden, konnte jedoch nur eine Phagensequenz detektiert werden. Sie war in allen verwendeten Vertiefungen der Platte nachweisbar und muss deshalb als Artefakt gewertet werden. Jonas *et al.* [155] verwendeten 700µg Streptavidin-Kügelchen und 25ng immobilisierte chemisch synthetisierte TAR-RNA zur Selektion von Peptidliganden. Dieser Ansatz wurde ebenfalls in der vorliegenden Arbeit getestet. Es wurde versucht, die gebundenen Phagen über Peroxidase-markierte Anti-M13-Antikörper nachzuweisen. Dazu wurden zunächst 50, 100 und 600ng des biotinylierten Anti-M13-Antikörpers statt der RNA immobilisiert, um einen Anhaltspunkt für die einzusetzende RNA-Menge zu erhalten. Bei 50ng Antikörper konnten keine gebundenen Phagen nachgewiesen werden, während bei 100 und 600ng stark positive Signale im Photometer detektiert wurden. Mit 100ng RNA konnten keine positiven Signale gemessen werden (Daten nicht gezeigt), was möglicherweise auf die ersten vier der bisher genannten Faktoren zurückzuführen ist.

Weiterhin muss neben der absoluten RNA-Menge überprüft werden, ob die eingesetzten Konzentrationen für eine ausreichend Komplexbildung zwischen Phagen und RNA hoch genug waren. Es wurden 1µM RNA und 7×10^{-10} M Phagen eingesetzt, wobei sich diese Konzentrationen durch die limitierte Ausbeute der Präparation bzw. durch die vom Hersteller gelieferte Menge ergibt. Unter der Annahme, dass bestenfalls jeder 1000. Phage eine Bindung mit der RNA eingeht, liegen erst bei einer sehr hohen Bindungsaffinität ($K_{\text{ass}}=1 \times 10^8$) alle

Phagen im RNA-Peptid-Komplex gebunden vor. Bei niedrigeren Affinitäten geht der Anteil der im Komplex mit der RNA vorliegenden Phagen stark zurück und beträgt bei $K_{\text{ass}}=1 \times 10^4$ nur noch 1%. Da es nur wenige (wenn überhaupt) stark bindende Peptide gibt und die individuellen Bindungsstärken der meisten Peptide zur RNA eher gering sind, sind die entsprechenden Phagen wahrscheinlich bei der Selektion verloren gegangen. Daher hätte nur durch Konzentrationserhöhung der Bindungspartner ein fest gebundenes und damit spezifisches Peptid isoliert werden können. Für spätere Anwendungen in Hinsicht der therapeutischen Möglichkeiten ist eine hohe Bindungsstärke des Peptids aber unbedingt erforderlich. Eine Selektion mit Evolution hätte somit die wenigen stark bindenden Phagen weiter variieren und die Chance auf ihre Selektion vergrößern können. Eine Evolution war mit dem verwendeten System nicht möglich, da notwendige Herstellerangaben fehlten, z.B. Sequenzen für eine Primeranlagerung in einer mutagenen Amplifikation. Bei Betrachtung dieser verschiedenen Argumentationen war die Isolierung eines spezifisch bindenden Peptids nicht wahrscheinlich.

Für die Etablierung des ELISA-Verfahrens sowie für den Nachweis der Bindung der biotinylierten RNA an Streptavidin wäre eine Positivkontrolle in Form eines spezifisch die RNA-bindenden Phagen oder Proteins von Vorteil gewesen. Für die bcr-abl-mRNA ist aber bisher kein bindendes Protein bekannt, und es stand nur ein biotinylierter Anti-M13-Antikörper als Kontrolle für die Phagenbindung zur Verfügung.

Ein letzter Punkt, warum die Anwendung der *Phage Display*-Methode nicht erfolgreich war, ist möglicherweise die RNA-Sekundärstruktur des verwendeten b3a2-Fusionsgens. Diese liegt um den Bruchpunkt in einem breiten nicht basengepaarten Bereich, in dem es keinen Angriffspunkt für eine spezifische Interaktion gibt. Die bekannten Interaktionen des Rev- oder Tat-Peptids erfolgen über imperfekt basengepaarte Bereiche mit Basenfehlpaarungen und einzelnen Nukleotiden in Doppelstrangbereichen, die an der Wechselwirkung mit dem Peptid beteiligt sind. In Hinblick darauf wäre die b2a2-mRNA, deren Bruchpunktregion mehrere kleinere *Loops* und damit potenzielle spezifische Interaktionsregionen aufweist, für die Phage Display-Methode besser geeignet gewesen.

Die verschiedenen genannten Punkte wie ein fehlendes spezifisches Motiv, die zu geringe Peptidvarianz, die fehlende Evolution während der Selektion, die unzureichenden Konzentrationen an Phagen und RNA und die hohe Flexibilität der RNA-Sekundärstruktur führten zu der Wahl einer zweiten Methode der mRNA-Inhibition.

4.2 RNA-Sekundärstrukturanalyse

Um die Sekundärstruktur der 100nt langen b3a2-RNA experimentell zu bestimmen, wurde die RNA enzymatisch gespalten und die Fragmente nach reverser Transkription mit Fluoreszenzmarkierten Primern nach Auftrennung durch eine Kapillarelektrophorese mit einem ABI 310-Gerät detektiert. Wie schon bei der Diskussion der *Phage Display*-Methode erwähnt, entstanden bei mehrfacher Durchführung gleicher Restriktionsansätze mit dem gleichen Enzym und unter identischen Bedingungen verschiedene Fragmente. Bei Betrachtung der Sekundärstrukturvorhersage waren diese Fragmente sowie eventuelle weitere in nur einem Ansatz zu erwarten gewesen. Das nicht verschiedene Fragmente in einem Ansatz detektiert wurden, ist eventuell mit dem speziell verwendeten Analysesystem zu begründen. Möglicherweise sind Fragmente, die bei der Kapillarelektrophorese in geringen Konzentrationen vorlagen von der speziellen Auswertungssoftware des ABI-Gerätes ausgeschlossen und nur die Hauptprodukte ermittelt worden. Weiterhin sind verschiedene RNA-Präparationen verwendet worden, die möglicherweise Sekundär- und Tertiärstrukturen ausbilden, die unterschiedlich zugänglich für die jeweiligen RNasen waren.

In einer Messreihe traten Fragmente mit 112nt auf. Anzunehmen wäre, dass durch Rückfaltungen in der cDNA-Synthese solche überlangen Fragmente synthetisiert wurden. Diese traten nur bei den Hauptprodukten im Bereich von 54-56 Nukleotiden auf, die eventuell geeignet sind, entsprechende Rückfaltungen zu bilden.

4.3 bcr-abl-Suppression mit siRNAs

Im zweiten methodischen Ansatz wurde mit siRNAs spezifisch, sowohl transient als auch stabil, die b2a2-Transkriptionsvariante der bcr-abl-mRNA inhibiert.

4.3.1 Transiente bcr-abl-Suppression mit siRNAs

Mit der Elektroporation der chemisch synthetisierten siRNA b2a2-3 und mit b2a2-3-21nt-shRNA-exprimierenden Plasmiden konnte ein transienter siRNA-Effekt in Ba/F3-b2a2-Zellen gezeigt werden. Wenige Tage nach der Transfektion kam es zu einer Verzögerung der Zellproliferation. Danach zeigten die Zellen wieder ein mit den Kontrollzellen vergleichbares Proliferationsverhalten. Dieser Wiederanstieg lässt sich damit erklären, dass die transfizierten Zellen abstarben und die nicht transfizierten Zellen nach vier bis fünf Tagen in der Population überwogen. Dies lässt auf eine geringe Transfektionsrate schließen.

Ein weiterer Grund für einen transienten siRNA-Effekt kann die Halbwertszeit eines Proteins sein. Es erscheint sehr schwer, ein Gen für ein Protein mit einer sehr langen Halbwertszeit mit

transienter Transfektion von siRNAs zu inhibieren [26]. Dieses Problem kann mit dem Einsatz von Zellen mit Tetrazyklin-induzierter Genexpression umgangen werden, wie Scherr *et al.* [68] mit bcr-abl-induzierbaren TonB-Zellen zeigten.

Erneute Elektroporation könnte den siRNA-Effekt steigern, ist aber mit erhöhter Zelltoxizität verbunden und wurde daher nicht durchgeführt. Deutlich wurde diese Toxizität der Elektroporation bei der Transfektion von BV173-Zellen, die eine geringere Teilungsrate als Ba/F3-Zellen besitzen. Sie reagierten sehr sensibel auf die Elektroporation, obwohl bei diesen Versuchen wesentlich mildere Bedingungen als bei den Ba/F3-b2a2-Zellen gewählt wurden. Die BV173-Zellen ohne Elektroporation zeigten im Vergleich zu den Zellen mit GL2-siRNA-Elektroporation nach der Transfektion eine 5- bis 10-fach höhere Zellzahl. Bei der Elektroporation von Plasmid-exprimierten shRNAs gegenüber chemisch synthetisierten siRNAs war die Transfektionseffizienz noch geringer und die Toxizität noch höher. Dies lässt sich an den Proliferationskurven von Ba/F3-b2a2-Zellen nach Elektroporation mit und ohne Plasmid zeigen. Die Zellen ohne Plasmid proliferieren sehr viel schneller als die Zellen nach Elektroporation mit Plasmiden. Für jede Zelllinie müssen deshalb die geeignete Transfektionsmethode evaluiert und die jeweiligen Bedingungen optimiert werden.

Es wurde beobachtet, dass Plasmid-exprimierte shRNAs gegenüber chemisch synthetisierten siRNAs eine verzögerte siRNA-Wirkung haben. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass die shRNA erst nach Integration des Plasmids von den Zellen selbst exprimiert werden muss. Deshalb wurde bei den chemisch synthetisierten siRNAs nach 24h und bei den plasmidexprimierten shRNAs erst nach 48h Stunden die GFP-Reduktion im HeLa-Reportersystem gemessen.

Vorteile der plasmidexprimierten shRNAs sind die einfache Plasmidpräparation und die Möglichkeit der stabilen shRNA-Expression. Letzteres ist durch Selektion der positiven, shRNA-exprimierenden Zellen über Antibiotikaresistenz-Marker möglich. Um eine Zelllinie mit homogener shRNA-Expression zu etablieren, müssen Einzelzellklone kultiviert und analysiert werden. Dazu müssen die Zellen sehr lange in Kultur bleiben, was ein limitierender Faktor für z.B. primäre Zellen ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde die stabile shRNA-Expression nicht über die Etablierung von Zelllinien nach shRNA-Plasmid-Transfektion, sondern durch retroviralen Gentransfer erreicht.

4.3.2 Stabile bcr-abl-Suppression mit siRNAs

Lentiviraler Gentransfer

Der lentivirale Vektor dcH1-shRNA-SR mit VSV.G-Pseudotypisierung der Viren ist ein geeignetes System zur Untersuchung von shRNA-Effekten. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit in verschiedenen Zellarten und für verschiedene shRNA-Konstrukte über ein korrelierendes Fluoreszenzproteinsignal erfolgreich gezeigt werden.

Die lentivirale Transduktion des b2a2-3-21nt-shRNA-Vektors in die Ba/F3-Zelllinien zeigte einen deutlichen Verlust der Zellen mit hoher Rotfluoreszenzintensität innerhalb der ersten Woche nach Transduktion. Scherr *et al.* [68] führten parallel lentivirale Transduktionen zur shRNA-vermittelten Reduktion der b3a2-mRNA durch. In beiden Arbeiten zeigten die transduzierten Zellen zu Beginn stark variierende Rotfluoreszenzintensitäten, während nach drei Wochen nur noch Zellen mit geringer Rotfluoreszenzintensität detektiert werden konnten. Daraus lässt sich schließen, dass das Absterben der Zellen erreicht wird, wenn ausreichend Virus integriert wurde. Weiterführende Experimente zeigten, dass zur Degradation von K562-Zellen mit einer b3a2-shRNA drei oder mehr Virusintegrationen in das Wirtsgenom benötigt wurden [68]. Auch die Ergebnisse der quantitativen RT-PCR zur Analyse der mRNA-Reduktion spiegeln die Zellproliferation wieder. Bis Tag drei ist die Zellproliferation verzögert. Fünf Tage nach Transduktion zeigten die Zellen mit Lentiviren gegen b2a2 jedoch wieder den gleichen Wachstumsverlauf wie die Kontrollzellen. Dies liegt daran dass vier Tage nach der Transduktion die b2a2-mRNA-Reduktion nur noch 10-20 % beträgt.

Die shRNA-Virustransduktion in humane Meg01, K562 und U937-Zellen führte wie in den Ba/F3-Zellen zu einem Verlust stark fluoreszierender Zellen, allerdings zeitlich verzögert. Auch in diesen Zellen kann ein stabiler shRNA-Effekt angenommen werden. In Untersuchungen der Zellproliferation von K562- und U937-Zellen wurde eine Abhängigkeit von der effektiven Transduktionsrate beobachtet. Bei den U937-Zellen kam es bei hohen Transduktionsraten zu einem kompletten Absterben der Zellpopulation, während bei geringerer Virustransduktion die Zellproliferation nur um 50% gesenkt wurde. Die K562-Zellen zeigten nach hoher Virustransduktion, normiert auf die GL4-Kontrollzellen, einen stärkeren Abfall der Rotfluoreszenzintensität im Vergleich zu den weniger stark transduzierten Zellen.

Die Ergebnisse zeigen somit eindeutig einen shRNA-Effekt, da für eine starke Reduktion der mRNA mehrere shRNA-Sequenzen ins Genom integriert sein müssen und die Zellen durch eine starke shRNA-Expression absterben. Dass dieser Effekt jedoch auch in b2a2-negativen

Zellen auftrat ist nur durch die Reduktion einer oder mehrerer zusätzlicher mRNAs erklärbar. Die b2a2-3-21nt-shRNA ist also nicht mono-spezifisch.

Bei den U937-Zellen konnte ein grösseres Ausmaß der Zellproliferationsverzögerung und eine signifikantere Intensitätsabnahme der Rotfluoreszenz als bei den K562-Zellen beobachtet werden. Da nicht geklärt werden konnte, welche Proteinreduktion für diese Beobachtungen verantwortlich ist, müssen entweder verschiedene Zielstrukturen in beiden Zelllinien diskutiert werden, oder angenommen werden, dass die Funktion und Regulation der Zielstruktur in den Zelllinien verschieden ist.

Onkoretroviraler Gentransfer

Experimente mit einem onkoretroviralen b2a2-3-21nt-shRNA-exprimierenden Vektor konnten weniger effizient einen stabilen shRNA-Effekt zeigen. Es wurde eine ecotrope Verpackung zur Transduktion von murinen Zellen und als Transgen pBabepuro gewählt, das keinen Fluoreszenzmarker enthielt. Die Virusintegrationen in die Zelle konnten somit nur mit einer aufwändigeren PCR-Reaktion überprüft werden. Bei den Experimenten mit lentiviralen Vektoren wurde gezeigt, dass die shRNA-induzierte Veränderung der Zellproliferation in Ba/F3-b2a2-Zellen bis vier Tage nach Transduktion zu sehen und IL-3-unabhängig war. Demzufolge hätte auch bei den onkoretroviralen Versuchen die Messung der Zellproliferation gleich einen Tag nach Transduktion parallel zur Puromycinselektion begonnen werden müssen. Unter Selektionsbedingungen kann jedoch nicht unterschieden werden, ob Zellen durch Mangel an Resistenzgen bzw. Virusintegration oder an der Wirkung der ausreichend integrierten Virus-shRNA sterben. Daher wurde der Zellkultur IL-3 zugeführt, das das Absterben der effektiv transfizierten Zellen verhindern sollte [114]. Nach vollständiger Selektion (nach 10 bis 14 Tagen) und gleichzeitigem IL-3-Entzug wurde dann die Messung durchgeführt mit dem zunächst überraschenden Ergebnis, dass keine Verminderung der Zellproliferation beobachtet werden konnte. Dies lässt sich aber dadurch erklären, dass die IL-3-Gabe das Absterben nicht verhindern konnte, da die shRNA noch weitere, nicht durch IL-3 hemmbare, Effekte hatte.

In den *Real Time*-RT-PCR-Experimenten mit lentiviralem Gentransfer konnte zwei Tage nach der Transduktion eine effektive Reduktion der b2a2-mRNA in Ba/F3-b2a2-Zellen gezeigt werden. Bei den retroviralen Versuchen wurden Proben zur RNA-Quantifizierung vier Tage nach der Transduktion entnommen. Erst nach nach Akkumulation des shRNA-Effektes durch mehrere, in kurzen Zeitabständen aufeinanderfolgende Virustransduktionen konnte eine Reduktion der b2a2-mRNA detektiert werden.

Andere Forschergruppen verwendeten ebenfalls retrovirale Vektoren mit Puromycinresistenz zur stabilen shRNA-Expression. Devroe *et al.* [53] konnten erfolgreich die Reduktion einer humanen Kinase im Western-Blot zeigen. Brummelkamp *et al.* [156] verwendeten den pRETRO-Super-Vektor mit Puromycinresistenz und zeigten eine stabile Inhibition der Expression des onkogenen K-RAS in humanen Tumorzellen.

Barton *et al.* [54] zeigten sowohl die p53-Reduktion im Western-Blot als auch den funktionellen Verlust von p53 in der Zellantwort auf DNA-Brüche. Sie verwendeten einen retroviralen Vektor mit dem humanem CD4-Gen als Marker und zeigten die direkte Korrelation der p53-Reduktion und der CD4-Expression. So konnten sie bestätigen, dass der shRNA-Effekt in Zellen dosisabhängig ist.

Demzufolge sind retrovirale Vektoren mit verschiedenen Selektionsgenen generell geeignet, um shRNAs in Zellen stabil zu exprimieren und mRNA-Inhibitionen zu untersuchen. Im Fall der b2a2-mRNA-Reduktion durch die auch auf andere Transkripte wirkende b2a2-3-21nt-shRNA hätte die Verwendung eines retroviralen Fluoreszenzprotein-exprimierenden Vektors oder einer anderen b2a2-negativen Zelllinie zu aufschlussreicheren Ergebnissen geführt.

4.3.3 Selektion effizienter siRNAs

Beurteilung von Kriterien für eine effiziente siRNA

Da mit der bcr-abl-mRNA ein Fusionstranskript inhibiert werden sollte, stand bei der Auswahl der siRNA-Sequenzen die Gruppierung um den Bruchpunkt im Vordergrund. Idealerweise sollte die siRNA-Sequenz zu gleichen Teilen bcr und abl tangieren, um eine zu große Sequenzübereinstimmung mit einer der Wildtypsequenzen allein zu vermeiden. Die Abbildung 53 zeigt die Anordnung der gewählten siRNAs um den Bruchpunkt.

Eine weitere umfangreiche Studie mit der Untersuchung von 62 Zielstrukturen gab vier ähnliche Kriterien für eine effektive siRNA an [158]. Werden die folgenden Sequenzbedingungen in einer siRNA eingehalten, induziert man ein hoch effektives Gene-silencing in Säugerzellen: (i) ein A/U-Basenpaar am 5'-Ende des Antisense-Stranges; (ii) ein G/C-Basenpaar am 5'-Ende des Sense-Stranges; (iii) mindestens fünf A/U-Basenpaare im letzten Drittel des 5'-Endes des Antisense-Stranges; und (iv) die Abwesenheit einer G/C-Abfolge von mehr als neun Nukleotiden Länge. Die Studie zeigte, dass siRNAs mit all diesen Eigenschaften eine Reduktion von 70-95% der Firefly-Luciferase-Aktivität in Zelllinien von vier verschiedenen Organismen (Mensch, Maus, Hamster, Insekten) erzielten. Nach diesen Kriterien wurden die eigenen siRNAs erneut bewertet, wobei allerdings keine der genannten siRNAs gegen die b2a2-Variante des bcr-abl-Gens alle diese vier Kriterien erfüllte. Zwar beginnen die siRNAs b2a2-1, -2, -3 und -4 mit einem G/C-Basenpaar, aber nur zwei davon (b2a2-2 und -4) enden auf ein A/U-Basenpaar. Davon besitzt die b2a2-4-siRNA vier der erforderlichen A/U-Basenpaare innerhalb der ersten sieben Basenpaare am 5'-Ende des Antisense-Stranges, die b2a2-2-siRNA nur drei von mindestens fünf.

Nach Reynolds *et al.* [157] wird die effektivste anti-b2a2-siRNA, b2a2-3-21nt, mit null Punkten bewertet. Nach den Kriterien zu urteilen, müsste diese siRNA mit sechs G/C-Basenpaarungen am 3'-Ende des Sense-Stranges völlig ineffektiv sein. Die b2a2-2-siRNA erhielt sieben Punkte. Hier wären experimentell hohe Effizienzen zu erwarten. Jedoch erzielte diese Struktur, von pSuper als shRNA exprimiert, im Reportersystem nur eine Reduktion des GFP auf 56 %. Li *et al.* [67] konnten mit dieser siRNA ebenfalls keine Reduktion des bcr-abl-Proteins sowie keine veränderten Wachstumskurven von b2a2-positiven Meg01-Zellen messen. Als Ursache der fehlenden Effizienz diskutierten sie die Zugänglichkeit der mRNA sowie die si/shRNA-Struktur.

Auch bei der b2a2-1C-shRNA, bei der durch Mutagenese am 3'-Ende des Sense-Stranges eine Basenfehlpaarung eingeführt wurde, nahm trotz höherer Punktzahl die Effizienz im Vergleich zu der ursprünglichen b2a2-1-shRNA ab.

In verschiedenen siRNA-Konstrukten konnte keine Übereinstimmung zwischen den theoretisch zu erwartenden und den experimentell bestimmten Effizienzen gefunden werden.

Die Kriterien nach Reynolds *et al.* [157] und Ui-Tei *et al.* [158] wurden mit chemisch synthetisierten siRNAs erstellt und können möglicherweise nicht direkt auf die shRNA-Expression übertragen werden, da hier noch die Prozessierung durch das Dicer-Enzym und die Vektorkonstruktion entscheidend ist. Weitere wichtige Kriterien für die Effektivität einer siRNA können die Bindung RNA-assoziiierter Proteine an die mRNA, die subzelluläre

Lokalisation, die Halbwertszeit oder aber die Sekundär- und Tertiärstruktur der mRNA sein [26].

Der Einfluss von Strukturmerkmalen auf die Effizienz einer siRNA

Mit Computerprogrammen können RNA-Sekundärstrukturvorhersagen mit wenig Aufwand getroffen werden. Zusätzlich ist bereits bei asODN bekannt, dass die Zugänglichkeit der mRNA-Strukturen entscheidend für die Effektivität ist. Aus diesen Gründen wurde die Effizienz der siRNAs in Abhängigkeit von der RNA-Sekundärstruktur untersucht.

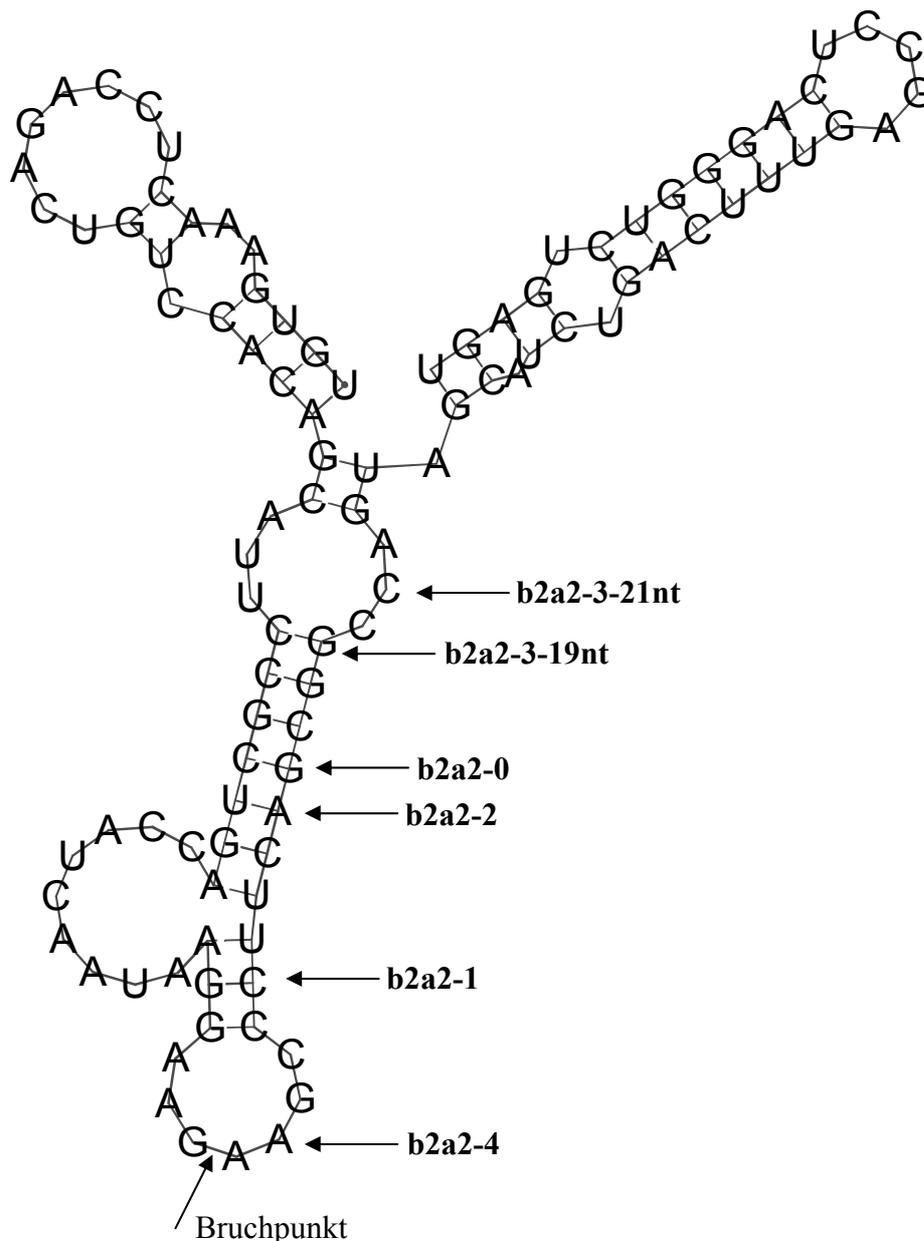


Abb. 54: Strukturvorhersage für die b2a2-mRNA (100nt). Die Pfeile markieren das 5'-Ende des Antisense-Stranges der jeweiligen shRNA.

Bereits in früheren Studien wurde gezeigt, dass eine hohe siRNA-Effizienz von lokalen Strukturmerkmalen der Ziel-mRNA beeinflusst wird [34; 159; 160]. Es wurden ähnliche Reduktionen der Ziel-mRNA durch positionsabhängige asODN und siRNAs festgestellt [160]. Die Zugänglichkeit von mRNA-Abschnitten für asODNs und die Aktivität der siRNAs kann mit theoretischen und experimentellen Untersuchungen beurteilt werden [51;161].

Um die mRNA-Strukturmerkmale mit den Effizienzen der in dieser Arbeit verwendeten siRNAs vergleichen zu können, wurde eine theoretische Strukturvorhersage für einen 100nt langen Ausschnitt der b2a2-mRNA um die Bruchpunktregion getroffen, siehe Abb. 54.

Im folgenden Abschnitt werden die Punkte nach Reynolds *et al.* [157] der verschiedenen shRNAs, die experimentell bestimmte Effizienz und die mRNA-Sekundärstruktur verglichen. Die b2a2-2-shRNA war mit sieben Punkten nach Reynolds *et al.* [157] mittelmäßig effizient. Hier bindet das 5'-Ende des Antisense-Stranges in einer basengepaarten mRNA-Region. Auch die wenig effektiven siRNAs b2a2-0 und b2a2-1 mit mittelmäßiger Punktzahl lagerten sich in doppelsträngigen RNA-Bereichen an.

Ein erheblicher Unterschied konnte bei den Effizienzen der b2a2-3-siRNAs beobachtet werden, obwohl sie mit keinem bzw. einem Punkt bewertet wurden. Das 5'-Ende des Antisense-Stranges der b2a2-3-19nt-siRNA bindet in einem doppelsträngigen RNA-Bereich und führt zu einer geringen Reduktionseffizienz (30%). Der Antisense-Strang der b2a2-3-siRNA-21nt, die eine starke Reduktion der Zielstruktur verursacht (67%), bindet dagegen um zwei Nukleotide versetzt in einem einzelsträngigen Bereich.

Demzufolge liegt die Hypothese nahe, dass sich das 5'-Ende des Antisense-Stranges einer siRNA nach Entwindung der siRNA durch den RISC-Komplex bevorzugt an einen einzelsträngigen mRNA-Bereich bindet. Tatsächlich zeigt auch eine Studie nach Kretschmer-Kazemi Far *et al.* [161], dass sich das 5'-Ende einer hocheffizienten siRNA an einen großen einzelsträngigen Bereich der ICAM-1-mRNA anlagerte. In Untersuchungen von Holen *et al.* [34] wurden zwei siRNAs mit mittelmäßiger und geringer Effizienz beschrieben, die an eine mRNA-Region des Gewebefaktors (TF) mit starker Doppelstrangausprägung binden.

Diese Daten bestätigen, dass der Antisense-Strang einer siRNA bevorzugt an einzelsträngig vorliegende Ziel-RNA bindet. Bei Doppelstrangbereichen muss der Antisense-Strang mit der bereits bestehenden Bindung konkurrieren.

Auch der Vergleich der b3a2-RNA-100nt-Sekundärstruktur mit den Sequenzen der b3a2-1- und b3a2-4 siRNA korreliert mit der nach Scherr *et al.* [68] bestimmten hohen Effizienz. Die siRNAs binden in einzelsträngigen Bereichen der mRNA.

Demnach konnte in allen Vergleichen von siRNA-Sequenzen mit der RNA-Sekundärstruktur gezeigt werden, dass die 5'-Enden der Antisense-Stränge von effizienten siRNAs in einzelsträngigen RNA-Regionen binden, während weniger effiziente siRNAs sich an doppelsträngigen Bereichen anlagern.

Effektivität von siRNAs mit unterschiedlicher Länge

In weiteren Untersuchungen wurde der Einfluss der Länge einer siRNA auf ihre Effektivität untersucht. Eine 19nt lange shRNA gegen die b3a2-mRNA (b3a2-4) zeigte eine hohe Effizienz mit 90% Reduktion des EGFP nach Kotransfektion mit dem pcDNA3.1-sb3a2-EGFP-Plasmid in HeLa-Zellen (Daten nicht gezeigt). Die gleiche shRNA-Sequenz, um ein bzw. drei Nukleotide gekürzt (18nt, 16nt), zeigte eine deutliche Verringerung der EGFP-Reduktion. Fraglich ist, ob eine bestimmte siRNA-Nukleotidzahl für die effiziente mRNA-Spaltung notwendig ist, oder ob die verringerte Effizienz an der veränderten Sequenz festhält. Die 18nt-shRNA besitzt einen GC-Basengehalt von unter 30%, womit die um 50% geringere Effektivität erklärbar wäre. Die N16-shRNA zeigte keine Reduktion der Ziel-mRNA mehr.

Eine Forschungsarbeit zur Reduktion des Fusionsproteins EWS/Fli-1 zeigte mit einer effektiven siRNA eine Reduktion der mRNA um 88 %. Diese siRNA-Sequenz war in 17nt komplementär zur Fli-1-Sequenz. Die Fli-1-mRNA wurde mit einer Restreduktionseffizienz von 20 % inhibiert. Nach Einführen von zwei Mutationen in die siRNA-Sequenz konnte keine mRNA-Reduktion mehr gezeigt werden [162]. Wilda *et al.* [39] zeigten noch mit einer Übereinstimmung einer anti-bcr-abl-siRNA von 17nt mit der b3a2-mRNA eine effektive mRNA- und Proteinreduktion in K562-Zellen.

Demnach sollte eine siRNA mit mindestens 17-19nt zur Zielsequenz komplementär sein, um eine Reduktion erzielen zu können. Sicherlich ist es von verschiedenen Faktoren wie z.B. Sequenzbeschaffenheit und mRNA-Sekundärstruktur abhängig, ob 17, 19 oder auch 21nt für eine effektive Reduktion benötigt werden. Die Verwendung von 19nt langen [149] bzw. 21nt langen siRNAs [51] zur effektiven mRNA-Degradation beruht auf der Beobachtung der nach Spaltung nativer dsRNA durch das Dicer-Enzym entstehenden siRNA-Fragmentlängen [163].

Erhöhung der Effizienz einer shRNA durch Basenfehlpaarung

Eine weitere Möglichkeit, die Effizienz einer siRNA zu erhöhen, wurde in Experimenten von Schwarz *et al.* [30] untersucht. Nach den Erkenntnissen dieser Publikation wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, die Effizienz der b2a2-1-shRNA (in pSuper als Haarnadelstruktur kloniert) durch Einführen einer Basenfehlpaarung am 3'-Ende des Sense-

Stranges zu erhöhen. Dabei wurde eine A/G- statt einer C/G-Paarung erzeugt. Die neue shRNA b2a2-1C besaß allerdings eine noch geringere Effizienz als die Ursprungs-shRNA b2a2-1. Sicherlich können die Ergebnisse mit siRNAs nicht direkt auf *short hairpin*-Strukturen übertragen werden. Der große Unterschied in der Applikation von siRNAs als zwei separate Stränge (Sense und Antisense) und der Expression von siRNAs aus *hairpin*-RNA ist die Abhängigkeit der shRNAs vom Vektor und von der Prozessierung durch die Dicer-RNase. Eventuell wurde durch die Basenfehlpaarung der Ring (*Loop*) um ein oder zwei Nukleotide verlängert und durch die Spaltung des Dicer-Enzyms die siRNA verkürzt, wodurch die geringere siRNA-Effizienz resultierte.

Das sowohl die Sequenz, als auch die Länge und die Struktur des *Loops* für die Effizienz einer shRNA entscheidend ist, konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden [52; 164].

4.3.4 Selektion spezifischer siRNAs

Die Suche nach identischen Sequenzen mit Hilfe von Sequenzdatenbanken ist wichtig, um mit einer siRNA gezielt nur ein Gen zu inhibieren. Bei dem b2a2-Fusionsgen sollte die siRNA mittig die Bruchpunktregion umfassen, um spezifische Reduktionen zu erhalten. Es wurde ein elektronischer Sequenzvergleich mit den experimentell untersuchten siRNAs durchgeführt, bei dem für die effektive b2a2-3-siRNA große Übereinstimmungen mit anderen murinen und humanen Genen gefunden wurden.

Im murinen Zellsystem gibt es ein G-bindendes Protein Gna-rs1, das mit 18nt mit beiden b2a2-3-siRNAs übereinstimmt. Die genaue Funktion des G-bindenden Proteins ist nicht bekannt. Jedoch sind G-Proteine essenziell in intrazellulären Signalwegen, bei der Organisation des Cytoskeletts sowie für Zellwachstum und -entwicklung [90]. Demzufolge ist ein Zellsterben nach Inhibition eines G-bindenden Proteins nicht unwahrscheinlich. Alle Versuche mit den shRNAs b2a2-3, sowohl die Elektroporation von Plasmiden als auch die virale Transduktion in murine Zellen, zeigten ein Zellsterben unabhängig von BCR-Abl oder IL-3. Diese Beobachtung spricht für siRNA-Effekte auf weitere Zielstrukturen, da eine BCR-Abl-abhängige Verringerung des Zellwachstums durch IL-3-Substitution aufgehoben wird. Die unspezifische Wirkung konnte nach Virustransduktion mit der b2a2-3-21nt-shRNA in Ba/F3-Wildtyp-Zellen und NIH3T3-Zellen bestätigt werden. Obwohl diese kein BCR-Abl exprimieren, wurde ein Absterben der stark fluoreszierenden und somit ausreichend shRNA-exprimierenden Zellen beobachtet.

Im humanen Zellsystem stimmte die b2a2-3-siRNA-Sequenz zu 100 % mit der Sequenz des zellulären abl-Gens überein. Da in b2a2-negativen Zellen ebenfalls ein siRNA-vermittelter Zelltod beobachtet wurde, liegt die Vermutung der Inhibition von c-Abl nahe. Beobachtungen von nukleärem c-Abl führten zu der Annahme, dass dem Protein eine Wachstums-fördernde Funktion während der S-Phase zufällt [165]. Andererseits haben z.B. Fibroblasten von abl^{-/-}-Mäusen keine definierten Defekte in der S-Phase und es sind keine Beispiele für Gene bekannt, deren Transkription von c-Abl abhängig ist. Nukleäres c-Abl vermittelt in normalen Zellen die Apoptose durch Induktion eines Wachstumsstops in der G1-Phase [103; 104]. Auch die Behandlung von Zellen mit asODN gegen c-Abl [167] zeigt einen beschleunigten Eintritt der Zellen in die S-Phase und eine verkürzte G1-Phase. Daraus wurde die physiologische Funktion von c-Abl als Inhibition des G1-S-Überganges definiert.

Allerdings wurde in der Einleitung beschrieben, dass Abl-defiziente Mäuse einen defekten hämatopoetischen Phänotyp aufweisen und ihre Lebenszeit verkürzt ist. Somit muss zum einen das untersuchte System zum anderen die Vollständigkeit der Abl-Degradation diskutiert werden. Eventuell kommt es wie beschrieben in abl^{-/-}-Fibroblasten nicht zu S-Phase-Defekten, dagegen aber in hämatopoetischen Zellen. Da in der vorliegenden Arbeit nur ein Absterben von Zellen mit hoher Rotfluoreszenzintensität (als Maß für die Virusintegration) beobachtet wurde, liegt nahe, dass ein vollständiges Ausschalten der abl-mRNA einen anderen Phänotyp hervorruft als unvollständige Degradationen. Auch die Sekundärstrukturvorhersage der 100nt-langen abl-RNA weist auf eine hohe Effizienz der b2a2-3-siRNA hin, da hier das 5'-Ende des Antisense-Stranges an einen einzelgepaarten Bereich bindet.

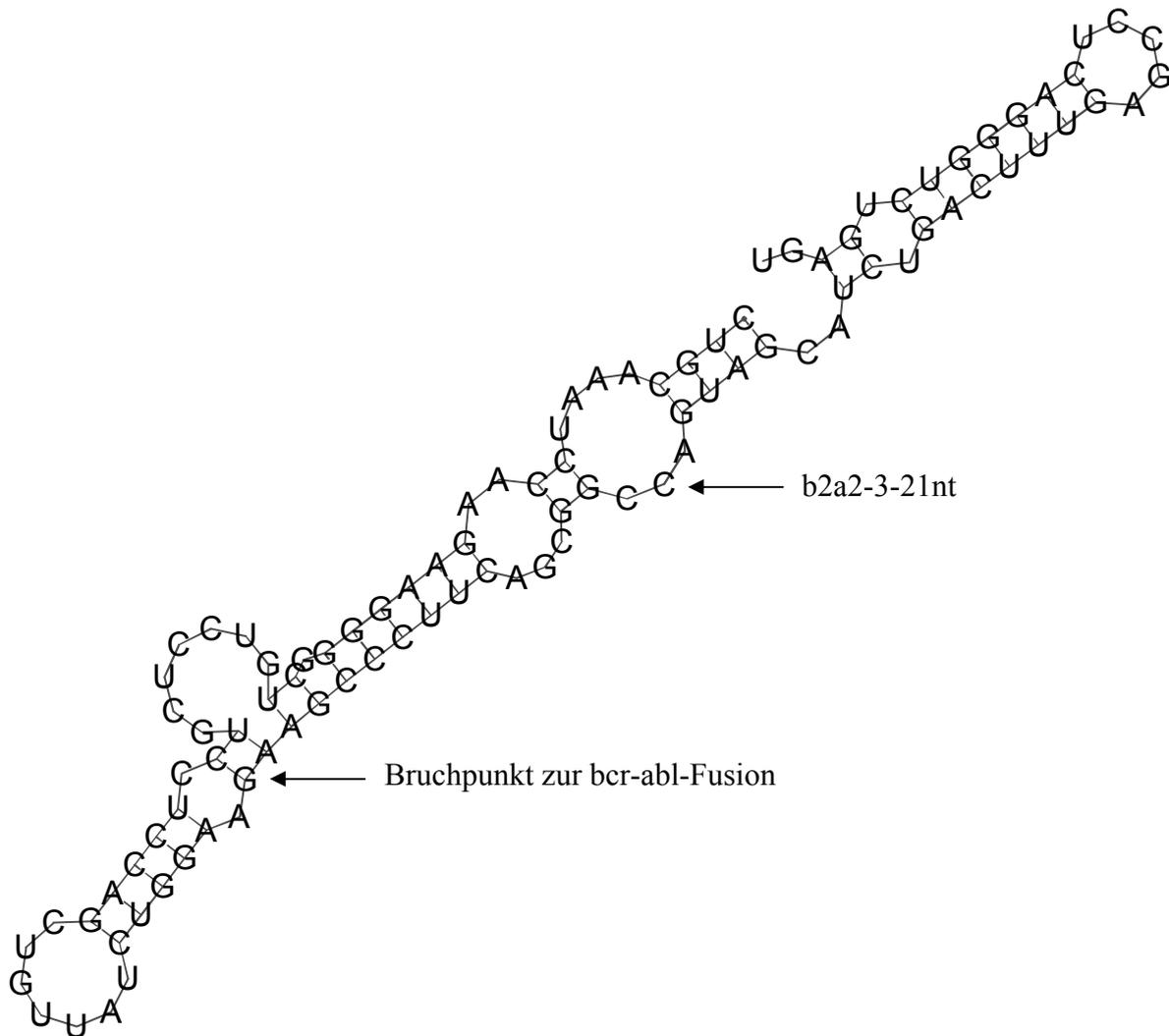


Abb. 55: Sekundärstrukturanalyse der 100nt-abl-RNA. Die Pfeile markieren die Anlagerung des 5'-Endes des Antisense-Stranges der b2a2-3-21nt-shRNA und den Bruchpunkt, an dem bcr fusioniert wird.

Goldman und Melo [109] beschreiben die veränderte physiologische Funktion des c-Abl im Vergleich zu BCR-Abl mit einer unkontrollierten Aktivität des c-Abl. c-Abl ist an vielschichtigen Signaltransduktionswegen beteiligt und steuert in der Zelle sowohl Proliferations- und Adhäsionsvorgänge als auch Apoptose. Durch Fusion mit dem bcr-Gen kommt es zu einem Verlust der Abl-Cap-Region und der Dimerisierungsdomäne und somit zur Aktivierung der Abl-SH1-Domäne. Diese Aktivierung resultiert in unkontrolliert ablaufenden Signaltransduktionswegen und einem anormalen Phänotyp, der andere Funktionen in der Proliferation, Adhäsion und Apoptose von Zellen übernimmt [109]. Die Zelle folgt den überwiegenden Signalen. So kann auch durch den Verlust von c-Abl, eventuell durch siRNA-Degradation, nach einem längeren Zeitraum durch bisher noch unbekannte Mechanismen Apoptose ausgelöst werden.

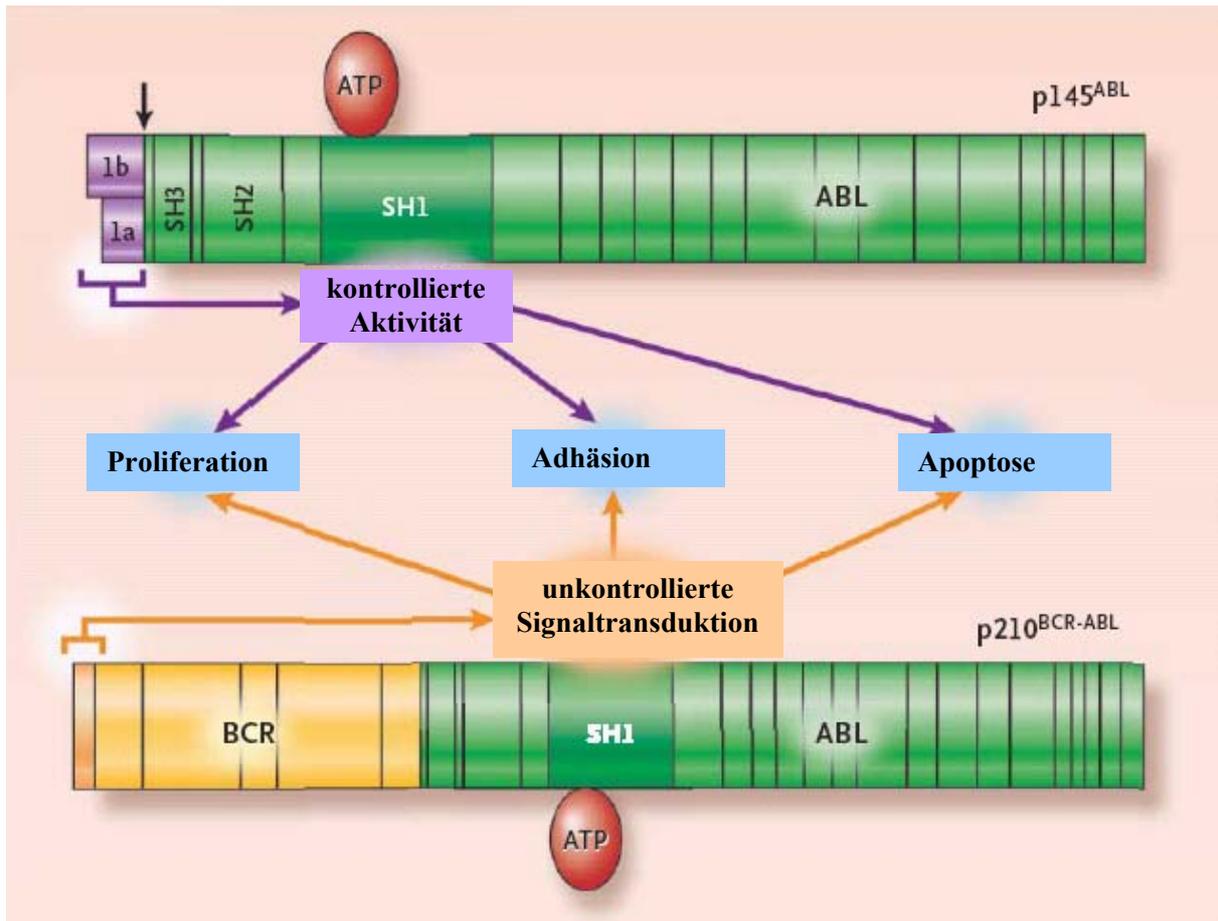


Abb. 56: Physiologische Regulation des c-Abl-Proteins und Dysregulation von BCR-Abl durch zelluläre Schlüsselfunktionen wie Proliferation, Apoptose und Adhäsion [109].

Es kann derzeit nicht endgültig geklärt werden, ob die Inhibition des c-Abl mit anti-c-Abl-siRNAs in b3a2-positiven oder BCR-Abl-negativen Zellen ca. eine Woche nach Virustransduktion zum Zelltod führt. Darum muss auch in Betracht gezogen werden, dass die b2a2-3-siRNA-Sequenz mit weiteren humanen mRNA-Sequenzen übereinstimmt. Eventuell führt auch der Verlust eines anderen Proteins allein oder zusätzlich zu c-Abl die Zellen in die Apoptose.

Eine unspezifische Reduktion der bcr-mRNA wurde in Experimenten mit der b3a2-4-shRNA gezeigt. Diese ist in allen Nukleotiden sowohl mit der b3a2-mRNA als auch mit der bcr-mRNA komplementär. Es konnte eine Reduktion der humanen bcr-mRNA beobachtet werden. Murines BCR blieb dagegen unbeeinflusst [168].

Da das Genprodukt BCR viele funktionelle Domänen mit verschiedenen Homologien u.a. zu G-Proteinen aufweist (siehe 1.6.1), fällt ihm eine wichtige Position in der Zellzyklusregulation zu. Nach Versuchsergebnissen mit BCR-„knock out“-Mäusen wird BCR mit der Regulation der Rac-vermittelten Produktion von Superoxid während der Reifung und

Aktivierung von Neutrophilen in Verbindung gebracht [169]. Danach ist ein Zellsterben unter BCR-Reduktion wahrscheinlich.

Allerdings war diese b3a2-4-shRNA, wie bereits in einem früheren Abschnitt beschrieben, sehr effektiv. Die Betrachtung der Sequenz-Kriterien für eine effektive siRNA (sieben Punkte nach Reynolds *et al.* [157], alle Kriterien nach Ui-Tei *et al.* [158] erfüllt) und der RNA-Sekundärstruktur (5'-Ende des Antisense-Stranges bindet an ssRNA) erklärt diese hohe Effizienz. Dennoch wurde eine mit der b3a2-4-shRNA vergleichbare shRNA für die b2a2-Zielstruktur (b2a2-4) nicht untersucht, um nicht eine unspezifische Reduktion des BCR hervorzurufen.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit einer siRNA effektiv RNAi gegen die bcr-abl-Variante b2a2 erzeugt werden. Dazu wurden verschiedene Zelllinien und Methoden verwendet und sowohl transiente, als auch stabile shRNA-Expression gezeigt. Trotz vielseitiger Forschungsarbeiten kann jedoch die Effektivität und Spezifität einer siRNA nicht theoretisch exakt vorhergesagt werden, sodass beide Komponenten experimentell untersucht werden müssen. Bei der bcr-abl-Variante b2a2 konnte keine siRNA gefunden werden, die sowohl hohe Effektivität als auch hohe Spezifität aufweist. Bei spezifischen siRNAs, die zu gleichen Anteilen den bcr- und den abl-Abschnitt umspannen, bindet das 5'-Ende des Antisense-Stranges an einen doppelsträngigen Bereich der mRNA. Somit sind diese siRNAs nur wenig effektiv. Trifft die Wahl der siRNA-Sequenz einen angrenzenden einzelsträngigen RNA-Bereich mit hoher siRNA-Effizienz so sind die siRNAs auch gegen das Wildtyp-abl- oder das Wildtyp-bcr-Gen gerichtet. Demzufolge scheint es nicht möglich zu sein, gegen die bcr-abl-Variante b2a2 mit der RNAi-Technologie einen geeigneten Inhibitor zu finden. Stattdessen müssen andere Methoden zur Untersuchung der effektiven Suppression dieser bcr-abl-Variante eingesetzt werden. Bei Nicht-Fusionsgenen ist es sicherlich leichter eine effektive siRNA zu finden, da mehr Auswahlmöglichkeiten in den Sequenzen bestehen.

Ausblick

In weiterführenden Untersuchungen sollte geklärt werden, welche mRNA-Strukturmerkmale für eine effektive siRNA-Bindung entscheidend sind und dies in einer umfangreichen Studie belegt werden. Mit den daraus resultierenden Ergebnissen können sich möglicherweise effiziente siRNAs erfolgreich konstruieren lassen.

Hinsichtlich neuer Therapieansätze der CML muß weiter nach verschiedenen Möglichkeiten der BCR-Abl-Suppression gesucht werden. Es kann versucht werden, weitere effektive siRNAs zu konstruieren, die nicht direkt das BCR-Abl-Protein angreifen, sondern eine Myeloproliferation von Zellen durch Degradation von Interaktionspartnern wie z.B. STAT5 oder Gab-2 verhindern [111; 171]. Auch mit Ribozymen könnte versucht werden, eine mRNA-Reduktion zu erreichen. Mit anderen Methoden, wie z.B. der Phage Display-Technologie können spezifisch an BCR-Abl-Proteindomänen bindende Peptide selektioniert werden, so z.B. gegen das Kernexportsignal des Abl-Proteins. Dieser Ansatz scheint erfolgversprechend zu sein, da nach einer induzierten nukleären Translokation und anschließender Inhibierung des NES das BCR-Abl-Protein die Apoptose induziert [170].

5 Literatur

- [1] Chastain M, Tinoco I Jr. Structural elements in RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1991;41:131-77. Review.
- [2] Turner DH, Sugimoto N. RNA structure prediction. *Annu Rev Biophys Biophys Chem.* 1988;17:167-92.
- [3] Ehresmann C, Baudin F, Mougel M, Romby P, Ebel JP, Ehresmann B. Probing the structure of RNAs in solution. *Nucleic Acids Res.* 1987 Nov 25;15(22):9109-28. Review.
- [4] Larsson SL, Nygard O. Proposed secondary structure of eukaryote specific expansion segment 15 in 28S rRNA from mice, rats, and rabbits. *Biochemistry.* 2001 Mar 13;40(10):3222-31.
- [5] Isel C, Ehresmann C, Keith G, Ehresmann B, Marquet R. Initiation of reverse transcription of HIV-1: secondary structure of the HIV-1 RNA/tRNA(3Lys) (template/primer). *J Mol Biol.* 1995 Mar 24;247(2):236-50.
- [6] Baudin F, Marquet R, Isel C, Darlix JL, Ehresmann B, Ehresmann C. Functional sites in the 5' region of human immunodeficiency virus type 1 RNA form defined structural domains. *J Mol Biol.* 1993 Jan 20;229(2):382-97.
- [7] Hahner S, Ludemann HC, Kirpekar F, Nordhoff E, Roepstorff P, Galla HJ, Hillenkamp F. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI) of endonuclease digests of RNA. *Nucleic Acids Res.* 1997 May 15;25(10):1957-64.
- [8] Burd CG, Dreyfuss G. Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science.* 1994 Jul 29;265(5172):615-21. Review.
- [9] Xavier KA, Eder PS, Giordano T. RNA as a drug target: methods for biophysical characterization and screening. *Trends Biotechnol.* 2000 Aug;18(8):349-56. Review.
- [10] Hwang S, Tamilarasu N, Ryan K, Huq I, Richter S, Still WC, Rana TM. Inhibition of gene expression in human cells through small molecule-RNA interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Nov 9;96(23):12997-3002.
- [11] Laird-Offringa IA, Belasco JG. Analysis of RNA-binding proteins by in vitro genetic selection: identification of an amino acid residue important for locking U1A onto its RNA target. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Dec 5;92(25):11859-63.
- [12] Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science.* 1985 Jun 14;228(4705):1315-7.
- [13] Laird-Offringa IA, Belasco JG. In vitro genetic analysis of RNA-binding proteins using phage display libraries. *Methods Enzymol.* 1996;267:149-68.
- [14] Pustowka A, Dietz J, Ferner J, Baumann M, Landersz M, Konigs C, Schwalbe H, Dietrich U. Identification of peptide ligands for target RNA structures derived from the HIV-1 packaging signal psi by screening phage-displayed peptide libraries. *Chembiochem.* 2003 Oct 6;4(10):1093-7.
- [15] Dromey JA, Weenink SM, Peters GH, Endl J, Tighe PJ, Todd I, Christie MR. Mapping of epitopes for autoantibodies to the type 1 diabetes autoantigen IA-2 by peptide phage display and molecular modeling: overlap of antibody and T cell determinants. *J Immunol.* 2004 Apr 1;172(7):4084-90.
- [16] Bitto E, McKay DB. Binding of phage-display-selected peptides to the periplasmic chaperone protein SurA mimics binding of unfolded outer membrane proteins. *FEBS Lett.* 2004 Jun 18;568(1-3):94-8.
- [17] An P, Lei H, Zhang J, Song S, He L, Jin G, Liu X, Wu J, Meng L, Liu M, Shou C. Suppression of tumor growth and metastasis by a VEGFR-1 antagonizing peptide identified from a phage display library. *Int J Cancer.* 2004 Aug 20;111(2):165-73.
- [18] Curiel TJ, Morris C, Brumlik M, Landry SJ, Finstad K, Nelson A, Joshi V, Hawkins C, Alarez X, Lackner A, Mohamadzadeh M. Peptides Identified through Phage Display Direct Immunogenic Antigen to Dendritic Cells. *J Immunol.* 2004 Jun 15;172(12):7425-31.
- [19] Higgins LM, Lambkin I, Donnelly G, Byrne D, Wilson C, Dee J, Smith M, O'Mahony DJ. In vivo phage display to identify M cell-targeting ligands. *Pharm Res.* 2004 Apr;21(4):695-705.
- [20] Plasterk RH. RNA silencing: the genome's immune system. *Science.* 2002, 296:1263-65
- [21] Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 1998, 391:806-811
- [22] Kennerdell JR, Carthew RW. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell.* 1998 Dec 23;95(7):1017-26.
- [23] Kennerdell JR, Carthew RW. Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nat Biotechnol.* 2000 Aug;18(8):896-8.

- [24] Scherr M, Morgan MA, Eder M. Gene silencing mediated by small interfering RNAs in mammalian cells. *Curr Med Chem*. 2003 Feb;10(3):245-56. Review.
- [25] Dorsett Y, Tuschl T. siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2004 Apr;3(4):318-29. Review.
- [26] Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Jun;4(6):457-67. Review.
- [27] Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*. 2003 Oct 17;115(2):209-16. Erratum in: *Cell*. 2003 Nov 14;115(4):505.
- [28] Paddison PJ, Hannon GJ. RNA interference: the new somatic cell genetics? *Cancer Cell*. 2002 Jul;2(1):17-23.
- [29] Elbashir SM, Harborth J, Weber K, Tuschl T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods*. 2002 Feb;26(2):199-213.
- [30] Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 2003 Oct 17;115(2):199-208.
- [31] Donze O, Picard D. RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res*. 2002 May 15;30(10):e46.
- [32] Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Apr 30;99(9):6047-52. Epub 2002 Apr 23.
- [33] Sohail M, Doran G, Riedemann J, Macaulay V, Southern EM. A simple and cost-effective method for producing small interfering RNAs with high efficacy. *Nucleic Acids Res*. 2003 Apr 1;31(7):e38.
- [34] Holen T, Amarzguoui M, Wiiger MT, Babaie E, Prydz H. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res*. 2002 Apr 15;30(8):1757-66.
- [35] Czauderna F, Fechtner M, Aygun H, Arnold W, Klippel A, Giese K, Kaufmann J. Functional studies of the PI(3)-kinase signalling pathway employing synthetic and expressed siRNA. *Nucleic Acids Res*. 2003 Jan 15;31(2):670-82.
- [36] Nur-E-Kamal A, Tsai-Kun L, Zhang A, Qi H, Hars E, Liu LF. Single-stranded DNA induces ATM/p53-dependent DNA damage and apoptotic signals. *J Biol Chem*. 2003 Jan 21 [epub ahead of print]
- [37] Novina CD, Murray MF, Dykxhoorn DM, Beresford PJ, Riess J, Lee SK, Collman RG, Lieberman J, Shankar P, Sharp PA. siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med*. 2002 Jul;8(7):681-6.
- [38] Gitlin L, Karelsky S, Andino R. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature*. 2002 Jul 25;418(6896):430-4.
- [39] Wilda M, Fuchs U, Wossmann W, Borkhardt A. Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi). *Oncogene*. 2002 Aug 22;21(37):5716-24.
- [40] Caplen NJ, Zheng Z, Falgout B, Morgan RA. Inhibition of viral gene expression and replication in mosquito cells by dsRNA-triggered RNA Mol Ther. 2002 Aug;6(2):243-51.
- [41] Siegmund D, Hadwiger P, Pfizenmaier K, Vornlocher HP, Wajant H. Selective Inhibition of FLICE-like Inhibitory Protein Expression With Small Interfering RNA Oligonucleotides Is Sufficient to Sensitize Tumor Cells for TRAIL-Induced Apoptosis. *Mol Med*. 2002 Nov;8(11):725-32.
- [42] Usui I, Imamura T, Huang J, Satoh H, Olefsky JM. Cdc42 is a Rho GTPase family member which can mediate insulin signaling to glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*. 2003 Feb 3
- [43] Heidenreich O, Krauter J, Riehle H, Hadwiger P, John M, Heil G, Vornlocher HP, Nordheim A. AML1/MTG8 Oncogene Suppression by Small Interfering RNAs Supports Myeloid Differentiation of t(8;21)-positive Leukemic Cells. *Blood*. 2002 Dec 12
- [44] Scherr M, Battmer K, Winkler T, Heidenreich O, Ganser A, Eder M. Specific inhibition of bcr-abl gene expression by small interfering RNA. *Blood*. 2003 Feb 15;101(4):1566-9.
- [45] Kunath T, Gish G, Lickert H, Jones N, Pawson T, Rossant J. Transgenic RNA interference in ES cell-derived embryos recapitulates a genetic null phenotype. *Nat Biotechnol*. 2003 May;21(5):559-61.
- [46] Lewis DL, Hagstrom JE, Loomis AG, Wolff JA, Herweijer H. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat Genet*. 2002 Sep;32(1):107-8.
- [47] Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, Lieberman J. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med*. 2003 Feb 10
- [48] Xia H, Mao Q, Paulson HL, Davidson BL. siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol*. 2002 Oct;20(10):1006-10.
- [49] Paul CP, Good PD, Winer I, Engelke DR. Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat Biotechnol*. 2002 May;20(5):505-8.
- [50] Miyagishi M, Taira K. Development and application of siRNA expression vector. *Nucleic Acids Res Suppl*. 2002;(2):113-4.

- [51] Lee NS, Dohjima T, Bauer G, Li H, Li MJ, Ehsani A, Salvaterra P, Rossi J. Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat Biotechnol.* 2002 May;20(5):500-5.
- [52] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science.* 2002 Apr 19;296(5567):550-3.
- [53] Devroe E, Silver PA. Retrovirus-delivered siRNA. *BMC Biotechnol.* 2002 Aug 28;2(1):15.
- [54] Barton GM, Medzhitov R. Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Nov 12;99(23):14943-5.
- [55] Shen C, Buck AK, Liu X, Winkler M, Reske SN. Gene silencing by adenovirus-delivered siRNA. *FEBS Lett.* 2003 Mar 27;539(1-3):111-4.
- [56] Abbas-Terki T, Blanco-Bose W, Deglon N, Pralong W, Aebischer P. Lentiviral-mediated RNA interference. *Hum Gene Ther.* 2002 Dec 10;13(18):2197-201.
- [57] Tiscornia G, Singer O, Ikawa M, Verma IM. A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jan 27
- [58] Qin XF, An DS, Chen IS, Baltimore D. Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jan 7;100(1):183-8.
- [59] Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, Rooney DL, Ihrig MM, McManus MT, Gertler FB, Scott ML, Van Parijs L. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet.* 2003 Mar;33(3):401-6. Epub 2003 Feb 18.
- [60] Schomber T, Kalberer CP, Wodnar-Filipowicz A, Skoda RC. Gene silencing by lentivirus-mediated delivery of siRNA in human CD34+ cells. *Blood.* 2004 Jun 15;103(12):4511-3.
- [61] Hemann MT, Fridman JS, Zilfou JT, Hernando E, Paddison PJ, Cordon-Cardo C, Hannon GJ, Lowe SW. An epi-allelic series of p53 hypomorphs created by stable RNAi produces distinct tumor phenotypes in vivo. *Nat Genet.* 2003 Mar;33(3):396-400.
- [62] Scherr M, Battmer K, Ganser A, Eder M. Modulation of gene expression by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA. *Cell Cycle.* 2003 May-Jun;2(3):251-7.
- [63] Banerjee A, Li MJ, Bauer G, Remling L, Lee NS, Rossi J, Akkina R. Inhibition of HIV-1 by lentiviral vector-transduced siRNAs in T lymphocytes differentiated in SCID-hu mice and CD34+progenitor cell-derived macrophages. *Mol Ther.* 2003 Jul;8(1):62-71.
- [64] Scherr M, Battmer K, Dallmann I, Ganser A, Eder M. Inhibition of GM-CSF receptor function by stable RNA interference in a NOD/SCID mouse hematopoietic stem cell transplantation model. *Oligonucleotides.* 2003;13(5):353-63.
- [65] Bruno S, Ghiotto F, Fais F, Fagioli M, Luzi L, Pelicci PG, Grossi CE, Ciccone E. The PML gene is not involved in the regulation of MHC class I expression in human cell lines. *Blood.* 2003 May 1;101(9):3514-9.
- [66] Wohlbold L, Van Der Kuip H, Miething C, Vornlocher HP, Knabbe C, Duyster J, Aulitzky WE. Inhibition of bcr-abl gene expression by small interfering RNA sensitizes for imatinib mesylate (STI571). *Blood.* 2003 Sep 15;102(6):2236-9.
- [67] Li MJ, McMahon R, Snyder DS, Yee JK, Rossi JJ. Specific killing of Ph+ chronic myeloid leukemia cells by a lentiviral vector-delivered anti-bcr/abl small hairpin RNA. *Oligonucleotides.* 2003;13(5):401-9.
- [68] Scherr M, Battmer K, Schultheis B, Ganser A, Eder M. Stable RNA interference (RNAi) as an option for anti bcr-abl therapy. *Gene Ther.* 2004 in press
- [69] Ray S, Lu Y, Kaufmann SH, Gustafson WC, Karp JE, Boldogh I, Fields AP, Brasier AR. Genomic mechanisms of p210BCR-ABL signaling: induction of heat shock protein 70 through the GATA response element confers resistance to paclitaxel-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2004 May 21
- [70] Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JI, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science.* 2003 Oct 17;302(5644):415-9. Erratum in: *Science.* 2003 Oct 24;302(5645):568.
- [71] Scherr M, Steinmann D, Eder M. RNA interference (RNAi) in hematology. *Ann Hematol.* 2004 Jan;83(1):1-8.
- [72] Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science.* 1996 Apr 12;272(5259):263-7.

- [73] Scherr M, Eder M. Gene transfer into hematopoietic stem cells using lentiviral vectors. *Curr Gene Ther.* 2002 Feb;2(1):45-55. Review.
- [74] Gröne M. Neue antiretrovirale Substanzen in der HIV-Therapie. *Retrovirus.* 1999; 4: 5
- [75] Miller AD, Miller DG, Garcia JV, Lynch CM. Use of retroviral vectors for gene transfer and expression. *Methods Enzymol.* 1993;217:581-99.
- [76] Miyoshi H, Blomer U, Takahashi M, Gage FH, Verma IM. Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol.* 1998 Oct;72(10):8150-7.
- [77] Demaison C, Parsley K, Brouns G, Scherr M, Battmer K, Kinnon C, Grez M, Thrasher AJ. High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency [correction of imunodeficiency] virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter. *Hum Gene Ther.* 2002 May 1;13(7):803-13.
- [78] Scherr M, Battmer K, Blomer U, Schiedlmeier B, Ganser A, Grez M, Eder M. Lentiviral gene transfer into peripheral blood-derived CD34+ NOD/SCID-repopulating cells. *Blood.* 2002 Jan 15;99(2):709-12.
- [79] Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol.* 1997 Sep;15(9):871-5.
- [80] Morgenstern JP, Land H. Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res.* 1990 Jun 25;18(12):3587-96.
- [81] Cone RD, Mulligan RC. High-efficiency gene transfer into mammalian cells: generation of helper-free recombinant retrovirus with broad mammalian host range. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984 Oct;81(20):6349-53.
- [82] Heisterkamp N, Knoppel E, Groffen J. The first BCR gene intron contains breakpoints in Philadelphia chromosome positive leukemia. *Nucleic Acids Res.* 1988 Nov 11;16(21):10069-81.
- [83] Stam K, Heisterkamp N, Grosveld G, de Klein A, Verma RS, Coleman M, Dosik H, Groffen J. Evidence of a new chimeric bcr/c-abl mRNA in patients with chronic myelocytic leukemia and the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med.* 1985 Dec 5;313(23):1429-33.
- [84] Arlinghaus RB. Multiple BCR-related gene products and their proposed involvement in ligand-induced signal transduction pathways. *Mol Carcinog.* 1992;5(3):171-3.
- [85] Maru Y, Kobayashi T, Tanaka K, Shibuya M. BCR binds to the xeroderma pigmentosum group B protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Jul 5;260(2):309-12.
- [86] Pendergast AM, Muller AJ, Havlik MH, Maru Y, Witte ON. BCR sequences essential for transformation by the BCR-ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner. *Cell.* 1991 Jul 12;66(1):161-71.
- [87] Muller AJ, Pendergast AM, Havlik MH, Puil L, Pawson T, Witte ON. A limited set of SH2 domains binds BCR through a high-affinity phosphotyrosine-independent interaction. *Mol Cell Biol.* 1992 Nov;12(11):5087-93.
- [88] Pendergast AM, Quilliam LA, Cripe LD, Bassing CH, Dai Z, Li N, Batzer A, Rabun KM, Der CJ, Schlessinger J, et al. BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell.* 1993 Oct 8;75(1):175-85.
- [89] McWhirter JR, Galasso DL, Wang JY. A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol Cell Biol.* 1993 Dec;13(12):7587-95.
- [90] Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* 1997 Sep 15;11(18):2295-322. Review.
- [91] Ron D, Zannini M, Lewis M, Wickner RB, Hunt LT, Graziani G, Tronick SR, Aaronson SA, Eva A. A region of proto-dbl essential for its transforming activity shows sequence similarity to a yeast cell cycle gene, CDC24, and the human breakpoint cluster gene, bcr. *New Biol.* 1991 Apr;3(4):372-9.
- [92] Adams JM, Houston H, Allen J, Lints T, Harvey R. The hematopoietically expressed vav proto-oncogene shares homology with the dbl GDP-GTP exchange factor, the bcr gene and a yeast gene (CDC24) involved in cytoskeletal organization. *Oncogene.* 1992 Apr;7(4):611-8.
- [93] Hart MJ, Eva A, Evans T, Aaronson SA, Cerione RA. Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the dbl oncogene product. *Nature.* 1991 Nov 28;354(6351):311-4.
- [94] Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell.* 1992 Aug 7;70(3):389-99.
- [95] Laurent E, Talpaz M, Kantarjian H, Kurzrock R. The BCR gene and philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. *Cancer Res.* 2001 Mar 15;61(6):2343-55. Review.
- [96] Van Etten RA, Jackson PK, Baltimore D, Sanders MC, Matsudaira PT, Janmey PA. The COOH terminus of the c-Abl tyrosine kinase contains distinct F- and G-actin binding domains with bundling activity. *J Cell Biol.* 1994 Feb;124(3):325-40.

- [97] Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000 Nov 15;96(10):3343-56.
- [98] Van Etten RA, Jackson P, Baltimore D. The mouse type IV c-abl gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization. *Cell*. 1989 Aug 25;58(4):669-78.
- [99] Taagepera S, McDonald D, Loeb JE, Whitaker LL, McElroy AK, Wang JY, Hope TJ. Nuclear-cytoplasmic shuttling of C-ABL tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jun 23;95(13):7457-62.
- [100] Daley GQ, Van Etten RA, Jackson PK, Bernards A, Baltimore D. Nonmyristoylated Abl proteins transform a factor-dependent hematopoietic cell line. *Mol Cell Biol*. 1992 Apr;12(4):1864-71.
- [101] Lewis JM, Baskaran R, Taagepera S, Schwartz MA, Wang JY. Integrin regulation of c-Abl tyrosine kinase activity and cytoplasmic-nuclear transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Dec 24;93(26):15174-9.
- [102] Feller SM, Knudsen B, Hanafusa H. c-Abl kinase regulates the protein binding activity of c-Crk. *EMBO J*. 1994 May 15;13(10):2341-51.
- [103] Wen ST, Jackson PK, Van Etten RA. The cytostatic function of c-Abl is controlled by multiple nuclear localization signals and requires the p53 and Rb tumor suppressor gene products. *EMBO J*. 1996 Apr 1;15(7):1583-95.
- [104] Sawyers CL, McLaughlin J, Goga A, Havlik M, Witte O. The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth. *Cell*. 1994 Apr 8;77(1):121-31.
- [105] Van Etten RA. Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl. *Trends Cell Biol*. 1999 May;9(5):179-86. Review.
- [106] Yuan ZM, Utsugisawa T, Huang Y, Ishiko T, Nakada S, Kharbanda S, Weichselbaum R, Kufe D. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase by c-Abl in the genotoxic stress response. *J Biol Chem*. 1997 Sep 19;272(38):23485-8.
- [107] *N Engl J Med*. 2003 Oct 9;349, verschiedene Artikel
- [108] Ganser A. Chronische Myeloische Leukämie. Skript zur Vorlesung Hämatologie
- [109] Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med*. 2003 Oct 9;349(15):1451-64. Review.
- [110] Cahill MA, Janknecht R, Nordheim A. Signalling pathways: jack of all cascades. *Curr Biol*. 1996 Jan 1;6(1):16-9.
- [111] Ilaria RL Jr, Van Etten RA. P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *J Biol Chem*. 1996 Dec 6;271(49):31704-10.;
- [112] Feng J, Witthuhn BA, Matsuda T, Kohlhuber F, Kerr IM, Ihle JN. Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop. *Mol Cell Biol*. 1997 May;17(5):2497-501.
- [113] Xie S, Wang Y, Liu J, Sun T, Wilson MB, Smithgall TE, Arlinghaus RB. Involvement of Jak2 tyrosine phosphorylation in Bcr-Abl transformation. *Oncogene*. 2001 Sep 27;20(43):6188-95.
- [114] Jiang X, Lopez A, Holyoake T, Eaves A, Eaves C. Autocrine production and action of IL-3 and granulocyte colony-stimulating factor in chronic myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Oct 26;96(22):12804-9.
- [115] Sattler M, Salgia R, Okuda K, Uemura N, Durstin MA, Pisick E, Xu G, Li JL, Prasad KV, Griffin JD. The proto-oncogene product p120CBL and the adaptor proteins CRKL and c-CRK link c-ABL, p190BCR/ABL and p210BCR/ABL to the phosphatidylinositol-3' kinase pathway. *Oncogene*. 1996 Feb 15;12(4):839-46.
- [116] Skorski T, Bellacosa A, Nieborowska-Skorska M, Majewski M, Martinez R, Choi JK, Trotta R, Wlodarski P, Perrotti D, Chan TO, Wasik MA, Tsichlis PN, Calabretta B. Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *EMBO J*. 1997 Oct 15;16(20):6151-61.
- [117] del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science*. 1997 Oct 24;278(5338):687-9.
- [118] Skorski T, Kanakaraj P, Nieborowska-Skorska M, Ratajczak MZ, Wen SC, Zon G, Gewirtz AM, Perussia B, Calabretta B. Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. *Blood*. 1995 Jul 15;86(2):726-36.
- [119] Sawyers CL, Callahan W, Witte ON. Dominant negative MYC blocks transformation by ABL oncogenes. *Cell*. 1992 Sep 18;70(6):901-10.

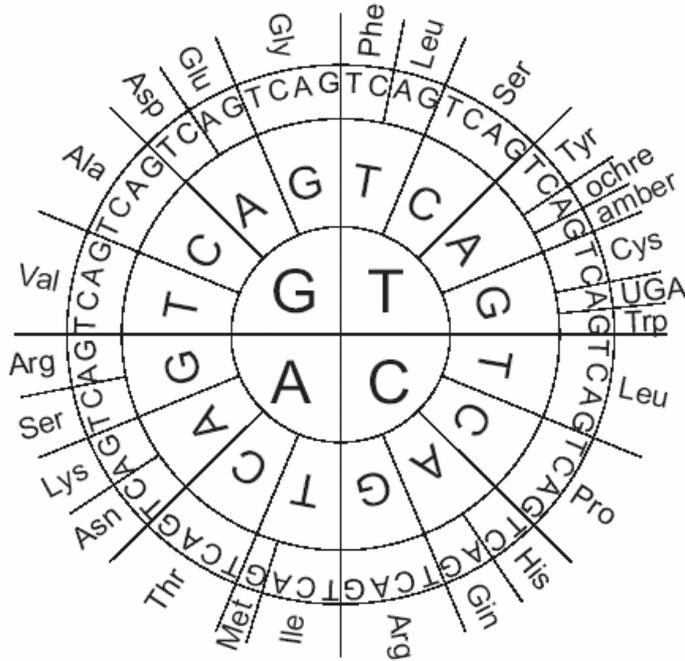
- [120] Zhao RC, McIvor RS, Griffin JD, Verfaillie CM. Gene therapy for chronic myelogenous leukemia (CML): a retroviral vector that renders hematopoietic progenitors methotrexate-resistant and CML progenitors functionally normal and nontumorigenic in vivo. *Blood*. 1997 Dec 15;90(12):4687-98.
- [121] Skourides PA, Perera SA, Ren R. Polarized distribution of Bcr-Abl in migrating myeloid cells and colocalization of Bcr-Abl and its target proteins. *Oncogene*. 1999 Feb 4;18(5):1165-76.
- [122] Gordon MY, Dowding CR, Riley GP, Goldman JM, Greaves MF. Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature*. 1987 Jul 23-29;328(6128):342-4.
- [123] Nieborowska-Skorska M, Wasik MA, Slupianek A, Salomoni P, Kitamura T, Calabretta B, Skorski T. 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*. 1999 Apr 19;189(8):1229-42.
- [124] Sirard C, Laneuville P, Dick JE. Expression of bcr-abl abrogates factor-dependent growth of human hematopoietic M07E cells by an autocrine mechanism. *Blood*. 1994 Mar 15;83(6):1575-85.
- [125] Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science*. 1990 Feb 16;247(4944):824-30.
- [126] Klucher KM, Lopez DV, Daley GQ. Secondary mutation maintains the transformed state in BaF3 cells with inducible BCR/ABL expression. *Blood*. 1998 May 15;91(10):3927-34.
- [127] Pear WS, Miller JP, Xu L, Pui JC, Soffer B, Quackenbush RC, Pendergast AM, Bronson R, Aster JC, Scott ML, Baltimore D. Efficient and rapid induction of a chronic myelogenous leukemia-like myeloproliferative disease in mice receiving P210 bcr/abl-transduced bone marrow. *Blood*. 1998 Nov 15;92(10):3780-92.
- [128] Zhang X, Ren R. Bcr-Abl efficiently induces a myeloproliferative disease and production of excess interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in mice: a novel model for chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 1998 Nov 15;92(10):3829-40.
- [129] Daley GQ, Baltimore D. Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210bcr/abl protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Dec;85(23):9312-6.
- [130] Li S, Gillessen S, Tomasson MH, Dranoff G, Gilliland DG, Van Etten RA. Interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor are not required for induction of chronic myeloid leukemia-like myeloproliferative disease in mice by BCR/ABL. *Blood*. 2001 Mar 1;97(5):1442-50.
- [131] Holyoake TL, Jiang X, Jorgensen HG, Graham S, Alcorn MJ, Laird C, Eaves AC, Eaves CJ. Primitive quiescent leukemic cells from patients with chronic myeloid leukemia spontaneously initiate factor-independent growth in vitro in association with up-regulation of expression of interleukin-3. *Blood*. 2001 Feb 1;97(3):720-8.
- [132] Skorski T, Nieborowska-Skorska M, Wlodarski P, Perrotti D, Hoser G, Kawiak J, Majewski M, Christensen L, Iozzo RV, Calabretta B. Treatment of Philadelphia leukemia in severe combined immunodeficient mice by combination of cyclophosphamide and bcr/abl antisense oligodeoxynucleotides. *J Natl Cancer Inst*. 1997 Jan 15;89(2):124-33.
- [133] de Fabritis P, Amadori S, Petti MC, Mancini M, Montefusco E, Picardi A, Geiser T, Campbell K, Calabretta B, Mandelli F. In vitro purging with BCR-ABL antisense oligodeoxynucleotides does not prevent haematologic reconstitution after autologous bone marrow transplantation. *Leukemia*. 1995 Apr;9(4):662-4.
- [134] Boutin JA. Tyrosine protein kinase inhibition and cancer. *Int J Biochem*. 1994 Oct-Nov;26(10-11):1203-26.
- [135] Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Muller M, Regenass U, Lydon NB. Selective inhibition of the platelet-derived growth factor signal transduction pathway by a protein-tyrosine kinase inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Mar 28;92(7):2558-62.
- [136] Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Muller M, Druker BJ, Lydon NB. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res*. 1996 Jan 1;56(1):100-4.
- [137] Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*. 1996 May;2(5):561-6.
- [138] Carroll M, Ohno-Jones S, Tamura S, Buchdunger E, Zimmermann J, Lydon NB, Gilliland DG, Druker BJ. CGP 57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing BCR-ABL, TEL-ABL, and TEL-PDGFR fusion proteins. *Blood*. 1997 Dec 15;90(12):4947-52.

- [139] Wolff NC, Ilaria RL Jr. Establishment of a murine model for therapy-treated chronic myelogenous leukemia using the tyrosine kinase inhibitor STI571. *Blood*. 2001 Nov 1;98(9):2808-16.
- [140] Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR/ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2001 Apr 5;344(14):1031-7.
- [141] Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F, Schiffer C, Gambacorti-Passerini C, Niederwieser D, Resta D, Capdeville R, Zoellner U, Talpaz M, Druker B, Goldman J, O'Brien SG, Russell N, Fischer T, Ottmann O, Cony-Makhoul P, Facon T, Stone R, Miller C, Tallman M, Brown R, Schuster M, Loughran T, Gratwohl A, Mandelli F, Saglio G, Lazzarino M, Russo D, Baccarani M, Morra E; International STI571 CML Study Group. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med*. 2002 Feb 28;346(9):645-52.
- [142] Sawyers CL, Hochhaus A, Feldman E, Goldman JM, Miller CB, Ottmann OG, Schiffer CA, Talpaz M, Guilhot F, Deininger MW, Fischer T, O'Brien SG, Stone RM, Gambacorti-Passerini CB, Russell NH, Reiffers JJ, Shea TC, Chapuis B, Coutre S, Tura S, Morra E, Larson RA, Saven A, Peschel C, Gratwohl A, Mandelli F, Ben-Am M, Gathmann I, Capdeville R, Paquette RL, Druker BJ. Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood*. 2002 May 15;99(10):3530-9.
- [143] Ottmann OG, Druker BJ, Sawyers CL, Goldman JM, Reiffers J, Silver RT, Tura S, Fischer T, Deininger MW, Schiffer CA, Baccarani M, Gratwohl A, Hochhaus A, Hoelzer D, Fernandes-Reese S, Gathmann I, Capdeville R, O'Brien SG. A phase 2 study of imatinib in patients with relapsed or refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoid leukemias. *Blood*. 2002 Sep 15;100(6):1965-71.
- [144] O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, Cornelissen JJ, Fischer T, Hochhaus A, Hughes T, Lechner K, Nielsen JL, Rousselot P, Reiffers J, Saglio G, Shepherd J, Simonsson B, Gratwohl A, Goldman JM, Kantarjian H, Taylor K, Verhoef G, Bolton AE, Capdeville R, Druker BJ; IRIS Investigators. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2003 Mar 13;348(11):994-1004.
- [145] Guilhot F, Gardembas M, Rousselot P, Tulliez M, Vigier M, Buzyn A, Rigal-Huguet F, Legros L, Michallet M, Berthou C, Najman A, Maloisel F, Mahon FX, Facon T, Berthaud P, Guilhot J; CML French Group. Imatinib in combination with cytarabine for the treatment of Philadelphia-positive chronic myelogenous leukemia chronic-phase patients: rationale and design of phase I/II trials. *Semin Hematol*. 2003 Apr;40(2 Suppl 2):92-7. Review.
- [146] Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, Sawyers CL. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR/ABL gene mutation or amplification. *Science*. 2001 Aug 3;293(5531):876-80.
- [147] Weisberg E, Griffin JD. Mechanism of resistance to the ABL tyrosine kinase inhibitor STI571 in BCR/ABL-transformed hematopoietic cell lines. *Blood*. 2000 Jun 1;95(11):3498-505.
- [148] Roumiantsev S, Shah NP, Gorre ME, Nicoll J, Brasher BB, Sawyers CL, Van Etten RA. Clinical resistance to the kinase inhibitor STI-571 in chronic myeloid leukemia by mutation of Tyr-253 in the Abl kinase domain P-loop. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Aug 6;99(16):10700-5.
- [149] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001 May 24;411(6836):494-8.
- [150] Ory DS, Neugeboren BA, Mulligan RC. A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Oct 15;93(21):11400-6.
- [151] Sambrook J., F.E.F.u.M.T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- [152] Ausubel F.M., B.R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. and Struhl K. (1995) *Current protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc.
- [153] Hendrix M, Priestley ES, Joyce GF, Wong CH. Direct observation of aminoglycoside-RNA interactions by surface plasmon resonance. *J Am Chem Soc*. 1997 Apr 23;119(16):3641-8.
- [154] Shapiro HM. Multistation multiparameter flow cytometry: a critical review and rationale. *Cytometry*. 1983 Jan;3(4):227-43. Review.
- [155] Jonas G, Hoffmann S, Willbold D. Binding of phage-displayed HIV-1 Tat to TAR RNA in the presence of cyclin T1. *J Biomed Sci*. 2001 Sep;8(5):430-6.
- [156] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell*. 2002 Sep;2(3):243-7.
- [157] Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol*. 2004 Mar;22(3):326-30.

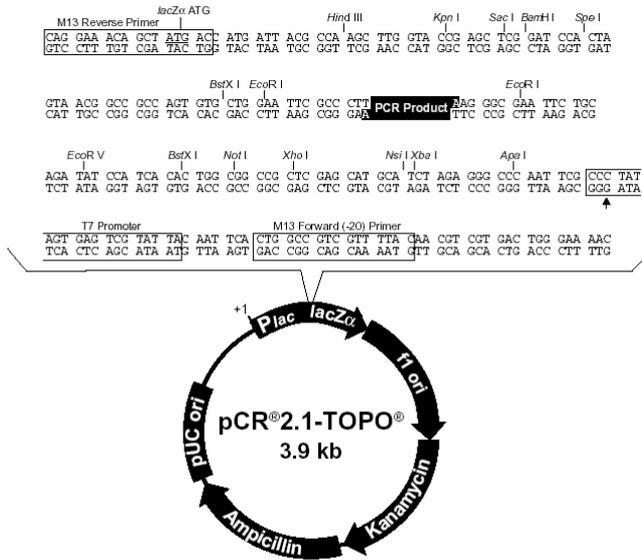
- [158] Ui-Tei K, Naito Y, Takahashi F, Haraguchi T, Ohki-Hamazaki H, Juni A, Ueda R, Saigo K. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Res.* 2004 Feb 09;32(3):936-48.
- [159] Bohula EA, Salisbury AJ, Sohail M, Playford MP, Riedemann J, Southern EM, Macaulay VM. The efficacy of small interfering RNAs targeted to the type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF1R) is influenced by secondary structure in the IGF1R transcript. *J Biol Chem.* 2003 May 2;278(18):15991-7.
- [160] Vickers TA, Koo S, Bennett CF, Crooke ST, Dean NM, Baker BF. Efficient reduction of target RNAs by small interfering RNA and RNase H-dependent antisense agents. A comparative analysis. *J Biol Chem.* 2003 Feb 28;278(9):7108-18.
- [161] Kretschmer-Kazemi Far R, Sczakiel G. The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 2003 Aug 1;31(15):4417-24.
- [162] Dohjima T, Lee NS, Li H, Ohno T, Rossi JJ. Small interfering RNAs expressed from a Pol III promoter suppress the EWS/Fli-1 transcript in an Ewing sarcoma cell line. *Mol Ther.* 2003 Jun;7(6):811-6.
- [163] Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell.* 2000 Mar 31;101(1):25-33.
- [164] Boden D, Pusch O, Silbermann R, Lee F, Tucker L, Ramratnam B. Enhanced gene silencing of HIV-1 specific siRNA using microRNA designed hairpins. *Nucleic Acids Res.* 2004 Feb 13;32(3):1154-8.
- [165] Welch PJ, Wang JY. Abrogation of retinoblastoma protein function by c-Abl through tyrosine kinase-dependent and -independent mechanisms. *Mol Cell Biol.* 1995 Oct;15(10):5542-51.
- [166] Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, Capdeville R, Talpaz M. Activity of a specific inhibitor of the BCR/ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med.* 2001 Apr 5;344(14):1038-42.
- [167] Daniel R, Cai Y, Wong PM, Chung SW. Deregulation of c-abl mediated cell growth after retroviral transfer and expression of antisense sequences. *Oncogene.* 1995 Apr 20;10(8):1607-14.
- [168] M. Scherr, persönliche Mitteilung
- [169] Voncken JW, van Schaick H, Kaartinen V, Deemer K, Coates T, Landing B, Pattengale P, Dorseuil O, Bokoch GM, Groffen J, et al. Increased neutrophil respiratory burst in bcr-null mutants. *Cell.* 1995 Mar 10;80(5):719-28.
- [170] Vigneri P, Wang JY. Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment of BCR-ABL tyrosine kinase. *Nat Med.* 2001 Feb;7(2):228-34.
- [171] Dorsey JF, Cunnick JM, Mane SM, Wu J. Regulation of the Erk2-Elk1 signaling pathway and megakaryocytic differentiation of Bcr-Abl(+) K562 leukemic cells by Gab2. *Blood.* 2002 Feb 15;99(4):1388-97.

Anhang

Genetischer Code und Aminosäurecode

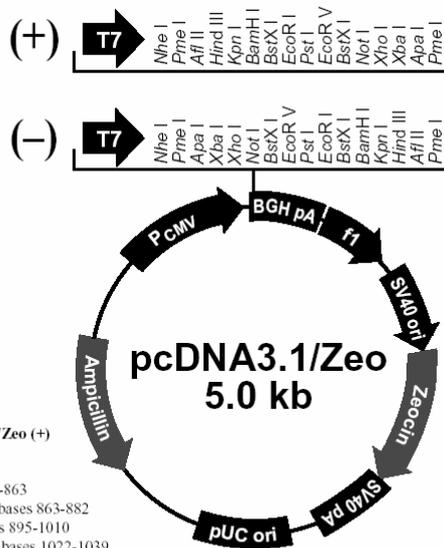


Aminosäure	Drei- buchstaben- code	Ein- buchstaben- code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Aspartat	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamat	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	Z



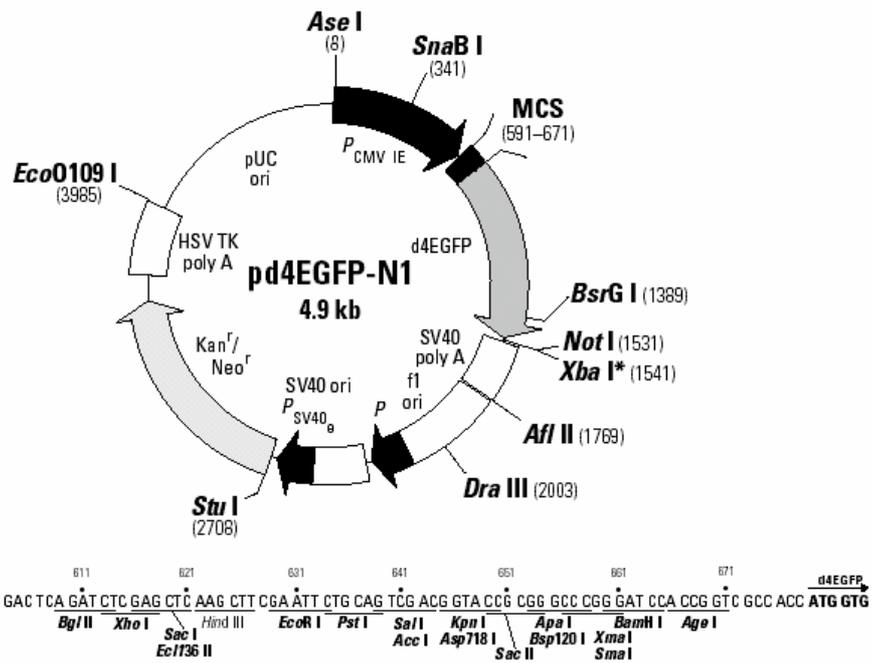
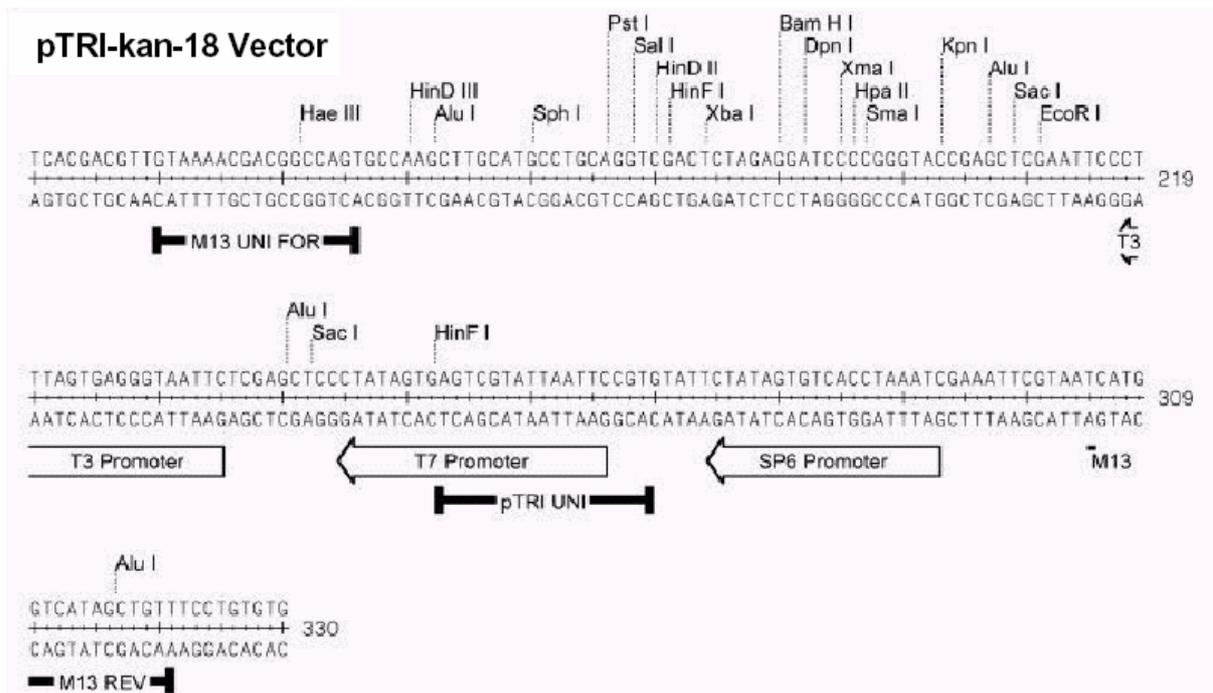
Comments for pCR®2.1-TOPO®
3931 nucleotides

- 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

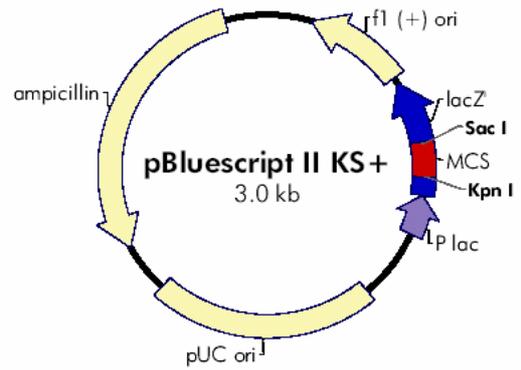


Comments for pcDNA3.1/Zeo (+)
5015 nucleotides

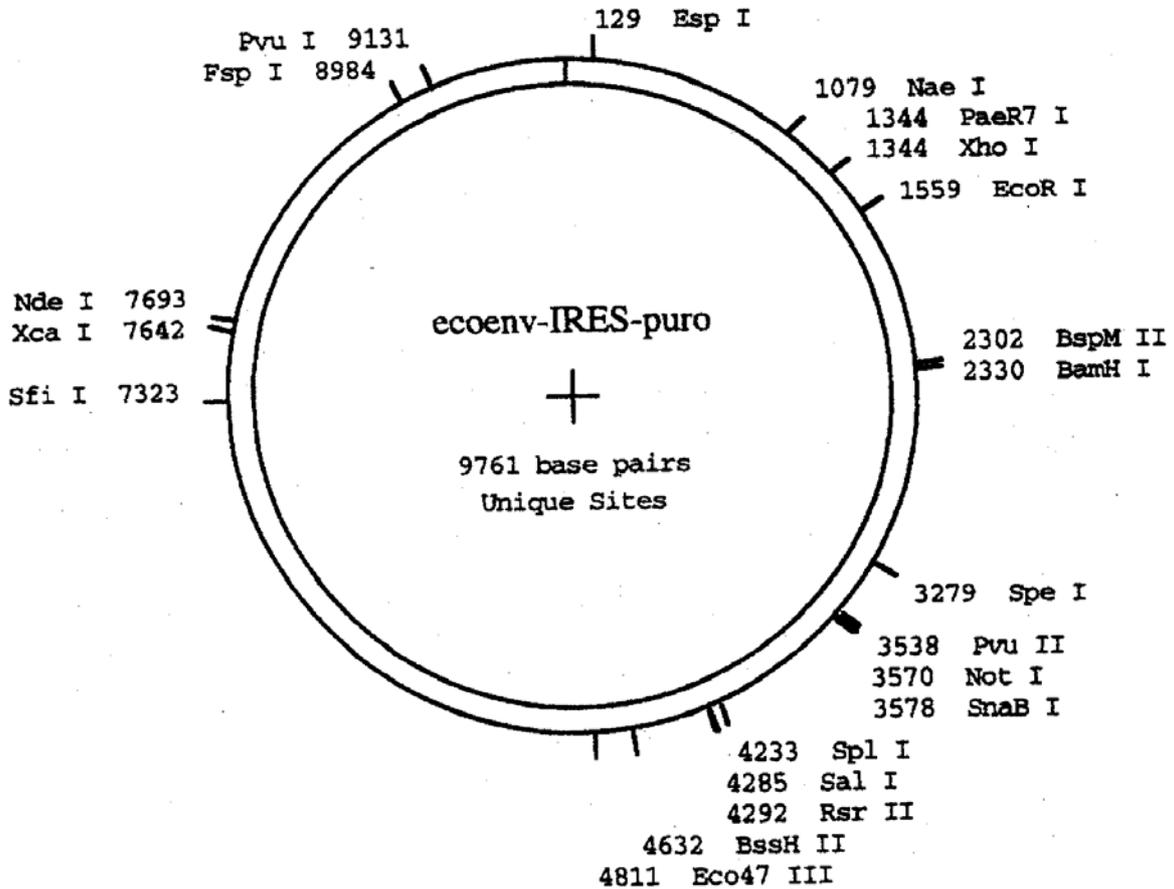
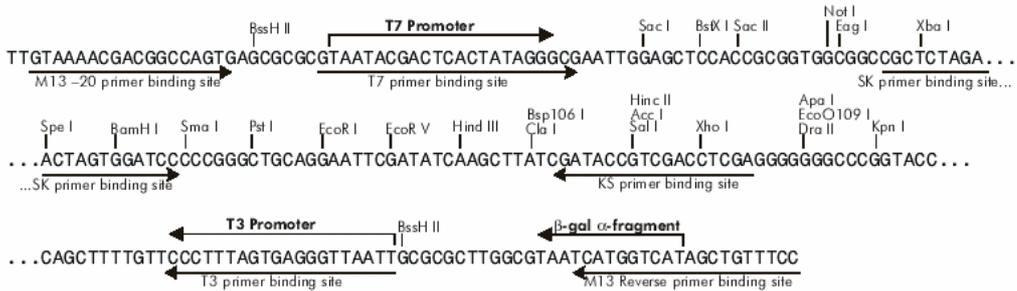
- CMV promoter: bases 209-863
- T7 promoter priming site: bases 863-882
- Multiple cloning site: bases 895-1010
- BGH reverse priming site: bases 1022-1039
- BGH polyadenylation signal: bases 1021-1235
- f1 origin: bases 1298-1711
- SV40 promoter and origin: bases 1776-2101
- EM7 promoter: bases 2117-2183
- Zeocin™ resistance gene: bases 2184-2558
- SV40 polyadenylation: bases 2688-2817
- pUC origin: bases 3201-3874 (C)
- bla promoter: bases 4880-4978 (C)
- Ampicillin (bla) resistance gene: bases 4019-4879 (C)

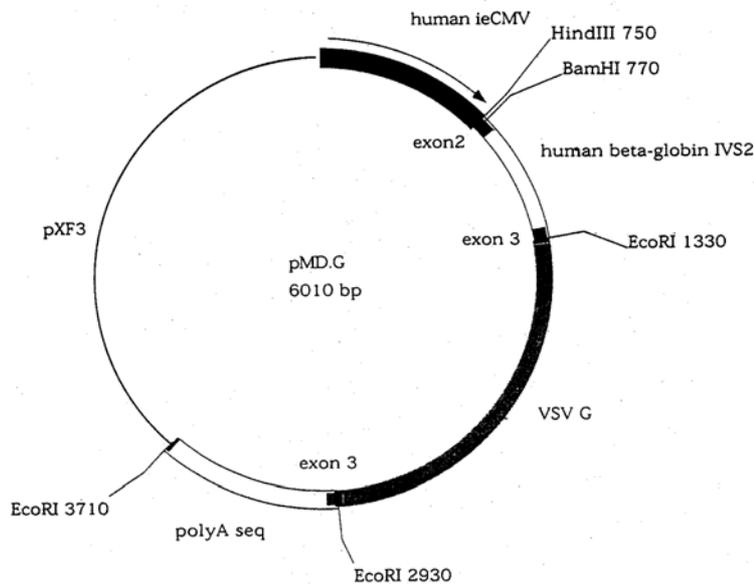
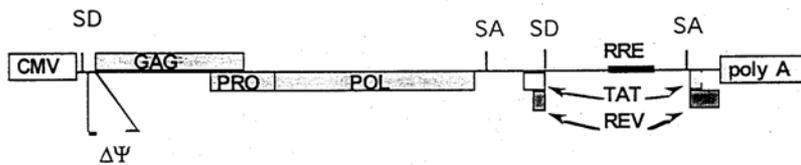
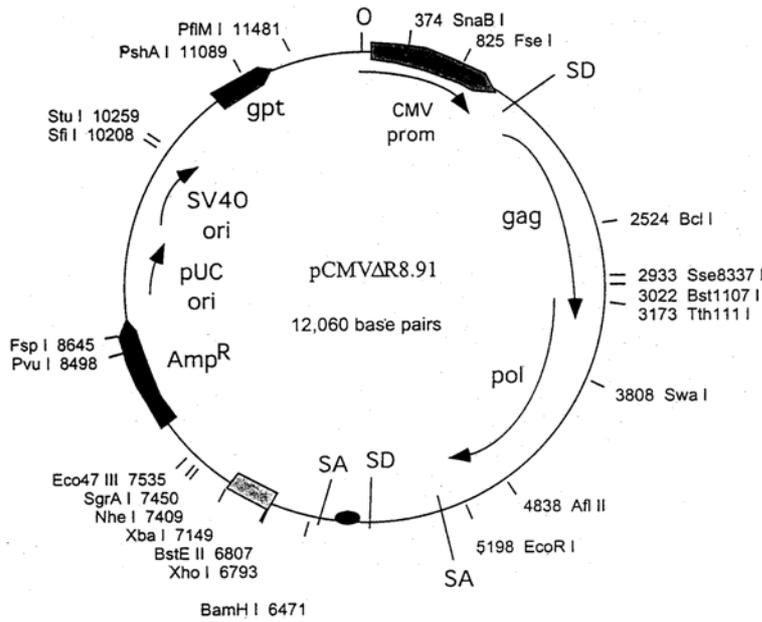


f1 (+) origin 135-441
 β -galactosidase α -fragment 460-816
multiple cloning site 653-760
lac promoter 817-938
pUC origin 1158-1825
ampicillin resistance (*bla*) ORF 1976-2833



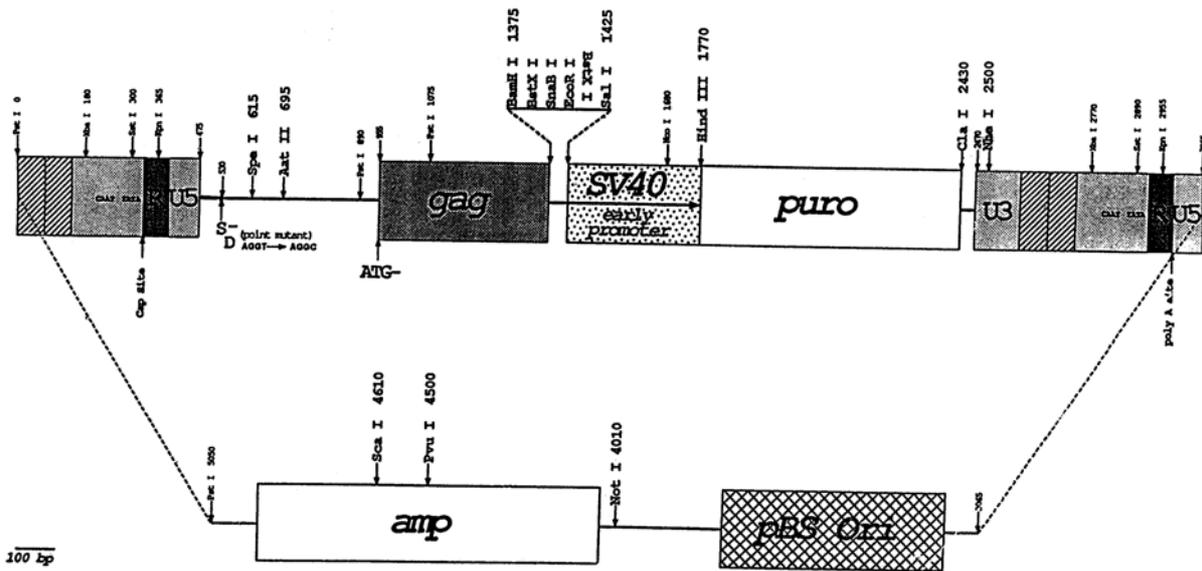
pBluescript II KS (+/-) Multiple Cloning Site Region
(sequence shown 598-826)





Plasmid name: pMD.G
 Plasmid size: 6010 bp
 Constructed by: Daniel Ory (map redrawn by Patrick SALMON)
 Construction date: August 25, 1994
 Comments/References: pXF3 (poison seq minus pBR322, low copy plasm) and hu CMV ie prom from pBC12/CMV/IL2 (B. Cullen, Cell 46, 1986) (pBC12 = pXF3 + SV40 ori). Human beta globin seq (exons 2 and 3, IVS2, polyA) from pucMdBs(R)S (gift M. Sadelain). VSV G from pSVGL.

pBabe Puro (5.1 kb)



100 bp
Bold Print: unique restriction sites
 Regular Print: multiple restriction sites

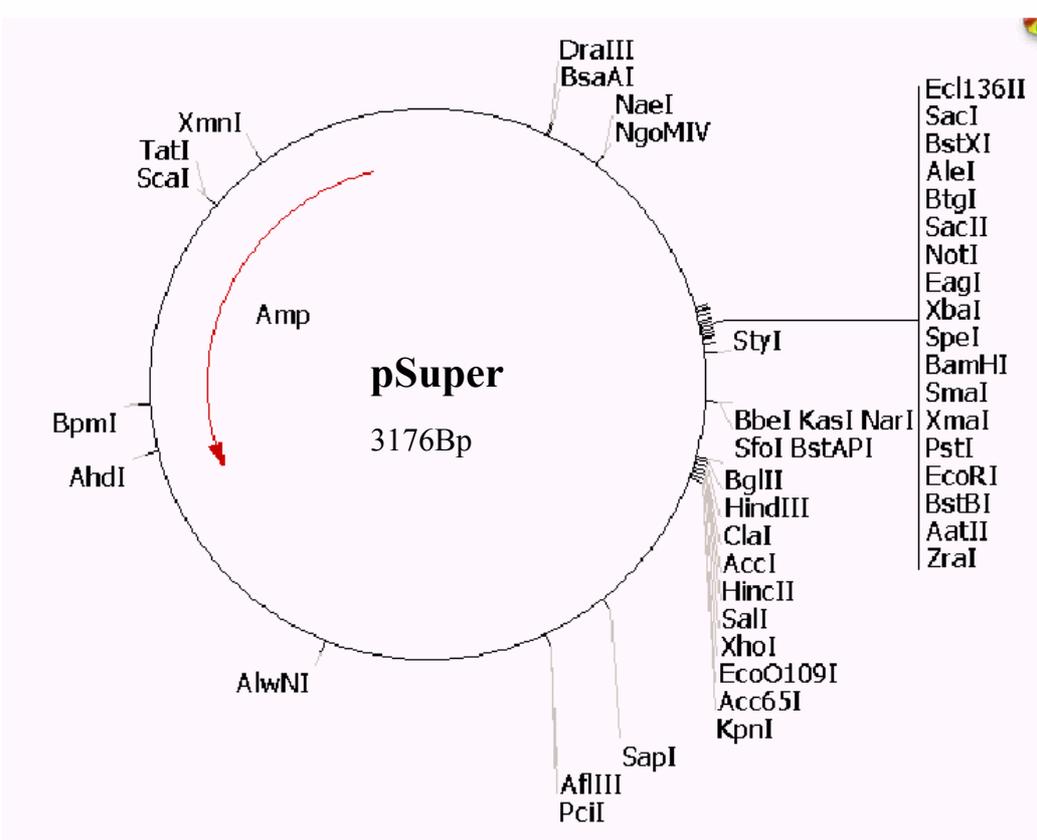
Key Sites

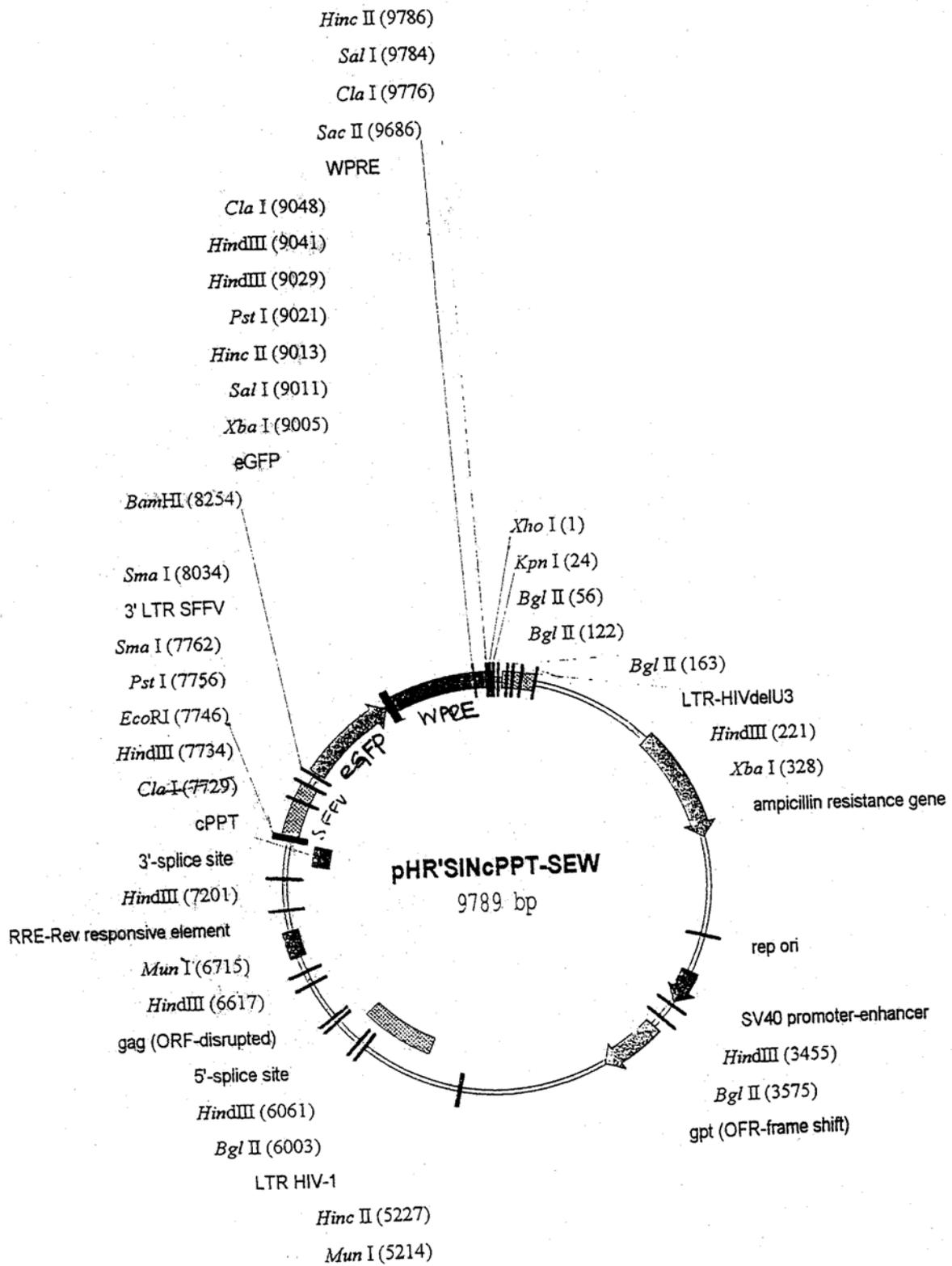
- BglII: 928
- HindIII: 934
- EcoRI: 707
- Sall: 949
- XhoI: 955

Vector Features

- f1(+) origin: 441-135
- H1 promoter: 708 - 934
- pUC origin: 1373-2040
- Ampicillin resistance ORF: 3048-2191

- T7 primer binding site (AATACGACTCACTATAG): 627-643
- T3 primer binding site (CTTTAGTGAGGGTTAAT): 989-1005
- M13(-20) primer binding site (GTAAAACGACGGCCAGT): 600-616
- M13 reverse primer binding site (CATGGTCATAGCTGTT): 1023-1038





Bei der Klonierung des dch1-shRNA-SR-Plasmids wurde die EGFP-WPRE-Kassette gegen ein RFP ausgetauscht.

Sequenzen

Humane c-abl-Sequenz (5744Bp)

5'-GGCCCTCCCCCTGCGAGGATCGCCGTTGGCCCGGGTTGGCTTTGGAAAGCGGGCGGTGGCTTTGGGCCGGGCTCGGCCTCGGGAACGCCAGG
GGCCCTGGGTGCGGACGGCGCGGCCAGGAGGGGTTAAGGCCAGGCGGCGCGGGCGGGGCGGGGCTGGCGGGCCCTCTCCGGGCC
TTTGTAAACAGGCGCGTCCCGGCCAGCGGAGACCGGCCGCCCTGGGCGGGCGCGGGCGGGCGGGCGGTGAGGGCGGCTGCGGGGCGGCGC
CCGGGGCGGGGCGGAGCCGGGCTGAGCCGGGCCCGGACCGAGCTGGGAGAGGGGCTCCGGCCCGATCGTTCGCTTGGCGCAAATGTTGGAG
ATCTGCCTGAAGCTGGTGGGCTGCAAAATCCAAGAAGGGGCTGTCTCGTCTCCAGCTGTTATCTGGAAGAAGCCCTCAGCGGCCAGTAGCAT
CTGACTTTGAGCCTCAGGGTCTGAGTGAAGCCGCTCCTTGGAACTCCAAGGAAACCTTCTCGTGGACCCAGTGAAAAATGACCCCAACCTTT
CGTTGCACTGTATGATTTTGTGGCCAGTGGAGATAACTCTAAGCATAACTAAAGGTGAAAAGCTCCGGGTCTTAGGCTATAATCACAATGGG
GAATGGTGTGAAGCCCAAACCAAAAATGGCCAAGGCTGGGTCCCAAGCACTACATCACGCCAGTCAACAGTCTGGAGAAACACTCCTGGTACC
ATGGGCTGTGTCCCGCAATGCCGTGAGTATCCGCTGAGCAGCGGGATCAATGGCAGCTTCTTGGTGCCTGAGAGTGGAGCAGTCTAGCCA
GAGGCTCATCTCCCTGAGATACGAAGAGGGTGTACCATACAGGATCAACACTGGTCTGATGGCAAGCTCTACGCTCTCCCGAGGCGCG
TTCAACACCCCTGGCCGAGTTGGTTCATCATCATTCAACGGTGGCCGACGGGCTCATCACCCAGCTCCATTATCCAGCCCCAAAGCGCAACAAGC
CCTACTGTCTATGGTGTGTCCCAACTACGACAAAGTGGGAGATGGAACGCACGGACATCACCATGAAGCACAAGCTGGGCGGGGCGCAGTACGG
GGAGGTGTACGAGGGCGTGTGGAAGAAATACAGCCTGACGGTGGCCGTGAAGACCTTGAAGGAGGACACCATGGAGGTGGAAGAGTCTTTGAAA
GAAGCTAGTGCAGTCAAGTCAAAACACCCTAACCTTACCTTGGGACTCTGGGACTTGCCAGTCTGCACCCGGGAGCCCGTGGAGT
TCATGACCTACGGGAACCTCCTGGACTACCTGAGGGAGTGAACCGGCAGGAGGTGAACCGCGTGGTGTCTGTACATGGCCACTCAGATCTC
GTCAGCCATGGAGTACCTAGAGAAAGAAAACCTTCATCCACAGAGATCTTGCTGCCGAAACTGCCTGGTAGGGGAGAACCCTTGGTGAAGGTA
GCTGATTTTGGCTGAGCAGGTTGATGACAGGGGACACCTACACAGCCATGCTGGAGCCAAGTTCGCCATCAATGGACTGCACCCGAGAGCC
TGGCTTACAACAAGTTCTCCATCAAGTCCGACGCTTGGGACATTTGAGATTTGCTTTGGGAAATGGTACTACCTTGGGAAATGGTACTACCT
AATTGACCGTTCCAGGTGTATGAGCTGCTAGAGAAGGACTACCGCATGAAGCGCCAGAAAGGCTGCCAGAGAAGGTCTATGAACTCATGCGA
GCATGTTGGCAGTGGAAATCCCTCTGACCGGCCCTCCTTTGCTGAAATCCACCAAGCCTTTGAAACAATGTCCAGGAATCCAGTATCTCAGACG
AAGTGGAAAAGGAGCTGGGGAACAAGGCGTCCGTGGGGCTGTGACTACCTTGCTGCAGGCCCCAGAGCTGCCACCAAGACGAGGACCTCCAG
GAGAGCTGCAGACACAGAGACACCACCTGACGTGCCTGAGATGCTCTCAAGGGCCAGGGAGAGCGATCCTCTGGACCATGAGCCGCTGCC
GTGTCTCCATTGCTCCCTCGAAAAGAGCGAGGTCCCGGAGGGCGGCGTGAATGAAGATGAGCGCCTTCTCCCAAGACAAAAAGACCAACT
TGTTTCAGCGCCTTGATCAAGAAGAAGAAGAAGACAGCCCAACCCCTCCCAAGCAGCAGCTCCTTCCGGGAGATGGAGCGCCAGCCGAGCG
CAGAGGGGCGGGCGAGGAAGAGGGCCGAGACATCAGCAACGGGCACTGGCTTTCACCCCTTGGACACAGCTGACCCAGCCAAGTCCCAAAAG
CCAGCAATGGGGCTGGGGTCCCAATGGAGCCCTCCGGGAGTCCGGGGCTCAGGCTCCGGTCTCCCACTGTGGAAGAAGTCCAGCAGC
TGACCAGCAGCCGCTAGCCACCGGCGAGGAGGAGGGCGGTGGCAGCTCCAGCAAGCGCTTCTGCGCTCTTGTCTCCGCTCTCCTGCGTTC
TGGGCCAAGGACACGGAGTGGAGGTGAGTACGCTGCCTCGGACTTGCAGTCCACGGGAGACAGTGTGACTCGTCCACATTTGGAGGGCAC
AAAAGTGAGAAGCGGCTCTGCCTCGGAAGAGGGCAGGGGAGAACAGGTCTGACCAGGTGACCCGAGGACAGTAACGCCTCCCCCAGGCTGG
TGAAAAGAATAGAGTCTGATGAGGTCTTCAAAGACATCATGGAGTTCAGCTCCAGCCCGGCTCCAGCCCGCCAACTGATCCAAAACCCGG
CCGGCGGCGAGTCCCGTGGCCCTGCCTCGGGCTCCCAACAAGGAAGAAGCTGGAAGGCAAGTGCCTTAGGGACCCCTGCTGCAGTGTGAG
CCAGTGCACCCACCAGCAAAGAGGCTCAGGTGCACCAAGGGGACACAGCAAGGGCCCGCCGAGGAGTCCAGAGTGGAGGGACAAGCACT
CCTCTGAGTCCGAGGGAGGACAAGGGGAAATGTCCAAGCTCAAAGCTGCCCGCGCCCCACCAGCAGCCTCTGCAGGGAAAGGCTGGAGG
AAGCCCTCGCAGGCGGGTGGGAGGCTGCGGGAGGAGCTTGGGAGCAAGACAAAAGCCAGAGTCTGTTGATGCTGTAAGCAGT
GACGCTGCCAAGCCAGCCAGCCGCGCAGAGGGCTCAAAGGCGCTGCTCCCGCCACTCAAAGCCACACCCCGCAAGCCGTCGGGGACCC
CCATCAGCCAGCCCGCTTCCCTTTCCACGTTGCCATCAGCATCCTCGGCTTGGCAGGGGACAGCCGCTTCCACTGCCTTCATCCCTCT
CATATCAACCGAGTGTCTTTCGAAAACCCGCGCAGCTCCAGAGCGGGCCAGCGGCCATCACCAGGGCGTGGTCTTGGACAGCACCCGAG
CGCTGTGCTCGCCATCTCTGGAATCCGAGCAGATGGCCAGCCAGCAGTCTGGAGGCGGCAAAAACCTCTACACGTTCTGCGTGA
GCTATGTGATTTCCATCAGAAATGAGGAACAAGTTTGCCTTCGAGAGGCCATCAAACAATGGAGAATAATCTCCGGGAGCTTCAGATCTG
CCCGCGTTCAGCAGGCTGGTCCGGCGCCACTCAGGACTTCAGCAAGCTCCTCAGTTCGGTGAAGGAAATCAGTGACATAGTGCAGAGGTAG
CAGCAGTCAAGGGTCAAGTGTGAGGCCCGTCCGAGCTGCCTGCAGCAGATGCGGGCTCCGCCATACCCATGACAGTGGCTGAGAAGGGACTAGT
GAGTCAACACTTGGCCAGGAGCTCTGCGCCAGGCAAGCTGAGGGCCCTGTGGAGTCCAGCTCTACTACCTACGTTTGGACCCGCTGCCCTC
CGGACCTTCCCTCCCGCTCCGCTCTGCTCCTCGAATTTTATCTGTTGAGTTCCTGCTCCGTTGAGTGCAGTCCGAGTCCAGGACCCG
AGCCCGCTCCCACTAGTGCACAGACTGAGCTCTCCAGGCCAGGTGGGAACGGCTGATGTGGACTGTCTTTTTTCAATTTTTTCTCTGAG
CCCTCTCCCGGGCTGGGCTCCTTCTTCCACTTCTCCAAGAATGGAAGCCTGAACCTGAGGCTTGTGTGAGGCCCTCTGCTGCACCTC
CTGGCTTGGCCGTCGTGTGTAAGACATGTTTCAAGAACCGCCATTTCCGGGAAGGGCATGCACGGCCATGCACACGGCTGGTCACTCTGCC
CTCTGCAATGCGCGGGTGGGTCACCTCGCCATTTCTCAGCTGCAGGACAGCTCTTGATTTGGGTGGAAAACAGGGTGTAAAGCCAAACA
GCCTTTGGTCTGGCAGGTGGGAGCTGAAAAGGATCGAGGCATGGGCAATGCTCTTCCATCTGTCCACATCCCCAGAGCCAGCTCTTGCT
CTCTTGTGACGTGCACTGTGAATCTTGCAAGAAAGCTTGAGTCTCAAGGGTGGCAGGTCAGTGTCACTGCCGACATCCCTCCCCAGCAGAA
GGAGCAGGGGACAAGGAGGCAAGTGGTGTGGGTGAACAGCTGGTCCAAATAGCCCAAGCTGGGCCAGGCAAGGCTGCAAGGGCCAG
AGTGAACCGTCTTTCACACATCTGGGTGCCCTGAAGGGCCCTTCCCTCCCACTCCTCTAAGACAAGTAGATTTCTTAAAGGCCCTTTC
TTTGAACAAGACAGCCTTCACTTTTCTGAGTCTTGAAGCATTTCAAAGCCCTGCCTCTGTGTAGCCGCTGAGAGAGAATAGAGCTGCCAC
TGGCACCTCGCGACAGGTGGGAGGAAAGGGCTGCGCAGTCCGGTCTGGTGCACCTTGAACCTGGGCGAATGTCTTATTTAATTACCGTG
AGTGACATAGCCTCATGTTCTGTGGGGTCACTAGGGAGGTTAGGAAAACCAACAACGGAGCCCTGAAAGCCTCAGTATTTACAGAGCAC
GCCTGCCATCTTCCCGAGGCTGCCAGGCCGAGCCAGATACCGGCGGGCTGTGACTTGGGCGAGGACCCGGGGTCTCTGGACCTTG
ACAGAGCAGTAACTCCGAGAGCAGTGGGCAAGTGGCCGCCCCGAGGCTTACGCGGAGAGCCACTTCCCGCCCTTCATACCGCTCGT
GCCAGCAGCCTCGCACAGGCCCTAGCTTTACGCTCATCACTAAACTTGTACTTTATTTTCTGATAGAAATGGTTTCTCTGGATCGTTTTAT
CGGTTCTTACAGCACATCACTCTTCCCCCGAGCGGCTGTGACGACGGGAGGCACTAGTACCAGACAGCGGCTTGAAGACAGAGCAA
GCCCCACCCAGGTCCCCGACTGCCTGTCTCCATGAGTACTGGTCCCTTCTTTTGTAACTGATGTGCCATATATTTTACAGTATCTC
TTGGTATGCATCTTTTATAGACGCTCTTTTCTAAGTGGCGTGTGCATAGCGTCTGCCCTGCCCTCGGGGCTGTGGTGGCTCCCTCTGCT
TCTCGGGTCCAGTGCATTTTGTCTGTATATGATTCCTGTGGTTTTTTTTGAATCCAAATCTGTCTCTGTAGTATTTTTTAAATAAATCA
GTGTTTACATTAG-3'

Humane bcr-Sequenz (4739Bp)

5´-GGGGAGATAGGTAGGAGTAGCGTGGTAAGGGCGATGAGTGTGGCCGGGGGGAGTGCGGCGAGAGCCGGCTGGCTGAGCTTAGCGTCCGA
GGAGGCGGCGGGCGGGCGGCGCAGCGCGCGGGCGGGCTGTGGGGCGGTGCGGAAAGCGAGAGGCGAGGAGCGCGGGCCGTGGCCAGAGT
CTGGCGGGCGCCCTGGCGGAGCGGAGAGCAGCGCCCGCCCTCGCCGTGCGGAGGAGCCCCGCACACAATAGCGGCGCGCGAGCCCGCGCCCTT
CCCCCGCGCGCCCGCCCGGCGCGCGGAGCGCCCGCTCCGCTCAGCTGCCACCAGGGAGTGGGCGGGCATTTGTTCCGCCGCGCGCCCGCC
GCGCGGGGCCATGGGGCGCCCGGCGCGCCGGGCGGGCCCTGGCGAGGCCGCGCGCCCGCTGAGACGGGCCCGCGCGCAGCCCGGCGGC
GCAGGTAAGGCCCGCGCCATGTTGACCCCGTGGGCTTCGCGGAGGCGTGAAGGCGCAGTTCCCGACTCAGAGCCCCCGCATGGAGC
TGCGCTCAGTGGGCGACATCGAGCAGGAGTGGAGCGCTGCAAGGCCCTCCATTGCGCGCTGGAGCAGGAGTGAACCAGGAGCGCTTCCGCAT
GATCTACCTGCAGACGTTGCTGGCCAAAGGAAAAGAGAGTATTGACCCGCGAGCGATGGGGCTTCCGCGCGCGCGCAGGCCCCGACGCGCC
TCCGAGCCCCGAGCGTCCGCGTCCGCGCCGAGCCAGCCGCGCCGACGGAGCCGACCCGCGCCCGCGGAGGAGCCGAGGCCCCGGCCCCGACG
GGAGGGTTCTCCGGTAAGGCCAGGCCCGGGACCGCCCGCAGGCCCGGGGACGCCGCGTCCGGGGAAACGGGACGACCCGGGACCCCCCGCCAG
CGTGGCGGCGCTCAGGTCCAACCTTCGAGCGGATCCGCAAGGGCCATGGCCAGCCCGGGGCGGACGCCGAGAAGCCCTTCTACGTGAACGTCGAG
TTTACCACGAGAGCGGGCTGGTGAAGTCAACGACAAAGAGGTGTCGAGCCAGCGATGGGGCTTCCGCGCGCGCGCAGGCCCCGACGCGCC
AAAAGTCCAGCAGCGCGGGCTCGAGCGTGGGGATGCATCCAGGCCCTTACCGGGGACGCTCCTCGGAGAGCAGCTGCGGCGTCGACGG
CGACTACGAGGACGCGGAGTTGAACCCCGCTTCTGAAGGACAACTGATCGACGCCAATGGCGGTAGCAGGCCCTTGGCCGCCCTGGAG
TACCAGCCCTACCAGAGCATCTACGTGGGGCGATGATGGAAGGGGAGGGCAAGGGCCCGCTCCTGCGCAGCCAGAGCACCTCTGAGCAGGAGA
AGCCCTTACCTGGCCCGCGTGGTCCACTCCCCCGAGTATTGAGGATTGCGGAGGGGATATACCCCGGCTATACCCGAGCCTTCCGAGCCT
CACCTCCAGCAGGAGGACTTCTCCTTGGCCAGTCCAGCCGCGTGTCCCAAGCCCCACCACCTACCGCATGTTCCGGGACAAAAGCCGCTCT
CCCTCGCAGAACTCGCAACAGTCTTCGACAGCAGCAGTCCCCCGACGCGCAGTGCCATAAGCGGCACCGGCAGTGCCTGGTTGCTGTCG
AGGCCACCATCGTGGCGCTCCGCAAGACCGGGCAGATCTGGCCCAACGATGGCGAGGGCGCTTCCATGGAGACGCGAGATGGCTCGTTCGGAAC
ACCCTTGGATAGCGTTCGAGACCGGGCAGAGGAGAGCGCGGACCAAGATGGGCTGCCCTACATTTGATGACTGCCCTCCCTCATCG
CCCCACCTCAGCAGCAAGGGCAGGGGACGCGGGATGCGCTGGTCTCGGGAGCCCTGGAGTCCACTAAAGCGAGTGAAGTGGACTTGGAAAAGG
GCTTGGAGATGAGAAAATGGGTCTGTGGGAAATCCTGGCTAGCGAGGAGACTTACCTGAGCCACTGGAGGCACTGCTGCTGCCATGAAGCC
TTTGAAAGCCGCTGCCACCACCTCTCAGCCGGTGTGACGAGTTCAGCAGATCGAGACCATCTTCTTCAAGTGCCTGAGCTTACGAGATCCAC
AAGGAGTTCTATGATGGGCTTTCCTCCGCGTGCAGCAGTGGAGCCCTCAGCAGCGGGTGGGCGACCTCTTCCAGAAGCTGGCAGTGGAGCTGG
GTGTGTACCGGGCTTCGTGGACAACACTACGAGTGGCATGGAATGGGTGAGAAGTGTGTGACGGCCAAATGCTCAGTTTGCAGAAAATCTCCGA
GAACCTGAGAGCCAGAAGCAACAAGATGCCAAGGATCCAACGACCAAGAAGTCTTGGAAACTGTGCTTACAAGCCTGTGGACCGTGTGACG
AGGAGCAGCTGTCTCCATGACTTGTGTAAGCACACTCCTGCCAGCCACCTGACCACCCCTTGTGTCAGGACGCCCTCCGCATCTCACAGA
ACTTCTGTCCAGCATCAATGAGGAGATCACACCCCGACGCGCAGTCCATGACCGTGAAGAAGGAGAGCACCAGGAGCTGCTGAAGGACAGCTT
CATGGTGGAGCTGGTGGAGGGGGCCCGCAAGCTGCGCCACGCTTCTCCTGTTACCGAGCTGCTTCTGACCAAGCTCAAGAAGCAGAGCGGGA
GGCAAAAGCAGCAGTATGACTGCAAAATGGTACATTCCGCTCAGGATCTCAGCTTCCAGATGGTGGATGAAGTGGAGGCACTGCCAACATCC
CCCTGGTCCCGATGAGGAGCTGGACGCTTTGAAGATCAAGATCTCCAGATCAAGAGTGACATCCAGAGAGAGAAGAGGGCGAACAAGGGCAG
CAAGGCTACGGAGAGGCTGAAGAAGAAGCTGTGGAGCAGGAGTCACTGCTGCTTATGCTTCCAGCATGGCTTACGGGTGCACAGCCGC
AACGGCAAGAGTTACACGTTCTCTGATCTCCTCTGACTATGAGCGTGCAGAGTGGAGGAGAACAATCCGGGAGCAGCAGAAGAAGTGTTCAGAA
GCTTCTCCCTGACATCCGTGGAGCTGCAGATGTGACCAACTCGTGTGTGAAACTCCAGACTGTCCACAGCATTCGCTGACCATCAATAAGGA
AGATGATGAGTCTCCGGGCTCTATGGGTTTCTGAATGCATCGTCCACTCAGCCACTGGATTTAAGCAGAGTTCAAATCTGTACTGCACCCCTG
AGCTGGAGGGCTCCAGACCCTGAGGATACTGTGCTATGAAAAGTGTACAAACAAGACGAAGATCCCCAAGGAGGACGGCGAGAGCAGGACAG
ACTCATGGGAAGGGCCAGTCCAGCTGGACCCGACGGCCCTGCAGGACAGAGACTGGCAGCGCACCGTCTATCGCCATGAATGGGATCGAAGTA
AAGCTCTCGGTCAAGTTCAACAGCAGGGAGTTCAGCTTGAAGAGGATGCGTCCCGAAAACAGACAGGGGTCTTCGGAGTCAAGATTGCTGTGG
TCACCAAGAGAGAGAGTCAAGGTGCCCTACATCGTGCAGTGCCTGAGGAGATCGAGCGCCGAGGCACTGGAGGAGTGGGATCTACCC
CGTGTCCGGTGTGGCCAGGACATCCAGGCACTGAAGGACGCCCTTCGAGTCAATAACAAGGATGTGCTCGGTGATGATGAGCAGATGGACGCTG
AACGCCATCGCAGGACGCTGAAGCTGTACTTCCGTGAGCTGCCCGAGCCCTTCTACTGACGAGTCTTACCCCACTTCCGAGAGGGCATCG
CTCTTTTACAGCCCGTTGCAAGGAGAGCTGCATGCTCAACCTGCTGCTGCTCCTGCCGAGGGCAACCTGCTCACCTTCTTTTCTTCTGGA
CCACCTGAAAAGGGTGGCAGAGAAGGAGGCACTCAATAAGATGTCCTGCACAACCTCGCCACGGTCTTTGGCCCCACGCTGCTCCGGCCCTCC
GAGAAGGAGAGCAAGCTCCCTGCCAACCCCGACGCGCTATCACCATGACTGACAGCTGGTCCCTGGAGGTCATGTCCCAGGTCCAGGTGCTGC
TGACTTCTGACGCTGGAGGCCATCCCTGCCCGGACAGCAAGAGACAGAGCATCCTGTTCTCCACCGAAGTCTAAAGTCCCAGTCCATCTC
CTGGAGGACAGCAGATGGCTGGAAACCTTGGCTAATCGGGCCATCCGTAGAGCGGGAACTTCCCTGAGGTGTCTTGGGCCACCCCCAAGTG
TTGGCCATCTGCCAAGAGACAGCGACCCAAAGCCGAAGGACAGGTGGCTGGGCGAGATCTCGCCAGGTCTGGGAGCCCCAGGTGGCTCAG
ACTGTGGTTTTTTATGTGGCCACCCGAGGGCGCCCCAAGCCAGTTCATCTCAGAGTCCAGCCCTGACCCCTGGGAGACAGGGTGAAGGGAGTGT
TTTTATGAACTTAACTTAGAGTCTAAAAGATTTCTACTGGATCACTTGTCAAGATGCGCCCTCTCTGGGAGAAAGGACGTCACCGGATTTCC
TCACTGTGTATCTGAATAAACGCTGCTGCTTCATCCGTG-3´

Lebenslauf

von Dipl. Biochem. Diana Steinmann, geb. am 12.05.1975

Ausbildungsdaten

Schulbildung	1986-1990	Gesamtschule Sondershausen
	1990-1993	Gymnasium Sondershausen
Schulabschluss	30.06.1993	Abitur
Studium der Biochemie	1993-1999	Studium der Biochemie an der Universität Hannover
	6/1995	Vordiplom
	6/1998	Diplomprüfungen in den Fächern Biochemie, Biophysikalische Chemie und Physiologie
	7/1998-4/1999	Diplomarbeit im Institut für Humangenetik der MHH
	Studienabschluss:	4/1999
Studium der Humanmedizin	seit 10/1995	Studium der Humanmedizin an der MHH
	3/1998	Physikum
	3/2000	1. Staatsexamen
	3/2002	2. Staatsexamen
Promotion	seit 2/2001	Im Rahmen der Promotion angestellt als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Hämatologie und Onkologie der MHH Thema der Dissertation: <i>Molekular- und zellbiologische Untersuchungen zur effektiven Suppression des onkogenen Fusionsproteins BCR-Abl</i>

Eigene Publikationen

Scherr M, **Steinmann D**, Eder M. RNA interference (RNAi) in hematology.
Ann Hematol. 2004 Jan;83(1):1-8. Review.

Denic S, Al-Gazali L, El-Harith el-HA, **Steinmann D**, Dork T, Abdel-Hadi MS.
BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer patients from Saudi Arabia.
Saudi Med J. 2003 Jun;24(6):696-7.

El-Harith el-HA, Abdel-Hadi MS, **Steinmann D**, Dork T.
BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer patients from Saudi Arabia.
Saudi Med J. 2002 Jun;23(6):700-4.

Dork T, Bendix R, Bremer M, Rades D, Klopper K, Nicke M, Skawran B, Hector A, Yamini P, **Steinmann D**, Weise S, Stuhmann M, Karstens JH. Spectrum of ATM gene mutations in a hospital-based series of unselected breast cancer patients.
Cancer Res. 2001 Oct 15;61(20):7608-15.

Steinmann D, Bremer M, Rades D, Skawran B, Siebrands C, Karstens JH, Dork T.
Mutations of the BRCA1 and BRCA2 genes in patients with bilateral breast cancer.
Br J Cancer. 2001 Sep 14;85(6):850-8.

Bremer M, **Steinmann D**, Dork T, Borger J, Rades D, Karstens JH.
[Bilateral breast carcinoma and local recurrence: prevalence of BRCA-1 and BRCA-2 gene mutations in an unselected patient sample]
Strahlenther Onkol. 2001 Jul;177(7):325-9. German.

Vorechovsky I, Luo L, Ortmann E, **Steinmann D**, Dork T.
Missense mutations at ATM gene and cancer risk.
Lancet. 1999 Apr 10;353(9160):1276. Erratum in: Lancet 1999 Aug 28;354(9180):780.

Lenzen CU, **Steinmann D**, Whiteheart SW, Weis WI.
Crystal structure of the hexamerization domain of N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein.
Cell. 1998 Aug 21;94(4):525-36. Erratum in: Cell 1998 Oct 16;95(2):following 289.

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Ganser, Prof. Dr. Eder und Frau Prof. Dr. Scherr möchte ich mich für die Möglichkeit der naturwissenschaftlichen Dissertation am Institut für Hämatologie und Onkologie sowie für die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Alves möchte ich ganz herzlich für die Übernahme des Doktorvateramtes, des Hauptreferates, die aufschlussreichen Gespräche und die viele Zeit bedanken, die er sich für mich genommen hat, wann immer ich ihn brauchte.

Herrn Prof. Dr. Müller möchte ich für die Übernahme des Koreferats danken.

Karin Battmer und Iris Dallmann sowie Tirza Heinze danke ich für die intensive Betreuung der praktischen Tätigkeiten, für die Beantwortung von tausend kleinen Fragen, für die Bereitstellung vieler wichtiger Dinge und das super nette Arbeitsklima. Ohne euch hätte ich nie durchgehalten!

Allen Mit-Doktoranden und –Diplomanden, wie Anuhar Chartuvedi, Yildirim Dogan, Bernd Kappenberg, Stefanie Odenbrett, Daniel Schäfer und Andreas Tiede möchte ich für die vielen aufmunternden und interessanten Gespräche, die Hilfe bei Computerproblemen, für die Bereitstellung von Literatur, das tolle Teamwork im Labor und nicht zuletzt für das unermüdliche Korrekturlesen meinen herzlichen Dank aussprechen.

Vielen Dank an Herrn PD Dr. Jürgen Krauter, Bettina, Kerstin, Dagmar und Elvira für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes, die Unterstützung und netten Gespräche. An Bettina ein großes Dankeschön, das sie mich vor allem in der Endphase immer gut beraten und beim Schreiben nicht allein gelassen hat.

Auch allen anderen Mitgliedern der Abteilung Hämatologie, wie Mike, Letizia, Nicole, Michael Stadler, Susanne Luther und Thomas Winkler, möchte ich an dieser Stelle für die unterschiedlichsten Hilfen danken.

Aber all die vielen Labortätigkeiten wären nicht möglich gewesen, wenn nicht meine beiden lieben Kinder Stefan und Lukas von so vielen lieben Menschen oft unter Verzicht auf persönliche Interessen betreut worden wären. An erster Stelle möchte ich Volker dafür danken, aber auch besonders meinen Eltern und Schwiegereltern, Karina, sowie Steffi, Angela und Skirma.

Britta möchte ich für die vielen tollen Ideen, Formulierungen, unermüdlichen Korrekturen, aufgeopferten Wochenenden und für die wertvolle psychologische Betreuung zum Schluss danken. An Fritz vielen Dank für die Nachtschicht am Computer und dass du für mich auf Britta verzichtet hast.

Volker möchte ich für die unerschöpfliche Unterstützung, die vielen aufbauenden Gespräche, der Lösung unzähliger häuslicher, familiärer, computertechnischer und vieler weiterer Probleme danken.

An Stefan und Lukas vielen Dank, dass sie so liebe Kinder sind, nachts fast immer schlafen und geduldig ausharren, wenn ich stundenlang vor dem Computer saß. Auch ohne diese, oftmals schwere, Mitarbeit der Kinder hätte ich es nie geschafft, die Doktorarbeit zu beenden.