

Aus der Medizinischen Klinik und
Poliklinik III - Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. W. Hiddemann

**Herunterregulation des Proto-Onkogens c-Jun
durch das
CCAAT/Enhancer bindende Protein α
in der Myelopoese und in der akuten myeloischen Leukämie
(AML)**

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

vorgelegt von

Nicolai Treiber

aus

Leutkirch

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. W. Hiddemann
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. med. R. Huss Prof. Dr. med. M. Schliwa
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Priv. Doz. Dr. med. G. Behre
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	21.10.2004

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	10
1.1	Hämatopoese	10
1.2	Myelopoese	11
1.3	Akute myeloische Leukämie (AML)	13
1.4	Regulation der Transkription eukaryoter Gene	15
1.5	Begriffsklärung	16
	1.5.1 Leucin-Zipper	16
	1.5.2 C/EBPs und C/EBP α	17
	1.5.3 c-Jun	20
1.6	Aufgabenstellung	22
2	Materialien und Methoden	23
2.1	Materialien	23
2.1.1	Reagenzien	23
2.1.2	Reaktionskits	24
2.1.3	Puffer und Lösungen	24
2.1.4	Enzyme und Marker	26
2.1.5	Plasmide und Reporterkonstrukte	26
2.1.6	Primer und Antikörper	28
2.1.7	Biologische Materialien	28
	2.1.7.1 Bakterien	28
	2.1.7.2 Zelllinien	28
	2.1.7.3 Patientenproben	28
2.1.8	Kulturmedium	29
	2.1.8.1 Bakterien	29
	2.1.8.2 Zelllinien	29
2.1.9	Sonstiges	30
2.2	Methoden	30

2.2.1	Zellkultur	30
2.2.1.1	Allgemeine Kulturbedingungen	30
2.2.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	30
2.2.1.3	Bestimmung der Zellzahl	30
2.2.2	RNA-Extraktion	31
2.2.3	Reverse Transkription	32
2.2.4	Realtime-Polymerase-Ketten-Reaktion	33
2.2.5	Transiente Transfektion eukaryoter Zellen	34
2.2.5.1	Transiente Transfektion adhärenter Zellen mit LipofectAMIN	34
2.2.5.2	Transiente Transfektion gelöster Zellen mit Effectene	35
2.2.6	Dual-Luciferase™ Reporter-Assay	35
2.2.7	Proteinbestimmung mit dem Bio-Rad-Assay	36
2.2.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	36
2.2.9	Western Blot	37
2.2.10	Stripping-Verfahren	38
2.2.11	Zinkinduktion	38
2.2.12	Lyse eukaryoter Kulturzellen	39
2.2.13	Gewinnung von Plasmiden	39
2.2.13.1	Transformation	39
2.2.13.2	Inokulation und Plasmid-Präparation	39
2.2.13.3	DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung	40
2.2.14	In-vitro Translation	41
3	Ergebnisse	42
3.1	Gegensätzliche C/EBP α und c-Jun Expression	42
3.2	C/EBP α reguliert die c-Jun Promotoraktivität dosisabhängig herunter	45
3.3	C/EBP α blockiert die durch TPA induzierte c-Jun Promotoraktivität	47

3.4	Kartographie des c-Jun Promotors zur Identifikation der Region, die für die C/EBP α vermittelte Herunterregulation entscheidend ist	49
3.5	C/EBP α blockiert die Autoregulation c-Juns durch das Verhindern der c-Jun Bindung an die proximale AP-1 Bindungsstelle im c-Jun Promotor	52
3.6	Bedeutung der Herunterregulation der c-Jun Expression durch C/EBP α in der akuten myeloischen Leukämie	58
4	Diskussion	60
4.1	Kontext der Forschungsarbeit	60
4.2	Verschiedene Ebenen der C/EBP α /c-Jun Interaktion	62
4.3	Biologische Relevanz	65
4.4	Bedeutung in der akuten myeloischen Leukämie	67
4.5	Perspektiven	70
5	Zusammenfassung	71
6	Literaturverzeichnis	72

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der Hämatopoese	12
Abbildung 2:	FAB-Klassifikation	15
Abbildung 3:	Schematische Darstellung des Leucin-Zippers	17
Abbildung 4:	3D-Modell der DNA-Bindung von C/EBP Proteinen	20
Abbildung 5:	mRNA Expression von C/EBP α und c-Jun	43
Abbildung 6:	Proteinexpression von C/EBP α und c-Jun	44
Abbildung 7:	C/EBP α reguliert die Aktivität des c-Jun Promotors konzentrationsabhängig herunter	46
Abbildung 8:	C/EBP α blockiert die TPA induzierte c-Jun Promotoraktivität	48
Abbildung 9:	Kartographie des c-Jun Promotors	
	A	50
	B	50
	C	51
	D	51
Abbildung 10:	C/EBP α blockiert die Autoregulationsfähigkeit c-Juns	
	A	54
	B	55
	C	56
	D	57
Abbildung 11:	Herunterregulation der c-Jun Expression durch C/EBP α in der AML	59
Abbildung 12:	Modell der Interaktion zwischen C/EBP α und c-Jun über ihre Leucin-Zipper-Domänen	64
Abbildung 13:	Modell des Zusammenspiels zwischen C/EBP α und c-Jun in der Myelopoese	69

Abkürzungsverzeichnis

a.a-met	Aminosäuren ohne Methionin
a.a-leu	Aminosäuren ohne Leucin
Abb.	Abbildung
AML	Akute myeloische Leukämie
AP-1	Aktivator Protein-1
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bZIP	basic region leucine zipper
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cdk	cyclin dependant kinase
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
C/EBP α	CCAAT Enhancer bindendes Protein alpha
CFU	colony forming unit
CTP	Cytidintriphosphat
CSF	colony stimulating factor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphat
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
ETO	Eight-twenty-one
FAB	French American British
FBS	Fetal Bovine Serum
g	Gramm
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor

G418	Geneticin-sulfat
GM-CSF	Granulocyte-Makrophage Colony Stimulating Factor
GTP	Guanosintriphosphat
G6PD	Glucose 6-Phosphat Dehydrogenase
inv	Inversion
JNK	Jun N-terminal kinase
kD	Kilodalton
LAR	Luciferase-Assay-Reagent
μ	mikro
M	Molar
2 ME	β -Methcarpo-Ethanol
M-CSF	Makrophage-Colony-Stimulating Factor
mRNA	messenger RNA
n	nano
NaOH	Natriumhydroxid
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PML	Promyelozyten-Leukämie-Gen
RAR α	Retinsäurerezeptor α
rpm	rounds per minute
RPMI	Rockland Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkription
RNA	Ribonucleinsäure
RNAasin	Ribonuklease Inhibitor
R.R.R	Rabbit Reticulocyte Lysate
SDS	Natriumdodecylsulfat

t	time
TAE	Tris Aceat EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TB	Trisborat
TBS	Tris gebufferte Salzlösung
TRE	TPA response element
TTP	Thymidintriphosphat
TPA	12 Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat
U	Units
V	Volt

1 Einleitung

1.1 Hämatopoese

Hämatopoese bezeichnet den Vorgang, bei dem sich aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen über mehrere Zwischenschritte die reifen peripheren Blutzellen entwickeln. Die Stammzellen, auch 'colony forming units'¹ genannt, zeichnen sich dadurch aus, dass sie auf der einen Seite ihren eigenen undifferenzierten Entwicklungsstand beibehalten, auf der andere Seite aber auch determinierte Vorläuferzellen bilden können. Hieraus entwickeln sich Erythrozyten, Thrombozyten, Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten. Lymphozyten können in B- und T- Lymphozyten unterschieden werden, Granulozyten werden in eosinophile, basophile und neutrophile Granulozyten unterteilt.

Die Hämatopoese ist ein sehr dynamischer Prozess, der lebenslänglich vonstatten geht und sich beim Gesunden postnatal im roten Knochenmark sowie den lymphatischen Organen abspielt. Rotes Knochenmark wird vor allem in den langen Röhrenknochen, dem Beckenkamm und dem Sternum vorgefunden. In der Embryonal- und Fetalentwicklung werden zuvor jedoch verschiedene Perioden durchlaufen. So ist in der mesoblastischen Periode das Mesenchym des Dottersacks und des Bauchstiels Ort der Hämatopoese, dann, nach Ende des 2. Fetalmonats, gewinnen mesenchymale Gewebe wie Leber und Milz an Bedeutung (hepatolienale Periode). Ab dem 5. Fetalmonat verlagert sich die Hämatopoese ins Knochenmark aller Knochen (medulläre Periode).

Auf Reize hin wie beispielsweise Infektionen, Blutverluste und Leukämien, kann die Blutbildung jedoch wieder in extramedulläre Organe wie Leber und Milz verlagert werden.

Das Knochenmark setzt sich zusammen aus den hämatopoetischen Stammzellen und den Stromazellen, die für die Matrixbildung verantwortlich sind. Diese Matrix enthält

¹Hämatopoetische Stammzellen wachsen in Experimenten in Agarkultursystemen unter Kolonienbildung und werden deswegen auch als 'colony forming units' (CFU) bezeichnet.

das für die Hämatopoese nötige Milieu, d.h. unter anderem Wachstumsfaktoren, wie M-CSF, G-CSF, GM-CSF² und Interleukine wie beispielsweise Il-6 und Il-3.

Die zunehmende Ausreifung der Zellen geht einher mit der Expression zelllinien-spezifischer Gene und dem Verlust an Proliferationsfähigkeit. Es wird angenommen, dass es bei der Regulation der Differenzierung vor allem auf die Interaktion der verschiedenen Transkriptionsfaktoren ankommt. So beschreiben Sieweke et al. 1998 im „Cocktailparty“-Modell, dass das Zusammenspiel der Transkriptionsfaktoren innerhalb der Transkriptionsfaktor-Komplexe die Bindungsaffinitäten der Promotor- und Enhancer-Elemente verändert.

²Die Wachstumsfaktoren werden als ‘colony stimulating factors’ (CSF) bezeichnet, da sie die Koloniebildung der Stammzellen stimulieren. Das Präfix gibt die Zellpopulation an, die unter dem Einfluss des Polypeptids gebildet wird. Vgl. auch: Petrides, P.E.: Blut. 1997

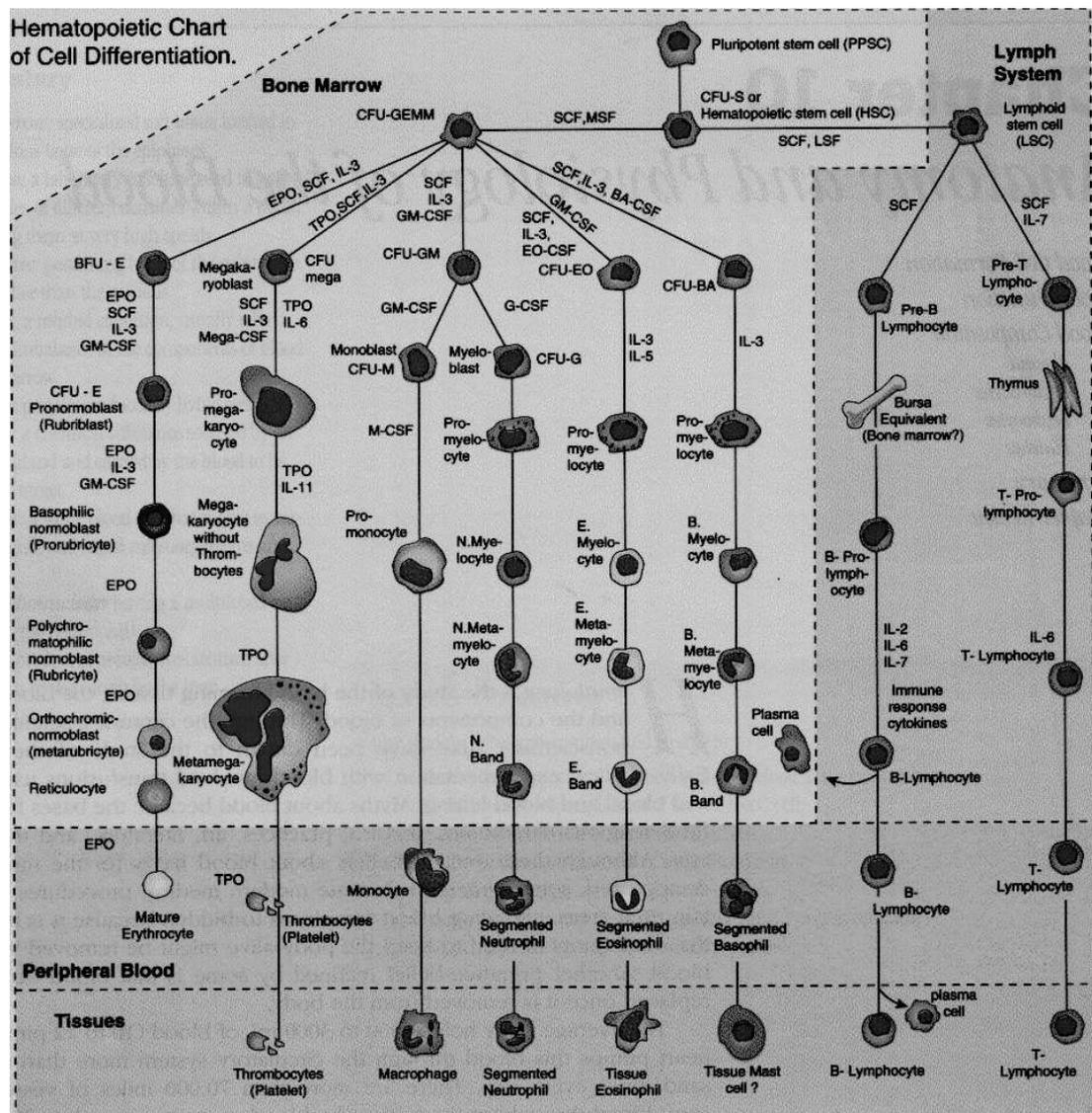


Abb. 1: Schematische Darstellung der Hämatopoese³

1.2 Myelopoese

Das myeloische System ergibt sich in Abgrenzung zum lymphatischen System. Myelopoese meint also die Differenzierung der verschiedenen Zellen aus einer gemeinsamen myeloischen Stammzelle. Hierfür benötigte Regulationsmechanismen wurden auf vielen Ebenen untersucht. So wurde beispielsweise herausgefunden, dass bestimmte Poetine, Interleukine und CSFs, zur weiteren Differenzierung führen, und dass die verschiedenen Entwicklungsstufen und Zelllinien sich durch

³Schematische Darstellung des hämatopoetischen Systems.

http://www.kidneycancerassociation.org/images/Maars_Image2.gif, entnommen am 14.09.2002.

charakteristische Zelloberflächenmarker, 'cluster of differentiation', auszeichnen. Es wird angenommen, dass es zu jedem Zeitpunkt der Differenzierung bestimmte Schlüsseltranskriptionsfaktoren gibt. Diese Transkriptionsfaktoren beeinflussen die Expression entscheidender Gene. So entstehen Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren, Enzyme, Adhäsionsmoleküle und wiederum Transkriptionsfaktoren. Doch die verschiedenen Transkriptionsfaktoren sind nicht nur bei Regulation der Hämatopoese von Bedeutung, sondern spielen auch eine große Rolle bei der Entstehung von Leukämien.⁴

Für die folgende Arbeit entscheidend ist vor allem die Gabelung des Differenzierungswegs der in Abbildung 1 als CFU-GM bezeichneten Zelle. Die weitere Differenzierung kann zu den terminal differenzierten Monozyten/Makrophagen oder zu den neutrophilen Granulozyten erfolgen.

1.3 Akute myeloische Leukämie (AML)

Die akute myeloische Leukämie ist eine maligne Erkrankung, welche die hämatopoetischen Stammzellen und hierunter vor allem die myeloischen und myelomonozytischen betrifft. Die leukämischen Zellen sind klonalen Ursprungs und zeichnen sich durch eine starke Proliferation aus, wobei die Fähigkeit zur Differenzierung teilweise oder völlig verloren gegangen ist. Als Folge davon kommt es im Verlauf der Erkrankung meist zur Ausschwemmung undifferenzierter Blasten ins periphere Blut, d.h. zur Überschreitung der Knochenmark-Blut-Schranke. Die Inzidenz dieser Erkrankung beträgt 2-3/100000 pro Jahr, mit höherem Alter ansteigend. Die AML wird nach morphologischen Gesichtspunkten in den Ausstrichpräparaten des Blutes und des Knochenmarkes diagnostiziert, wobei auch zytochemische Färbungen, Immunphänotypisierung und zytogenetische Untersuchungen herangezogen werden.

Ein Kriterium für die Prognose ist die zytogenetische Untersuchung der leukämischen Zellen. Während t(8;21), inv/t(16), t(15;17) eher eine gute und ein normaler

⁴Vgl. Tenen et al: Transkription factors, normal myeloid development and leukemia. 1997

Karyotyp eher eine mittlere Prognose aufweisen, ist sie bei -5, 5q-, -7, 7q- und komplexen Anomalien ungünstiger Natur.⁵

Die weitere Einteilung der AML erfolgt durch die Klassifikation der französisch-amerikanisch-britischen (FAB)-Arbeitsgruppe, die traditionell vor allem auf morphologischen Gesichtspunkten, also der Differenzierung und Reifung der prädominanten Zellen in Richtung von Granulozyten, Monozyten, Erythrozyten und Makrophagen beruht, aber auch zytogenetische Merkmale mit einbezieht.

Da in dieser Arbeit Patientenproben des FAB-M2 Subtyps verwendet wurden, wird auf diese näher eingegangen:

AML-M2 kommt in ungefähr 20–25% aller AML-Erkrankungen vor und gehört somit zu den häufigsten Subtypen. Der abnorme Karyotyp t(8;21) ist mit der AML-M2 assoziiert. Durch die Expression dieses neu entstandenen Fusionsgens wird das Fusionsprotein AML-ETO exprimiert. Doch in der Gruppe der AML-M2 können auch andere Translokationen und Mutationen vorkommen. Die von uns verwendeten Proben enthielten nicht die Translokation t(8;21). Pabst et al hatten diese Patientenproben sequenziert und dominant negative C/EBP α Mutationen identifiziert.⁶

⁵Vgl. Hiddemann, W.: Akute myeloische Leukämie. 1998

Vgl. auch: Slovak et al: Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in AML. 2000

Bartl et al: Morphologische Diagnostik. 1996

⁶Vgl. Pabst et al: Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. 2001

FAB-Subtyp	Morphologie	Zytogenetik
M0	Blastär- undifferenziert	t(3;21) (q26;q22)
M1	Myeloblastär- undifferenziert	
M2	Myeloblastär- differenziert	t(8;21) (q22;q22)
M3	Promyelozytär- hypergranulär	t(15;17) (q22;q11-12)
M3 variant	Promyelozytär- mikrogranulär	t(15;17) (q22;q11-12)
M4	Myelomonozytär	
M4 Eo	Myelomonozytär mit Eosinophilie	t/inv (16) (p13;q22)
M5a	Monoblastär	t(9;11) (p21-22;q23) anderer Translokationen (11) q(23)
M5b	Promonozytär- monozytär	
M6	Erythroblastär- myeloblastär	
M7	Megakaryoblastär	

Abb. 2: Einteilung der akuten myeloischen Leukämie nach der FAB-Klassifikation⁷

1.4 Regulation der Transkription eukaryoter Gene

Bei der Transkription eukaryoter Gene, also der Kopie von DNA in einzelsträngige mRNA, benötigt die DNA-abhängige RNA-Polymerase II einen Initiationskomplex, um an die Transkriptions-Startstelle, den Promotor, binden zu können. Für die Bildung des Initiationskomplexes sind die Transkriptionsfaktoren verantwortlich.

⁷Vgl. Büchner et al: Akute myeloische Leukämie. 1993

Vgl. von Schilling et al: Fortschritte im Verständnis der Leukämieentstehung. 1996

Enhancer, auch Transkriptionsaktivatoren genannt, können durch ihre Anwesenheit die Aktivität der Promotoren enorm verstärken. Sie besitzen keine feste Platzierung, können aber ungeachtet ihrer räumlichen Anordnung direkt mit dem Initiationskomplex der RNA-Polymerase II interagieren.

Die Regulation der Transkription ist ein komplexer Vorgang, an dem neben der Chromatinstruktur der Transkriptionsapparat und das Wechselspiel zwischen ubiquitär exprimierten und linienspezifischen transkriptionellen Aktivatoren und Repressoren beteiligt sind.⁸

Transkriptionsfaktoren benötigen im Allgemeinen zwei Fähigkeiten: Sie müssen spezifische Zielsequenzen erkennen können und nach ihrer Bindung an die DNA oder an das positive Regulationsprotein ihre Funktion über die Bindung anderer Anteile des Transkriptionsapparates ausüben.

Für die DNA-Bindung sind in Proteinen folgende Domänen beschrieben: Steroid-Rezeptor, Zink-Finger, Helix-turn-Helix, Helix-loop-Helix und Leucin-Zipper.⁹ Die Transkriptionsfaktoren C/EBP α und c-Jun gehören beide zur Familie der Leucin-Zipper.

1.5 Begriffsklärung

1.5.1 Leucin-Zipper

Leucin-Zipper bestehen aus zwei Domänen, der leucinreichen α -Helix und einer Region mit vor allem basischen Aminosäuren. Die amphipathische α -Helix ist so aufgebaut, dass die hydrophoben Gruppen mit den Leucinen in die eine, geladene Gruppen in die andere Richtung stehen. Die Leucine des einen Proteins schieben sich nun zwischen die Leucine des anderen und bilden eine Art Spirale. Benachbart zur leucinreichen Region befindet sich eine stark basische Region, die sequenzspezifisch an die DNA binden kann. Die beiden Leucin-Zipper bilden eine γ -förmige Struktur, wobei die Leucin-Zipper den Stamm bilden und die basischen Regionen die Arme, die an die DNA binden.

⁸Vgl. Huang et al: Evolution of transcriptional control from prokaryotic beginnings to eukaryotic complexities. 1999

⁹Vgl. Lewin et al: Genes VII. 2000

Im Leucin-Zipper kommt Leucin an jeder 7. Stelle vor. Im C/EBP Protein gibt es 4, im c-Jun Protein 5 Wiederholungen. Bei den so gebildeten Dimeren handelt es sich um ein weit verbreitetes Prinzip von Proteinen, die an spezifische DNA-Sequenzen binden.¹⁰

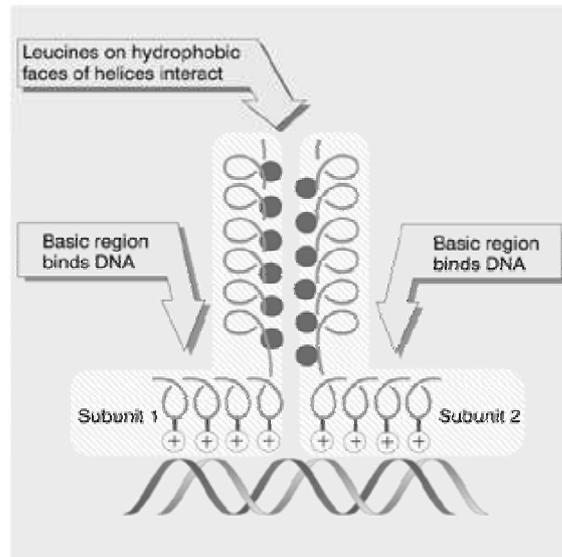


Abb. 3: Schematische Darstellung des Leucin-Zippers¹¹

1.5.2 C/EBPs und C/EBP α

Die CCAAT/Enhancer bindenden Proteine (C/EBPs) gehören einer Familie von Transkriptionsfaktoren an, die sich vor allem durch Sequenzgleichheit >90% in ihrem hoch konservierten C-terminalen Bereich und Variabilität der Isoformen im N-terminalen Bereich auszeichnet. Die C-terminale DNA Bindungs- und Dimerisationsdomäne bZIP wurde in C/EBP α erstbeschrieben. Die bisher identifizierten Isoformen C/EBP α - ϕ - in der Reihenfolge ihrer Entdeckung benannt - können Homo- und Heterodimere mit Familienmitgliedern bilden. Aber auch mit anderen Proteinen, ob mit oder ohne bZIP Motiv, kommen zahlreiche Protein-

¹⁰Vgl. Ramji et al: CCAAT Enhancer Binding Proteins: Structure, Function and Regulation. 2002
Vgl. Hurst et al: Transcription factors: bZIP proteins. 1995

¹¹Schematische Darstellung des Leucin-Zippers
<http://www1.oup.co.uk/best.textbooks/genesVI, Fig 21.15>, entnommen am 14.09.2002.

Protein- Interaktionen vor.¹² Der Familie der C/EBPs werden Schlüsselfunktionen in der Kontrolle von Stoffwechselfvorgängen, der zellulären Proliferation und Differenzierung zugeschrieben.

C/EBP α , das zuerst entdeckte Protein dieser Familie, lässt sich in Fettgewebe, Leber, Darm, Lunge, Nebenniere, mononukleären Zellen im peripheren Blut und in der Plazenta nachweisen. Die höchsten Spiegel fand man in terminal differenzierten Hepatozyten und Adipozyten. Nach Transkription des sich auf Chromosom 19q13.1 befindenden Gens in mRNA können sich zwei Polypeptide mit den Größen 42 kD und 30 kD bilden, wobei letzteres ein niedrigeres Aktivationspotential besitzt. Um die Funktion des Genprodukts besser verstehen zu können, wurden zahlreiche Versuche an den Promotoren der Zielgene, Versuche mit Überexpression oder Hemmung in auf Zellkultur basierenden Systemen und auch Versuche an Knockout-Mäusen durchgeführt.¹³

Die C/EBP α (-/-) Knockout-Mäuse verstarben kurz nach Geburt an schweren hypoglykämischen Stoffwechselfzuständen, die durch verminderte Expression von Genen der Glykogensynthese und der Glukoneogenese zustande kamen. Viele Gene, die in myeloischen Zellen exprimiert werden, enthalten in ihren Promotoren Bindungsstelle für C/EBP α . In Blutuntersuchungen der Knockout-Mäuse konnten weder neutrophile noch eosinophile Granulozyten nachgewiesen werden, während Monozyten, Makrophagen, Erythrozyten, Thrombozyten und Lymphozyten in normaler Anzahl vorhanden waren. Ausgereifte neutrophile Granulozyten machen normalerweise ungefähr 90% der weißen Blutzellzahl neugeborener heterozygoter (-/+) und Wildtyp(+/+)-Mäuse aus.¹⁴

Northern-Blot-Versuche von CD34+ Zellen zeigten, dass die C/EBP α Expression vor allem in myeloischen Vorläuferzellen hoch ist und während der terminalen Differenzierung zu Granulozyten langsam abnimmt. In ausgereiften neutrophilen

¹²Vgl. Landschulz et al: The DNA binding domain of the rat liver nuclear protein C/EBP is bipartite. 1989

Vgl. Cao et al: Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. 1991

¹³Vgl. Ossipow et al: CCAAT/enhancer binding protein mRNA is translated into multiple proteins with different transcription activation potentials. 1993

Vgl. Lekstrom-Himes et al: Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. 1998

¹⁴Vgl. Zhang et al. Absence of G-CSF in C/EBP α knockout mice

Granulozyten kann C/EBP α mRNA noch nachgewiesen werden, in peripheren Monozyten jedoch nicht.¹⁵

Nachdem bekannt war, dass granulozytenspezifische Gene, wie der G-CSF-Rezeptor, die neutrophile Elastase und die Myeloperoxidase von C/EBP α reguliert werden, wurden auch hierzu in den Knockout-Mäusen Untersuchungen durchgeführt. Die Expression der G-CSF-Rezeptor-mRNA war deutlich vermindert, wohingegen die M-CSF-Rezeptor-mRNA (spezifisch für Monozyten) und die GM-CSF-Rezeptor-mRNA der des Wildtyps entsprachen. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass das Fehlen der Granulozyten mit den verminderten G-CSF-Rezeptoren zusammenhängen könnte. In den Kontrollversuchen mit G-CSF-Rezeptor Knockout-Mäusen wurden jedoch Granulozyten gefunden, was bedeutet, dass es neben den G-CSF-Rezeptoren noch weitere wichtige C/EBP α Zielgene geben muss.¹⁶

Neben seinen Funktionen in der Stoffwechselregulation und der Differenzierung wird C/EBP α auch noch eine Wirkung als Tumorsuppressor zugeschrieben. In Zellkulturen konnte durch Überexpression C/EBP α s eine Verminderung der Proliferation gezeigt werden, in den C/EBP α Knockout-Mäusen, war eine verstärkte Proliferationsaktivität in den Hepatozyten nachgewiesen worden.¹⁷

In letzter Zeit wurde herausgefunden, dass C/EBP α mit verschiedenen Proteinen interagiert, die an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt sind. So ist beispielsweise der durch C/EBP α vermittelte Wachstumstopp mit einer vermehrten Expression des Zellzyklushemmers p21 verbunden. C/EBP α kann mit den cyclin-abhängigen Kinasen cdk2 und cdk4 interagieren und über ihre Hemmung das Zellwachstum stoppen. Außerdem wurden Mutationen des C/EBP α Gens in AML-Patienten mit dem Subtyp M2 ohne Expression des Fusionsproteins AML1-ETO beschrieben.¹⁸

¹⁵Vgl. Scott et al: A novel temporal expression pattern of three C/EBP family members in differentiating myelomonocytic cells. 1992

¹⁶Vgl. Radomska et al: CCAAT/Enhancer binding protein alpha is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors. 1998

¹⁷Vgl. Wang et al: C/EBP alpha bypasses granulocyte colony stimulating factor signals to rapidly induce PU.1 gene expression, stimulate granulocytic differentiation, and limit proliferation in 32D cl3 myeloblasts. 1999

¹⁸Vgl. Timchenko et al: CCAAT/Enhancer binding protein a regulates p21 Protein and hepatocyte proliferation in newborn mice. 1997

Vgl. Wang et al: C/EBP α arrests cell proliferation through direct inhibition of cdk2 and cdk4. 2001

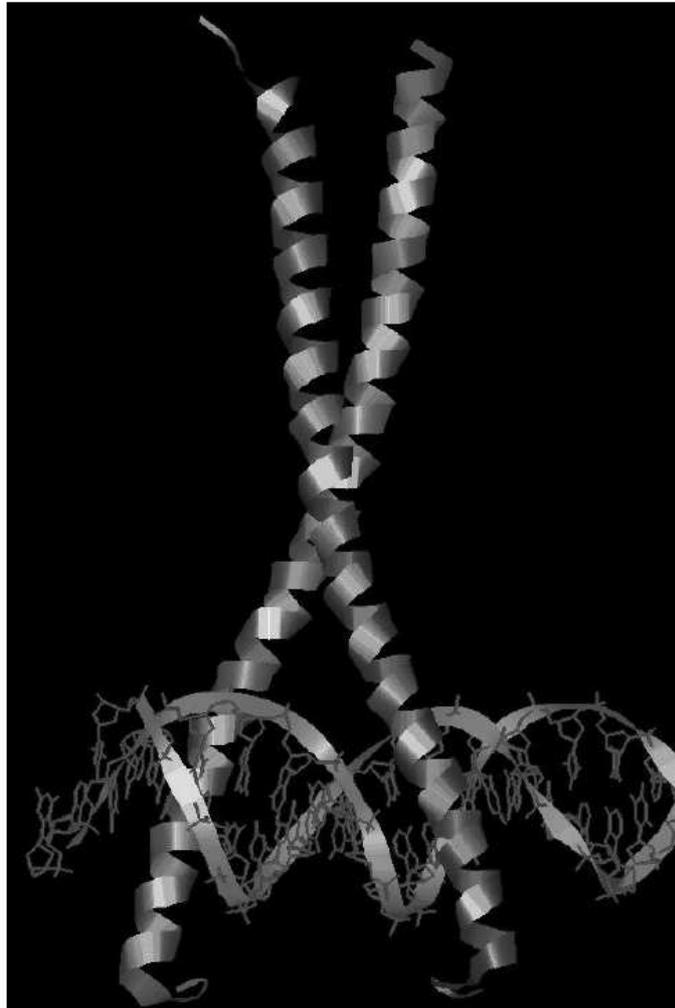


Abb. 4: 3D-Modell der DNA-Bindung von C/EBP Proteinen¹⁹

1.5.3 c-Jun

Der Transkriptionsfaktor c-Jun zählt zur Gruppe der Proto-Onkogene. Allgemein handelt es sich hierbei um Gene, denen besondere Bedeutung sowohl bei der physiologischen Wachstumsregulation als auch bei unkontrollierter Proliferation in der Tumorgenese beigemessen wird.

Wie auch C/EBP α enthält c-Jun als DNA-Bindungsdomäne einen Leucin-Zipper und bildet Homodimere mit anderen c-Jun Proteinen oder Heterodimere beispielsweise

¹⁹ 3D-Modell der DNA-Bindung von C/EBP-Proteinen (hier: C/EBP β). Entnommen aus Ramji et al: CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. 2002

mit Mitgliedern der fos-Familie. Diese Dimere werden dann als Aktivator Protein-1-Transkriptionsfaktorkomplex (AP-1) bezeichnet.

Untersuchungen belegen, dass c-Jun/c-fos Dimere über eine stärkere Bindungsaffinität an die AP-1 DNA-Bindungsstelle in Promotoren verfügen als c-Jun Homodimere.²⁰

Mitglieder der AP-1 Familie sind an vielen zellulären Prozessen beteiligt, so z.B. an der Proliferation, der Apoptose und der Antwort auf Stressreize, wobei die Gene meist bereits sehr früh auf Reize hin vermehrt exprimiert werden.

Auch in der Myelopoese spielt c-Jun eine große Rolle. In bipotenten myeloischen Vorläuferzellen wird im Zuge der Differenzierung zu Monozyten die c-Jun mRNA hochreguliert. Durch stabile Transfektion c-Juns in myeloischen Zelllinien kann eine teilweise Differenzierung zu Monozyten erreicht werden. Es konnte gezeigt werden, dass c-Jun als JNK (Jun N-terminal kinase) unabhängiger Koaktivator von PU.1 fungiert. PU.1 ist ein Transkriptionsfaktor der Ets-Familie, der die Promotoraktivität des monozytenspezifischen M-CSF Rezeptors transaktiviert und somit die Expression des M-CSF Rezeptors hochreguliert.²¹

Im c-Jun Promotor befindet sich eine TRE Region (TPA response element), über die Phorbolester wie z.B. TPA die Promotoraktivität hochregulieren und somit die Differenzierung einer bipotenten myeloischen Zelle in Richtung Monozyt beeinflussen können. In C/EBP α Knockout-Mäusen wurden hohe c-Jun mRNA-Spiegel gemessen.²²

²⁰Vgl. Sassone-Corsi et al: Direct interaction between fos and jun nuclear oncoproteins: role of the 'leucine zipper' domain. 1988

²¹Vgl. Behre et al: Jun is a JNK-independent Coactivator of the PU.1 Transcription Factor. 1999
Vgl. Lord et al: Protooncogenes of the fos/jun family of transcription factors are positive regulators of myeloid differentiation. 1993

Vgl. Sherman et al: Transcriptional and posttranscriptional regulation of c-Jun expression during monocytic differentiation of human myeloid leukemic cells. 1990

²²Vgl. Unlap et al: Upstream regions of the c-Jun promoter regulate phorbol ester-induced transcription in U937 leukemic cells. 1992

1.6 Aufgabenstellung

Die Transkriptionsfaktoren C/EBP α und c-Jun sind unter anderem bedeutend an der Regulation von Genen beteiligt, die über die Differenzierung myeloischer Vorläuferzellen zu Granulozyten bzw. Monozyten entscheiden.

Um besser verstehen zu können, wie die Richtung der weiteren Entwicklung festgelegt wird, soll im Folgenden das Zusammenspiel der beiden Transkriptionsfaktoren C/EBP α und c-Jun näher untersucht werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Reagenzien

Acrylamid- Bisacrylamid	BioRad GmbH, München, Deutschland
Agar	Life Technologies, Paisley, Schottland
Agarose	Life Technologies, Paisley, Schottland
APS	Fluka, Buchs, Schweiz
DMEM	PANBiotech, Aidenbach, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidium Bromid	Life Technologies, Paisley, Schottland
Fetal Bovine Serum	Life Technologies, Paisley, Schottland
Geneticin-sulfat	Life Technologies, Paisley, Schottland
L-Glutamin	Life Technologies, Paisley, Schottland
Glycerin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
β - Mercaptoethanol	Sigma, St.Louis, USA
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natrium Chlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
dNTPs	Promega, Mannheim, Deutschland
PBS	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Life Technologies, Paisley, Schottland
PCR Primer	Metabion, Martinsried, Deutschland
RPMI	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
SDS	Serva, Heidelberg, Deutschland
Temed	Biorad, München, Deutschland
Tris-HCL	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trypsin/ EDTA	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Zinksulfat	Sigma, St.Louis, USA

2.1.2 Reaktionskits

Biorad-Protein-Estimation Kit	Biorad, München, Deutschland
Effectene	Qiagen, Hilden, Deutschland
Fast Start SYBR Green I Kit	Roche Diagnostik, Mannheim, D.
LipofectAMIN plus	GIBCOBRL, Paisley, Deutschland
Luciferase Assay Kit	Promega, Mannheim, Deutschland
Maxiprep DNA-Isolations Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Omniscript RT cDNA Synthese Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Plasmid Isolations Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
TNT-Reticulocyte-lysate-system	Promega, Mannheim, Deutschland

2.1.3 Puffer und Lösungen

Diejenigen Puffer und Lösungen, die nicht durch fertige Kits zur Verfügung gestellt wurden, sind im folgenden aufgeführt:

TBS-Puffer (10 x)	121 g Tris 176 g NaCl 1,6 l dH ₂ O auf pH 8,0 mit HCl bringen
TBST-Puffer	100 ml TBS Puffer 0,25 ml Tween 20 mit dH ₂ O bis 1 l auffüllen
Blotto 2,5 %	2,5 % Milchpulver gelöst in TBST
Blotto 5 %	5 % Milchpulver gelöst in TBST

Tank-Puffer	12 g Tris 57,6 g Glycin 4 g SDS mit dH ₂ O bis 1 l auffüllen
Transfer-Puffer	3 g Tris 14,1 g Glycin 200 ml Methanol 1 g SDS mit dH ₂ O bis 1 l auffüllen
Stripping-Puffer	0,7 ml 2 ME 2 g SDS 6,25 ml 1 M Tris pH 6.8 mit dH ₂ O bis 100 ml auffüllen
Trenngel 10 %	3,3 ml Acrylamid 2,5 ml 1,5M Tris (pH 8,8) 0,1 ml 10 % SDS 0,1 ml 10 % APS 4 µl TEMED 4 ml dH ₂ O
Sammelgel 10 %	0,33 ml Acrylamid 0,25 ml 1 M Tris (pH 6,8) 0,2 ml 10 % SDS 0,2 ml 10 % APS 2 µl TEMED 2 ml dH ₂ O
5 x KCM	0,5 M KCl 0,15 M CaCl ₂ 0,25M MgCl ₂

RIPA Lysier-Puffer (Zell-Lysier-Puffer)	1 %	NP40
	0,5 %	Natriumdeoxycholat
	0,1 %	SDS
	0,15 M	NaCl
	5 mM	EDTA
	50 mM	Tris, pH 8,0
	1 mM	PMSF
	10 µg/ml	Chymostatin
	10 µg/ml	Pepstatin A
	10 µg/ml	Leupeptin A
	10 µg/ml	Aprotinin
	10 µg/ml	Antipain

2.1.4 Enzyme und Marker

RNasin	Promega, Mannheim, Deutschland
Protein rainbow ladder	Biorad, München, Deutschland
Protein Marker	Biorad, München, Deutschland
DNA-Standard	
1 kb ladder	NEB, Frankfurt, Deutschland
100 bp ladder	NEB, Frankfurt, Deutschland

2.1.5 Plasmide und Reporterkonstrukte

c-Jun
C/EBP α
pTK
pTK(C/EBP α)2TK
pGL2
pGL3

Reporter-Konstrukte des menschlichen c-Jun Promotors:

pc-Jun (bp-1789/bp+731)	in pGL3
pc-Jun (bp-952/bp+731)	in pGL3
pc-Jun (bp-719bp+731)	in pGL3
pc-Jun (bp-345/bp+731)	in pGL3
pc-Jun (bp-180/bp+731)	in pGL3
pc-Jun (bp-63/bp+731)	in pGL3
pc-Jun (bp-79/bp+170)	in pGL2
pc-Jun (bp-79/bp+170)	in pGL2 mutiert

pAP-1x7 luc

pAP-1

pAP-1 mut

pRI-0

pCMV5

2.1.6 Primer und Antikörper

c-Jun Sense	5'gca tga gga acc gca tcg ctg cct cca agt 3'
c-Jun Antisense	5'gcg acc aag tcc ttc cca ctc gtg cac act 3'
G6PD Sense	5'ccg gat cga cca cta cct ggg caa g 3'
G6PD Antisense	5'ggt ccc cac gta ctg gcc cag gac ca 3'

Die c-Jun Primer wurden von Kiaris et al übernommen, die G6PD Primer von Emig et al.²³

²³Vgl. Kiaris et al: Inhibition of growth of human malignant glioblastoma in nude mice by antagonists of Bombesin/gastrin-releasing peptide. 1999
Vgl. Emig et al: Accurate and rapid analysis of residual disease in patients with CML using specific fluorescent hybridization probes for real time quantitative RT-PCR. 1999

Primärantikörper: Anti-c-Jun (sc 45)
 Anti-C/EBP α (sc 61)
 Anti- β -Tubulin (sc 9104)

Polyklonales anti-Kaninchen IgG, Santa Cruz Biotechnology

Sekundärantikörper: Protein A, verknüpft mit Meerrettichperoxidase, Amersham,
 Lifescience

2.1.7 Biologische Materialien

2.1.7.1 Bakterien

Escherichia coli DH 5 α

2.1.7.2 Zelllinien

293T	humane, embryonale Nierenkarzinomzellen
F9	embryonale Karzinomzellen der Maus
U937	humane, histiozytische Lymphomazellen
U937 PC18	U937 mit zinkinduzierbarem Methallo-
U937 C/EBP α	thionein-Vektor

2.1.7.3 Patientenproben

Die Patientenproben wurden freundlicherweise vom Labor für Leukämie-Diagnostik, Medizinische Klinik III, Klinikum Großhadern, München zur Verfügung gestellt.

Es handelt sich um Proben der FAB-Klassifikation AML-M2 ohne Translokation t(8;21). Pabst et al sequenzierten diese Proben und beschrieben dominant negative C/EBP α Mutationen.

2.1.8 Kulturmedien

2.1.8.1 Bakterien

LB Medium

2.1.8.2 Zelllinien

Name:

Medium:

293T

DMEM (1,0 g/l Glukose)

10 % FBS

1 % L-Glutamin

1 % Penicillin-Streptomycin

F9

DMEM (4,5 g/l Glukose)

10 % FBS

1 % L-Glutamin

1 % Penicillin-Streptomycin

U937

RPMI 1640

10 % FBS

1 % L-Glutamin

1 % Penicillin-Streptomycin

U937 C/EBP α

zum U937 Medium werden noch

U937 PC18

850 μ g/l G418 als Selektionsmarker

beigefügt

Einfriermedium:

70 % Medium²⁴

20 % FBS

10 % DMSO

²⁴ Je nach Zelllinie: für 293T DMEM (1,0 g/l), für F9 DMEM (4,5 g/l) für U937 RPMI 1640

2.1.9 Sonstiges

Blotting Papier	Schleicher und Schüll, Stuttgart
Membran (Nitrozellulose)	Amersham, Millipore
Pipettenspitzen	Star Labs (K&K Laborbedarf), München
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Greiner, Falcon, München
Zellkulturmaterial	CoStar, Cellstar, Nunc und Greiner
ECL-Filme	Amersham, Braunschweig

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die Kultivierung eukaryoter Zelllinien erfolgte nach Standardmethoden. Die Zellen wurden in Begasungsbrutschränken bei 37 °C, 96 % relativer Feuchte und 5 % CO₂ inkubiert. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer sterilen Arbeitsbank durchgeführt.

2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Lagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt und bei Bedarf wieder aufgetaut. Zum Einfrieren wurden die Zellen zunächst in Suspension gebracht und durch 5-minütige Zentrifugation bei 1000 rpm pelletiert. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium zur Vermeidung von Eiskristallen resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Nunc Cryovials (2 ml) gefüllt und für einige Minuten in einem Eisbad gelagert. Schließlich wurden die Zellen für 3 Tage bei -80 °C und danach in Lagertanks mit flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zum Auftauen von Zellen wurden die gefrorenen Zellaliquots in einem 37 °C Wasserbad auf 4 °C erwärmt. Die Zellsuspension wurde mit 10 ml Vollmedium vermischt. Durch 2-minütige

Zentrifugation bei 1000 rpm wurden die Zellen pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde erneut in Vollmedium aufgenommen. Je nach Zelldichte wurden die Zellen auf 10 oder 15 cm Kulturschalen ausgesät, so dass eine Dichte von 5×10^5 bis $1,5 \times 10^5$ Zellen nicht unterschritten wurde.

2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Um die Zellzahl in den Zellkulturschalen zu bestimmen, wurden die Zellen mit Trypsin enzymatisch von den Schalen abgelöst, mit Medium verdünnt in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und zentrifugiert. Die neue Zellsuspension wurde sorgfältig gemischt und 10 µl hiervon sowie 10 µl Methylenblau auf das Zählfeld einer Neubauer-Zählkammer gegeben. Das Zählfeld wurde mit einem Deckgläschen abgedeckt ausgezählt. Die ermittelte Zellzahl wurde durch 8 dividiert. Dieser Wert entspricht multipliziert mit 10^4 der Zellzahl/ml.

2.2.2 RNA-Extraktion

Für die RNA-Extraktion verwendeten wir den RNeasy Kit von Qiagen. 3×10^6 Zellen wurden 5 min bei 300 g zentrifugiert, in PBS gewaschen und wieder zentrifugiert, um sicherzugehen, dass kein Medium mehr vorhanden war. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt und das Pellet in 350 µl Puffer RLT gelöst, auf die QIAshredder-Säule gegeben, durch Zentrifugation homogenisiert und in 70%igem Ethanol gelöst. Die Probe wurde auf der RNeasy-mini Spin-Säule aufgebracht, die RNA durch Zentrifugation von der Membran absorbiert. Nach Waschen und Zentrifugation mit den Puffern RW1, RPE konnte die RNA aus der Membran mit RNase-freiem Wasser herauszentrifugiert werden. Ihre Konzentration wurde mithilfe photometrischer Messungen bestimmt.

2.2.3 Reverse Transkription

Durch den Einsatz von retroviralen reversen Transkriptasen ist es möglich, aus RNA wieder DNA, nun cDNA genannt, zu erzeugen. Somit kann die PCR-Technik auch für die RNA-Analytik angewendet werden.

Wir verwendeten gemäß dem Omniscript® RT cDNA Synthese Kit, folgendes Protokoll:

dNTPs	2 µl (5 mM)
RNA	1 µl
RT Puffer	2 µl
Oligo-dT	2 µl (10 µM)
RNase-Inhibitor	1 µl (10 U)
Omniscript rT	1 µl
RNA	1 µl
RNase freies dH ₂ O	11 µl

Die reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Die angefertigte Lösung wurde für 90 min bei 37 °C inkubiert und dann bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.4 Realtime-Polymerase-Ketten-Reaktion

Bei der quantitativen Realtime-PCR mit dem LightCycler™ –System (LC) wird die Amplifikation von Sequenzen und ihre Analyse in einem Schritt durchgeführt. In den PCR-Zyklen steigt, wie auch bei der qualitativen PCR, das Produkt logarithmisch an, die Realtime-Methode bietet jedoch den Vorteil, dass die Ausgangskonzentration der Templet-DNA errechnet werden kann. Wir verwendeten den Start DNA SYBR Green I-Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) als Mastermix. SYBR Green I ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an die frisch gebildete doppelsträngige DNA bindet und Fluoreszenz aussendet. Diese Signale, die proportional zur DNA-Menge sind, werden nach Ende jeder Elongationsphase bei 530 nm gemessen, und somit kann der Anstieg

des PCR-Produktes nach jedem Zyklus in Echtzeit beobachtet werden. Dem letzten PCR-Zyklus folgt eine Schmelzkurvenanalyse. Hierbei kann das PCR-Produkt anhand seiner spezifischen Schmelztemperatur, die sich aus der Zusammensetzung der Nukleotide ergibt, erkannt und von unspezifischen Produkten, wie z.B. den Primer-Dimeren oder anderen Artefakten, unterschieden werden.

Wir quantifizierten die nach reverser Transkription zu cDNA umgeschriebene mRNA-Expression des Transkriptionsfaktors c-Jun sowohl in der myeloischen Zelllinie U937 als auch in Patientenproben. Bei jeder Probe bestimmten wir außer der c-Jun Expression auch noch die Konzentration des „Housekeeping-Gens“ G6PD, um die Abweichungen während der cDNA-Synthese auszugleichen zu können. Für das G6PD-Plasmid erstellten wir eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 10000 fg, 1000 fg, und 100 fg je μl .

So war es möglich, die Konzentrationen des „Housekeeping Gens“ in Bezug auf seine Standardkurve zu setzen, und das Zielgen zu quantifizieren, indem wir es in Relation zum „Housekeeping Gen“ (Zielgen/G6PD) setzten.

Das G6PD-Plasmid wurde uns freundlicherweise von A. Hochhaus zur Verfügung gestellt.

Für die zinkinduzierbare C/EBP α U937-Zelllinie verwendeten wir als Kontrolle den leeren Metallothionein-Vektor. Die Patientenproben, alle als AML vom FAB-Subtyp M2 ohne Translokation t(8;21) klassifiziert, unterteilten wir in zwei Gruppen: Proben mit C/EBP α Mutation und Proben ohne C/EBP α Mutation

Reaktionsansatz:

Das Gesamtvolumen des einzelnen Reaktionsansatzes betrug 20 μl und enthielt folgende Reagenzien:

Mastermix von (Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green

RocheDiagnostics, Mannheim)	2 μl
cDNA ²⁵	2 μl / 1 μl
MgCl ₂	4 mM
Forward und Reverse Primer je	0,75 μM

²⁵Für die PCR mit cDNA der Zelllinien (U937 Zn C/EBP α , U937 pPC18) verwendeten wir 2 μl , bei Patientenproben 1 μl . Die Konzentration war je 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	5 mM
dH ₂ O	auf 20 µl gebracht

Programm:

Denaturierung:	95 °C für 10 min
Aktivierung der Polymerase:	95 °C für 0 s
Anheften der Primer:	64 °C für 10 s
Extension:	72 °C für 25 s

Es wurden je 35 Zyklen durchgeführt.

Schmelzkurve:

Die Produkte wurden bei 95 °C denaturiert, auf 58 °C abgekühlt und dann langsam wieder auf 95 °C erhitzt, wobei in Schritten von 0,2 °C die Fluoreszenz bestimmt wurde. Im Anschluß erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der Reaktionsprodukte in einem 1%igem Agarosegel mit Ethidiumbromid, um sich nochmals der Größe der amplifizierten Fragmente zu versichern (c-Jun 400 bp, G6PD 340 bp).

2.2.5 Transiente Transfektion eukaryoter Zellen

Das Einführen von DNA in eine eukaryote Zelle wird als Transfektion bezeichnet. Bei der transienten Transfektion soll es dabei zur einer vorübergehenden Expression eines Gens kommen. Der Quantifizierung der Genexpression nach der Transfektion erfolgt mit Hilfe des Luciferase-Reportergens.

2.2.5.1 Transiente Transfektion adhärenter Zellen mit LipofectAMIN

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen mit Trypsin enzymatisch vom Boden der Kulturflasche gelöst, gezählt und in der Konzentration 2×10^4 Zellen/0,5ml Medium je Vertiefung in 24-Lochplatten plattiert. Penstrep, FBS und Glutamin wurden am Tag der Transfektion dem DMEM Medium nicht beigesetzt, um eine erhöhte Transfektionrate zu erreichen. Je Vertiefung wurde maximal eine DNA

Konzentration von 0,1 µg/µl gewählt, welche sich aus der internen Transfektionskontrolle pRI-0, dem Promoter, den Expressionsvektoren der Transkriptionsfaktoren und dem Auffüllvektor pCMV5 zusammensetzte.

Die mit Medium verdünnte DNA wurde mit dem PLUS-Reagenz komplexiert, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit LipofectAMIN-Reagenz vermischt und weitere 15 min bei Raumtemperatur belassen. Es bilden sich Liposome aus, die später durch Fusion mit der Zellmembran ins Zellinnere gelangen. Der DNA-PLUS-LipofectAMIN-Komplex wurde zu den mit reinem Medium gewaschenen Zellen gegeben, sanft vermischt und im Inkubator bei 37 °C und 5%iger CO₂-Sättigung für 3 h belassen. Nach diesen 3 h wurde normales Medium (jedoch 20 % FBS) hinzugegeben.

24 h nach der Transfektion erfolgte die Aktivitätsbestimmung des Reportergens mit dem Dual-Luciferase-Reporter-Assay.

2.2.5.2 Transiente Transfektion gelöster Zellen mit Effectene

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen mit einer Konzentration von 1×10^6 / 2 ml in je 6-Lochplatten plattiert. Das Medium enthielt weder Antibiotika, FBS noch Glutamin. Die DNA, gleiche Konzentration wie bei adherenten Zellen, wurde in Effectene Puffer verdünnt, 10 µl Enhancer wird zugegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, es werden weitere 15 µl Effectene-Reagenz beigemischt, gefolgt von einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur.

Nach 24 h folgte der Dual-Luciferase-Reporter-Assay

Bei Versuchen mit TPA wurden 100 ng nach 12 h zugegeben und nach einer Einwirkzeit von 24-30 h geerntet.

2.2.6 Dual-Luciferase™ Reporter-Assay

Der Luciferase-Assay erlaubt eine quantitative Analyse der Faktoren, welche die Expression eukaryoter Zellen beeinflussen. Das Prinzip dieses Assays beruht auf der Messung der Photonen, die durch katalytische Oxidation des Luciferins entstehen. Es

finden 2 verschiedene Luciferasen Anwendung: die Firefly Luciferase (*Photinus pyralis*), die als Reporter im verwendeten Promotor vorhanden ist, und die Renilla Luciferase (*Renilla reniformis*), die als Kontrollreporter kotransfiziert wird. Der Versuchsreporter spiegelt die Wirkung der spezifischen Bedingungen im Bereich der Genexpression wider, die Aktivität des kotransfizierten Kontrollreporters stellt eine interne Kontrolle dar, durch welche die Werte normalisiert werden können (pRI-0). Der Luciferase-Assay wurde gemäß den Benutzerinformationen der Firma Promega durchgeführt.

24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen, unter Zugabe von 50 µl „passiv lysis buffer“ für 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt und lysiert. Für die erste Messung (Firefly Luciferase) wurden 20 µl des Lysats entnommen und 50 µl LAR II (Luciferase-Assay-Reagent II) hinzugefügt. Für die Messung der Renilla Luciferase wurden 50 µl Stop and Glo zugegeben und vermischt. Das Verhältnis zwischen Firefly und Renilla Luciferase wurde vom TD20/20 Luminometer automatisch errechnet.

2.2.7 Proteinbestimmung mit dem Bio-Rad-Assay

Der Bio-Rad-Assay nach Bradford ermöglicht die Konzentrationsbestimmung von Proteinen. Je 1 µl Probe wurde zu 1 ml Bio Rad-Assay gegeben und anschließend photometrisch die Absorption bei 595 nm gemessen.

Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte durch Vergleich mit der Eichgeraden, die aus BSA Lösungen bekannter Konzentration erstellt wurde.

2.2.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine lassen sich in einem Acryamidgel nach ihrer Molekülmasse auftrennen. Es wurden vertikale Gelapparaturen verwendet, wobei oberhalb des Trenngels eine Schicht niedrigprozentiges Sammelgel angebracht wurde, um die Proteine zu einer Front zusammenzuschieben. Nach Erreichen des Trenngels erfolgte die Auftrennung. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von APS und Temed gestartet. Das frisch

gegossene Trenngel wurde mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu gewährleisten. Nach der Polymerisation und dem Entfernen des Alkohols wurde das Sammelgel eingegossen und ein Kamm eingebracht.

Vor der Elektrophorese denaturierten wir 100 ng Protein mit beigefügtem Loading Puffer für 5 min bei 95 °C und legten eine Spannung von 110 Volt für 1 h an. Zur Molekulargewichtsabschätzung wurde ein vorgefärbter Proteinstandard (Rainbow-Protein-Molekulargewichtsmarker) mit aufgetrennt.

2.2.9 Western Blot

Diese Methode erlaubt es, die in der SDS-Gel-Elektrophorese aufgetrennten Proteine mit spezifischen Antikörpern nachzuweisen, und ihre Konzentration in semiquantitativer Weise zu bestimmen.

Die Proteine werden elektrophoretisch vom SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran überführt, an welche sie fest gebunden sind. Diese Membran wird dann mit Antikörpern inkubiert, die spezifisch gegen das nachzuweisende Protein gerichtet sind. Die Bindung des spezifischen Antikörpers wird durch einen zweiten Antikörper, der gegen den konstanten Teil des ersten Antikörpers gerichtet ist, sichtbar gemacht. An den zweiten Antikörper ist eine Peroxidase gekoppelt. Nach Zugabe von Luminol/Oxidanz kann die Emission auf einem Film als Schwärzung gesehen werden.

Die Membran wurde genau auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten, kurz in Methanol eingetaucht und anschließend für 15 min im Transfer-Puffer belassen, um eine vollständige Benetzung zu erreichen. Der Transfer erfolgte mit einer Blotting-Apparatur von Bio-Rad.

Das Blotting-Sandwich, bestehend aus Schwamm, Filterpapier, Gel, Nitrozellulosemembran, Filterpapier und Schwamm, wurde in die Apparatur zwischen Kathode und Anode eingebracht. Unter guter Kühlung konnten im Transfer-Puffer bei einer Spannung von 100 V für 90 min nun die Proteine auf die Membran aufgebracht werden.

Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermindern, wurde die Membran für 2 h bei Raumtemperatur in 5%igem Blotto blockiert. Danach erfolgte dreimal

5-minütiges Waschen in 2,5 % Blotto und die Inkubation mit dem ersten Antikörper in 2,5 % Blotto bei 4 °C und konstanten Schüttelbewegungen über Nacht. Die Konzentration des spezifischen Antikörpers betrug 1:2000.

Die Membran wurde nochmals dreimal in 2,5 % Blotto gewaschen und mit dem zweiten Antikörper, der an den Fc-Teil des ersten Antikörpers bindet, für 1 h in 2,5%igem Blotto inkubiert. Es folgte erneutes Waschen zuerst in Blotto, dann in TBST allein.

Die Entwicklung verlief nach Herstelleranweisung durch Zugabe von je 1 ml der beiden ECL und ECL+ Reagenzien. Die erzeugte Chemilumineszenz wurde durch Exposition der Membran auf ECL-Hyperfilm dokumentiert.

2.2.10 Stripping-Verfahren

Um die gleichzeitige Expression mehrerer Proteine auf der Membran nachweisen zu können - C/EBP α , c-Jun, und auch das als interne Ladungskontrolle fungierende β -Tubulin - musste die vorherige Antikörperbindung wieder gelöst werden. Hierfür wurde das Stripping-Verfahren verwendet.

Die Membran wurde 40 s in Methanol, dann zweimal 5 min in dH₂O eingelegt und anschließend 30 min bei 60 °C unter Drehbewegungen im Stripping-Puffer belassen.

Nach zweimaligem Waschen in TBST bei Raumtemperatur konnte wieder wie gewohnt geblockt werden.

2.2.11 Zinkinduktion

In der zinkinduzierbaren U937 C/EBP α Zelllinie unterliegt die C/EBP α cDNA Expression der Kontrolle des menschlichen Metallothionein-Promotors. Dieser ist in den Expressionsvektor pPC18 kloniert. Die Expression C/EBP α s wird durch Zugabe von 100 μ M Zn²⁺ zum Kulturmedium hervorgerufen.

Am Tag vor der Induktion wurden die Zellen gezählt und in 2×10^5 Zellen/ml/100ml in den Kulturflaschen verdünnt. Dem Medium muss der Selektionsmarker G418 beigefügt sein. Am nächsten Tag wurde Zink hinzugegeben.

Zu den gewünschten Zeitpunkten (0, 4, 8, 12, 16 h) wurden nun 20 ml entnommen, bei 100 rpm für 5 min zentrifugiert, mit PBS gewaschen und schließlich mit 100 µl RIPA-Lysat versetzt, gut mit dem Vortex-Gerät durchmischt und bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.12 Lyse eukaryoter Kulturzellen

Durch Zugabe von RIPA-Puffer wurden die Membranen der Zellen aufgelöst und die Proteasenaktivität inhibiert. Somit blieben die zytosolischen Proteine zum Zeitpunkt der Lyse erhalten und konnten zur quantitativen Analyse dem Western Blot Verfahren zugeführt werden.

Das bei -80 °C gefrorene Lysat wurde auf Eis aufgetaut und dreimal alle 10 min gut mit dem Vortex-Gerät mechanisch durchmischt und im Anschluß bei 4 °C und 14000 rpm für 30 min zentrifugiert. Als Sediment fielen die Zelltrümmer an, der Überstand konnte in Eppendorfgefäße gegeben, und der Proteinkonzentrationsbestimmung zugeführt werden.

2.2.13 Gewinnung von Plasmiden

2.2.13.1 Transformation

Die Transformation des Escherichia coli Stamms DH5α mit Plasmiden wurde nach der Methode von Chang und Miller durchgeführt. Hierbei wurden 100 ng DNA mit KCM auf 100 µl verdünnt, zu 100 µl auf Eis aufgetauten Bakterien gegeben. Das Gefäß wurde vorsichtig gemischt und zuerst 20 min auf Eis und im Anschluss 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 800 µl LB Broad-Medium erfolgte eine 60-minütige Inkubation bei 37 °C unter konstanten Schüttelbewegungen. Die Bakterien wurden bei 5000 rpm für 5 min herunterzentrifugiert und 900 µl des Überstandes abgegossen. Nach Wiederauflösung des Pellets in den verbleibenden 100 µl wurden die Bakterien dünn auf bereits vorbereiteten Petrischalen aufgetragen. In den Plasmiden war als Selektionsmarker das Gen für die Ampicillinase enthalten.

Somit konnten Bakterien, die das Plasmid aufgenommen und exprimiert hatten, positiv über das im Agar enthaltene Ampicillin selektioniert werden.

2.2.13.2 Inokulation und Plasmid-Präparation

Nach Kultur der E. coli über Nacht im Inkubator wurde eine Kolonie mit der Impföse entnommen und in 200 µl Flüssigmedium inokuliert und für 12 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Zur Präparation der Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen verwendeten wir den QIAGEN Plasmid Maxi Kit.

Die Bakteriensuspension wurde zentrifugiert, der Überstand abgegossen, das Sediment im Puffer P1 gelöst. Nach Zugabe des Puffers P2 wurde vorsichtig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. In Gegenwart des enthaltenen Detergenzes SDS kam es zur Auflösung der Zellmembranen, RNase A degradierte die bakterielle RNA und NaOH denaturierte Proteinbestandteile der Bakterienzelle.

Der Puffer P3 wurde hinzugegeben und vorsichtig vermengt und auf Eis inkubiert. Das entstehende Präzipitat aus Zelltrümmern mit daran gebundener genomischer DNA, denaturierten Proteinen, Detergenz und Salz wurde abzentrifugiert, der Überstand auf eine mit QBT-Puffer äquilibrierte Qiagen-Tip-Säule gegeben. In der Anionenaustauschersäule wurde die Plasmid-DNA absorbiert und zweimal mit dem QC-Puffer gewaschen. Nach Zugabe des QF-Puffers wurde die Plasmid-DNA aus der Säule herauslöst, mit Isopropylalcohol präzipitiert und zentrifugiert. Die entstandenen Pellets wurden mit 70%igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, anschließend luftgetrocknet und im TE-Puffer gelöst.

2.2.13.3 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch durch die Bestimmung der Absorption bei 260 nm. Für doppelsträngige DNA entspricht eine Konzentration von 50 µg/ml einer optischen Dichte von 1 nach Durchtritt der Strahlung durch eine 1cm dicke Quarzküvette. Für einzelsträngige DNA und RNA liegt die entsprechende Konzentration bei 40 µg/ml. Die Bestimmung der Absorption bei 280 nm und die Bildung des Quotienten aus beiden Werten gibt einen

Anhaltspunkt bezüglich der Reinheit der Präparation. Eine ausreichend reine Präparation sollte einen Quotienten A260/A280 von $1,8 \pm 0,2$ aufweisen.

2.2.14 In-vitro Translation

Bei der in-vitro Translation wurde die mRNA-Nukleotid-Sequenz über eine isolierte Translationsmaschinerie in die Aminosäuresequenz übertragen. Wir verwendeten das TNT® Reticulo Lysate System (Promega).

Für einen Reaktionsansatz von 50 µl wurden benötigt:

R.R.R	25 µl
TNT Puffer	2 µl
a.a-met	1 µl
a.a-leu	1 µl
RNAasin	1 µl
DNA	1 µl
RNA-Polymerase	1 µl
dH ₂ O	18 µl

Nach vorsichtigem Vermengen der Reagenzien wurden sie bei 30 °C für 90 min inkubiert. Als Negativkontrolle wurde die Reaktion auch ohne DANN durchgeführt. Je nach Plasmid fanden verschiedene RNA-Polymerasen Verwendung: für c-Jun die Polymerase SP6, für C/EBPα die Polymerase T7.

3 Ergebnisse

3.1 Gegensätzliche C/EBP α und c-Jun Expression

Monozyten und Granulozyten entwickeln sich aus den gleichen Vorläuferzellen. Es stellt sich nun die Frage, über welche molekularen Mechanismen entschieden wird, in welche Richtung sich eine myeloische Zelle weiter differenziert. Der M-CSF, der für das Wachstum und die Differenzierung zu mononukleären Phagozyten/Makrophagen benötigt wird, reguliert die c-Jun Expression.²⁶

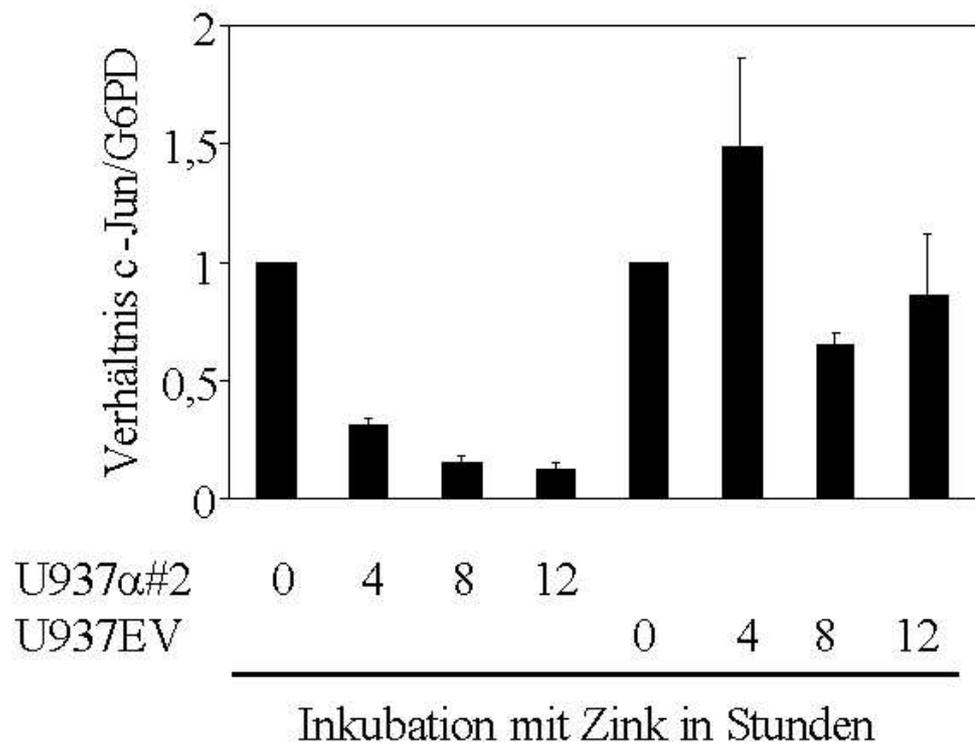
C/EBP α ist gemäß Radomska et al entscheidend, um bipotente myeloische Zellen zu Granulozyten werden zu lassen. Nachdem bereits in nicht-myeloischen Zellen gegensätzliche Expressionsmuster von C/EBP α und c-Jun Erwähnung fanden, ohne jedoch näher untersucht zu werden, stellt sich auch in den myelomonozytischen Zellen die Frage nach dem Zusammenhang von C/EBP α und c-Jun.²⁷

Wir verwendeten nun das in-vitro Modell einer U937 Zelllinie, die nach Zinkinduktion C/EBP α exprimiert. Als Kontrolle diente uns dieselbe Zelllinie mit leerem Vektor (PC18). Vereinbar mit früheren Untersuchungen verhält sich die c-Jun mRNA auch hier gegensätzlich zum induzierten C/EBP α . Die stärkste Abnahme der c-Jun mRNA wurde in den ersten 4 Stunden nach Inkubation mit Zink beobachtet (Abb. 5).

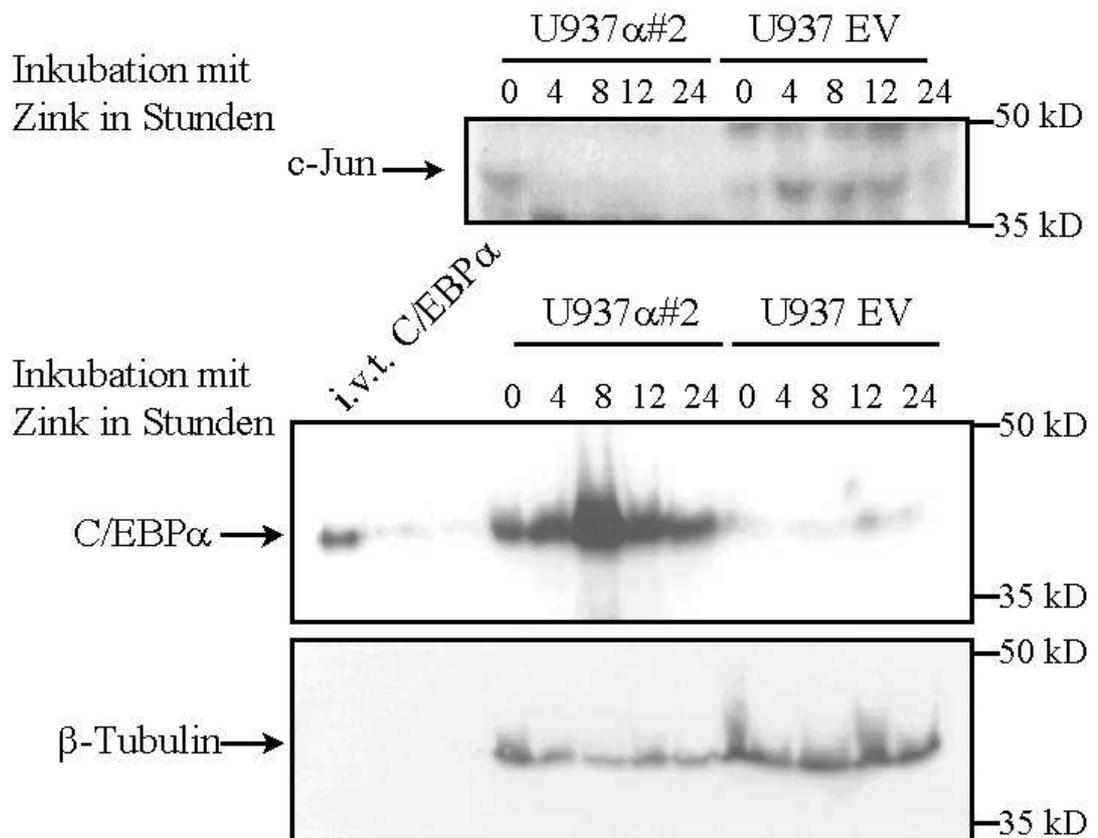
Bei der Analyse auf Proteinebene mit RIPA-Zellysaten bestätigte sich dieses Phänomen. Mit Anstieg des C/EBP α Proteins reduzierte sich der c-Jun Spiegel. Die stärkste Abnahme fand sich auch hier in den ersten 4 h. C/EBP α nahm vor allem zwischen Stunde 4 und 8 nach Induktion stark zu. Als Positivkontrollen verwendeten wir in-vitro translatiertes C/EBP α und c-Jun Protein, als Ladungskontrolle das Zytoskelett-Protein β -Tubulin, das sich in allen Banden mit konstanter Schwärzung darstellt. Zur ungefähren Bestimmung der Proteingröße ließen wir eine standardisierte `rainbow ladder` mitlaufen, daher die Markierungen 350 kD (Abb. 6).

²⁶ Vgl. Nakamura et al: Regulation of jun and fos gene expression in human monocytes by the macrophage colony-stimulating factor. 1991

²⁷ Vgl. Flodby et al: Increased hepatic cell proliferation and lung abnormalities in mice deficient in CCAAT/enhancer binding protein alpha. 1996

Abb. 5**Abb. 5: Gegensätzliche mRNA-Expression von C/EBPα und c-Jun**

U937α#2 und U937 EV (leerer Vektor) wurden mit 100 μM Zinksulfat induziert. Die RNA wurde zu den Zeitpunkten 0, 4, 8, 12, und 24 h gewonnen. Für die Realtime-PCR wurde cDNA aus 1 μg RNA hergestellt. Die Primer für c-Jun und C/EBPα waren spezifisch.

Abb. 6**Abb. 6: Gegensätzliche Proteinexpression von C/EBPα und c-Jun**

Im Western Blot Verfahren wird die Expression von c-Jun und C/EBPα aus Proteinextrakten aus U937α#2 und U937 EV Zelllinien zu den Zeitpunkten 0, 4, 8, 12 und 24 Stunden gezeigt. Die Immundetektion wurde mit c-Jun und C/EBPα spezifischen Antikörpern durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde in-vitro translatiertes C/EBPα (i.v.t.), als Ladungskontrolle β-Tubulin verwendet.

3.2 C/EBP α reguliert die c-Jun Promotoraktivität dosisabhängig herunter

Nachdem nun auf mRNA- und Proteinebene gezeigt war, dass C/EBP α die c-Jun Expression negativ reguliert, stellte sich die Frage, über welchen Mechanismus dieser Vorgang ausgeübt wird. Rangatia et al konnten in verschiedenen Zelllinien (CV.1, NIH3T3, 293E1A, CHO und Hela) zeigen, dass bei Kotransfektion des Transkriptionsfaktors C/EBP α die c-Jun Promotoraktivität herunterreguliert wird. Zur weiteren Klärung des Mechanismus untersuchten wir die Dosisabhängigkeit dieses Vorgangs in myeloischen U937 Zellen. Hierzu kotransfizierten wir zum c-Jun Promotor C/EBP α Konzentrationen in aufsteigender Reihenfolge (von 0.02 μ g bis 0,1 μ g). Es kann ein zunehmender Abfall der Promotoraktivität beobachtet werden, wobei die Aktivität bei Zugabe 0,02 μ g C/EBP α am stärksten sank. Weitere Steigerung der C/EBP α Konzentrationen bis auf 1 μ g lassen eine langsame Sättigung der Interaktionspartner vermuten

Als Kontrolle des Vektoreffekt diente der leere pGL3 Vektor (Abb. 7).

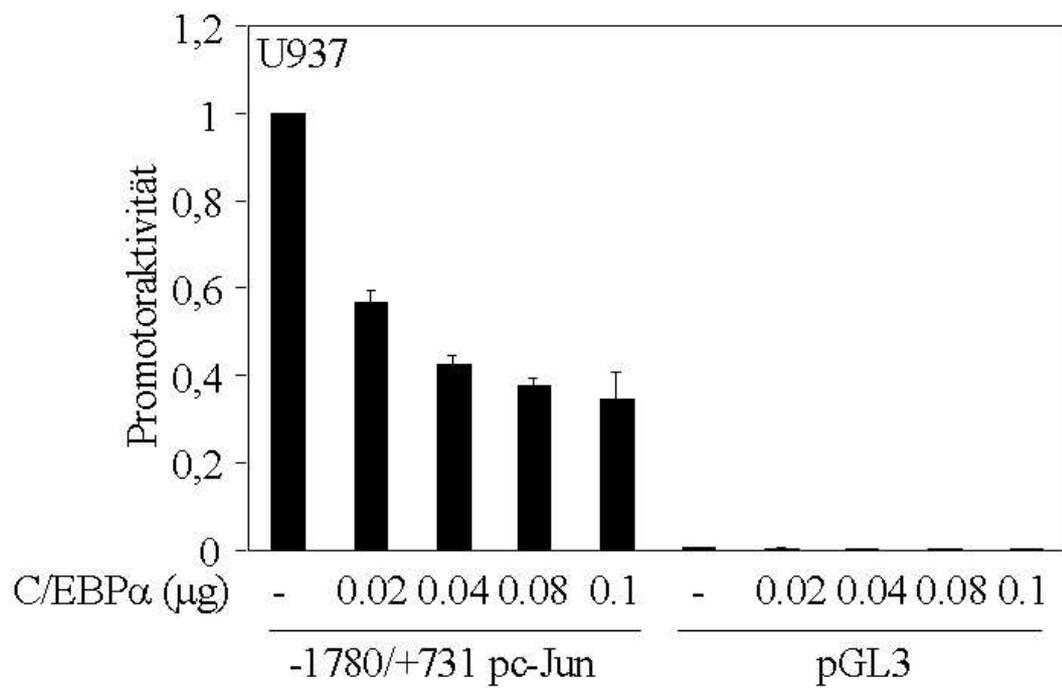
Abb. 7

Abb. 7: C/EBPα reguliert die Aktivität des c-Jun Promotors konzentrationsabhängig herunter
 1×10^6 U937 Zellen pro Loch in 6-Lochplatten wurden mit 0,55 μg des c-Jun Promoterkonstrukts (bp-1780/bp+731) oder pGL3 und ansteigendem C/EBPα Expressionsvektor und 0,05 μg pRL-0 transfiziert. Es wurde das Effectene Protokoll verwendet.

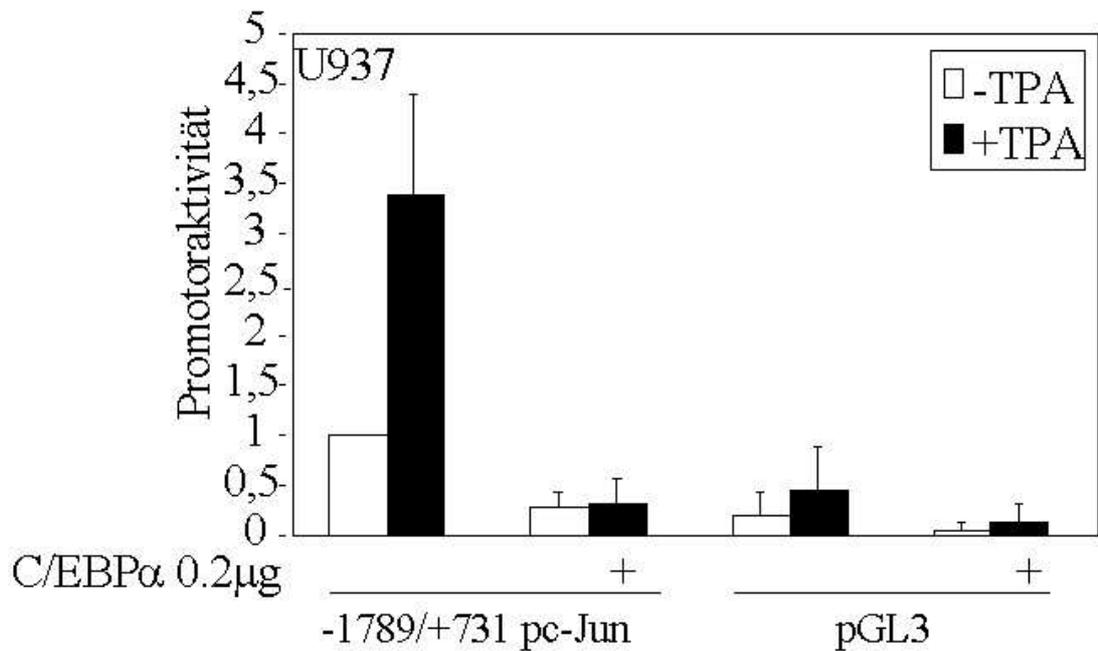
3.3 C/EBP α blockiert die durch TPA induzierte c-Jun Promotoraktivität

Radomska et al konnten zeigen, dass C/EBP α die Fähigkeit besitzt, die durch TPA induzierte monozytische Differenzierung in myeloischen U937 Zellen zu blockieren. Nun ist bekannt, dass TPA die c-Jun Expression induziert.²⁸

Uns stellte sich jetzt die Frage, ob C/EBP α die durch TPA induzierte c-Jun Promotoraktivität und somit vermutlich auch die weitere Differenzierung zu Monozyten blockieren kann. Um dies zu untersuchen, wählten wir folgenden Versuchsaufbau:

Als Promotor diente uns das (bp-1780/+731) c-Jun Promotor-Konstrukt, als Kontrolle der leere Grundvektor pGL3. Die erste Versuchsanordnung wurde nur mit C/EBP α kotransfiziert, die zweite Versuchsanordnung wurde zusätzlich 24 h nach der Kotransfektion mit 100 ng TPA behandelt. Wie in Abb. 8 gezeigt, wird der c-Jun Promotor durch TPA aktiviert. C/EBP α reguliert nicht nur die c-Jun Promoteraktivität herunter, sondern blockiert auch noch den durch TPA induzierten Anstieg der c-Jun Promotoraktivität.

²⁸ Vgl. Lamph et al: Induction of protooncogene JUN/AP-1 by serum and TPA. 1988

Abb. 8**Abb. 8: C/EBP α blockiert die TPA induzierte c-Jun Promotoraktivität**

1 x 10⁶ U937 Zellen pro Loch in 6-Lochplatten wurden mit 0,55 μ g des c-Jun Promotor-Konstrukts (bp-1780/bp+731) oder pGL3, mit 0,4 μ g Expressionsvektor C/EBP α oder leerem Vektor und 0,05 μ g pRL-0 transfiziert. 12 h nach der Transfektion wurde 100 ng TPA zu den entsprechenden Zellen gegeben, und für weiter 24-30 h bei 37 °C inkubiert. Die schwarzen Säulen stellen die Ergebnisse der Versuche mit TPA, die weißen ohne TPA dar. Die Ergebnisse sind das Mittel aus drei unabhängigen Versuchen.

3.4 Kartographie des c-Jun Promotors zur Identifikation der Region, die für die C/EBP α vermittelte Herunterregulation entscheidend ist

Bisher wurde beobachtet, dass C/EBP α die c-Jun Promotoraktivität herunterreguliert, aber der Mechanismus war noch ungeklärt. So wäre durchaus möglich, dass C/EBP α seine Wirkung über eine Bindungsstelle im c-Jun Promotor ausüben würde.

Um die Lokalisation der von C/EBP α vermittelten Wirkung genauer zu untersuchen, wurden verschiedene 5' cJun Promotor-Deletions-Konstrukte verwendet. Die transiente Transfektion der Konstrukte wurde in F9 Zellen durchgeführt. Wie auch schon von Wei et al beschreiben, besitzen die verschiedenen 5' Deletionskonstrukte unterschiedliche Transkriptionsaktivitäten, meist niedriger als die des längsten Promotors mit bp-1780/+731.²⁹ Die Aktivität aller c-Jun Deletionskonstrukte, bis auf die des kürzesten (bp-63/+731), wurde durch die Anwesenheit von C/EBP α herunterreguliert. Diesem Konstrukt, im Schema mit der Nummer 6 bezeichnet, fehlen nach heutigem Wissensstand die meisten regulatorischen Regionen.

Aus den Daten, die ergeben, dass das bp-180/+731 c-Jun Promotorkonstrukt noch immer von C/EBP α herunterreguliert wird, schließen wir, dass die Region, die entscheidend für die von C/EBP α vermittelte transkriptionelle Herunterregulation ist, sich zwischen bp-180 und bp-63 befinden muss. Hierin sind folgende DNA-Bindungsstellen enthalten: die proximale AP-1, eine CTF und eine Bindungsstelle für Sp-1 Transkriptionsfaktoren.

In Abb.9D wird die Abfolge der Bindungsstellen für die verschiedenen Faktoren in der Region zwischen bp-180 und bp-63 schematisch dargestellt.

Bestätigt wurden diese Ergebnisse von Rangatia et al in der Zelllinie 293E1A.

²⁹Vgl. Wei et al: Transrepression of c-Jun gene expression by the glucocorticoid receptor requires both AP-1 sites in the c-Jun promoter. 1998

Abb. 9

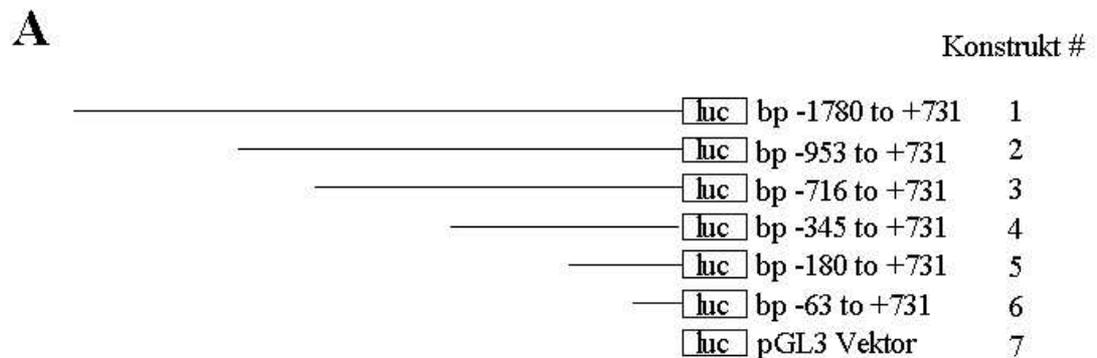
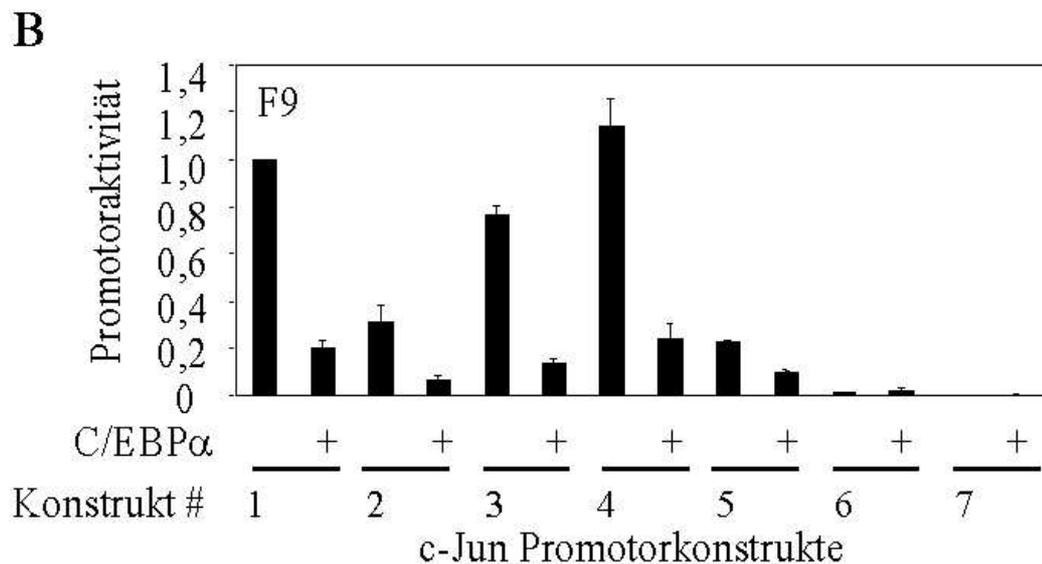


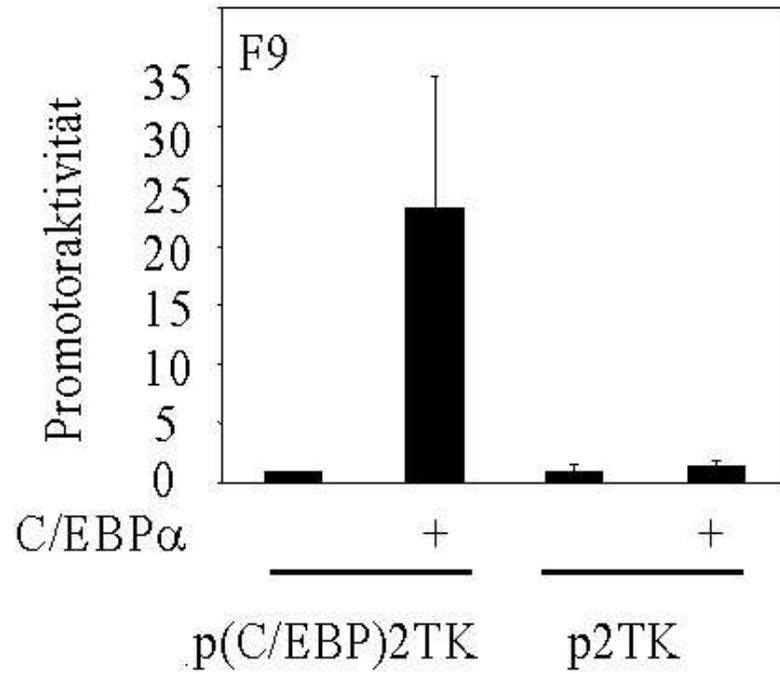
Abb. 9: Kartographie des c-Jun Promotors und Identifikation der für die C/EBP α vermittelte Herunterregulation entscheidenden Region

A: Schematische Darstellung der verschiedenen c-Jun Promotor 5' Deletionskonstrukte, die für die transienten Transfektionen verwendet wurden.



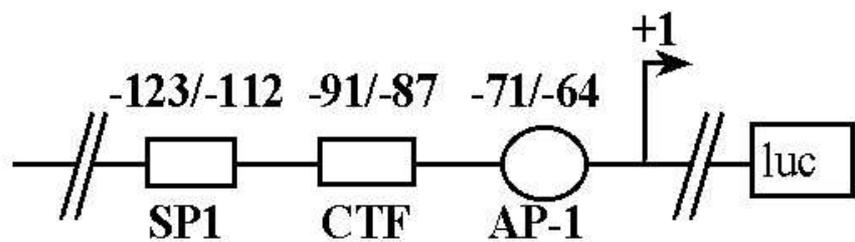
B: 1×10^4 F9 Zellen je Vertiefung in 24-Lochplatten wurden mit $0,25 \mu\text{g}$ der c-Jun Promotor 5' Deletionskonstrukte (bp1780/+731, bp-953/731, bp-716/+731, bp-345/+731, bp-180/+731 und bp-63/+731) und pGL3 mit oder ohne $0,2 \mu\text{g}$ C/EBP α oder leerem Expressionsvektor und $0,05 \mu\text{g}$ pRL-0 transfiziert.

C



C: Die Wirkung der transienten Kotransfektion von C/EBP α auf die Positivkontrolle p(C/EBP α)2TK-Luciferase-Konstrukt, zeigt die Transaktivationsfähigkeit von C/EBP α .

D



D: Schematische Darstellung der c-Jun Promotorregion zwischen bp-180 und bp-63. Diese Region enthält die SP-1, die CTF und die proximale AP-1 Bindungsstelle.

3.5 C/EBP α blockiert die Autoregulation c-Juns durch das Verhindern der c-Jun Bindung an die proximale AP-1 Bindungsstelle im c-Jun Promotor

Aus den Promotorstudien ist hervorgegangen, dass für die Herunterregulation der c-Jun Promotoraktivität vor allem die bp-180 bis bp-63 Region verantwortlich ist, die die SP1, die CTF und die proximale AP-1 Bindungsstellen enthält. Angel et al beschrieben die Fähigkeit c-Juns seinen eigenen Promotor durch sein Produkt c-Jun/AP1 positiv zu regulieren.³⁰

Auch in den transienten Transfektionen in myeloischen U937 Zellen konnte dies gezeigt werden. Zum bp-1780/bp+731 c-Jun Promotor-Konstrukt wurden 0,1 μ g und 0,2 μ g c-Jun Expressionsvektor gegeben und es konnte ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Promotoraktivität beobachtet werden. Bei Zugabe des C/EBP α Expressionsvektors verlor der Promotor, wie schon früher gezeigt, dramatisch an Aktivität. Doch auch die durch Autoregulation verstärkte c-Jun Promotoraktivität wurde durch C/EBP α herunterreguliert, sowohl bei halber c-Jun Menge wie auch bei gleichen C/EBP α und c-Jun Mengen (Abb. 10A).

Diese Daten lassen vermuten, dass die Transaktivierung des c-Jun Promotors durch sein Produkt c-Jun in Anwesenheit von C/EBP α verhindert wird. Nachdem sich das Phänomen im bp-1780/bp+731 Promotor zeigen ließ, und in Versuchen nachgewiesen war, dass die für die Herunterregulation entscheidende Region zwischen bp-180 und bp-63 liegen muss, und in diesem Bereich eine Bindungsstelle für die Autoregulation durch AP-1 Faktoren liegt, untersuchten wir diese proximale AP-1 Bindungsstelle näher. Hierzu setzten wir zwei neue Promotoren ein: das c-Jun Promotorkonstrukt -79/+170 und das mutierte Konstrukt -79/+170AP-1mut, welches nicht mehr von AP-1 Faktoren gebunden werden kann (Abb. 10B). Als Positivkontrolle für c-Jun diente das künstliche pAP-1x7 luc-Konstrukt, das eine pAP-1 und 7 sich wiederholende AP-1 Bindungsstellen besitzt. Zur Kontrolle des C/EBP α Expressionsvektors verwendeten wir wieder die Promotoren p(C/EBP α)2TK und den leeren Vektor pTK (Abb. 10C und D).

Das c-Jun Promotorkonstrukt wurde wie auch der bp-1780/bp+731 Promotor konzentrationsabhängig durch c-Jun transaktiviert. Durch Kotransfektion mit C/EBP α ging die Aktivität schlagartig verloren. In der Versuchsreihe mit dem

³⁰Vgl. Angel et al: The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. 1988

mutierten AP-1 Promotor konnte keine Transaktivierung durch c-Jun erfolgen, auch ein Vektoreffekt wurde ausgeschlossen. Somit ist nachgewiesen, dass c-Jun unter Zugabe von C/EBP α den c-Jun Promotor an der proximalen AP-1 Bindungsstelle nicht mehr transaktivieren kann. Dieses Ergebnis konnte auch im AP-1x7 luc Promotor bestätigt werden.

Interessanterweise konnte am (C/EBP)2TK Promotor aufgezeigt werden, dass auch c-Jun die Transaktivierungsaktivität von C/EBP α erniedrigt. Bei Kotransfektion c-Juns zu p(C/EBP α)2TK und C/EBP α wurden abhängig von der c-Jun Konzentration verminderte Luciferasewerte gemessen (Abb. 10D).

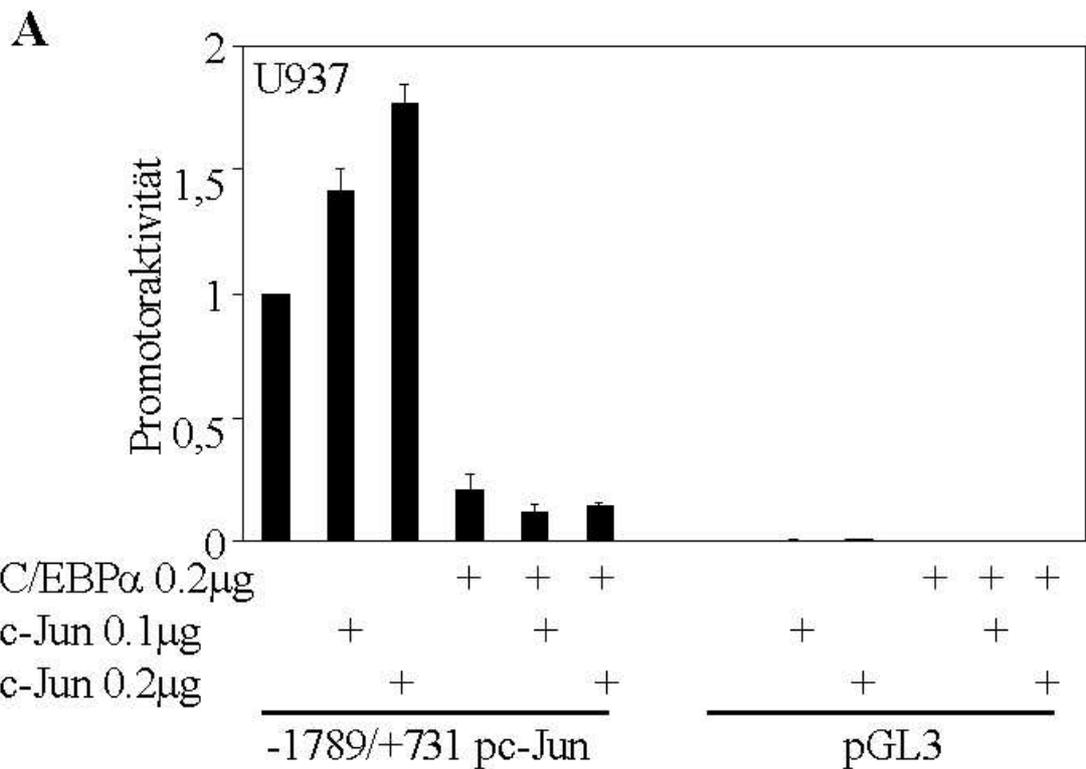
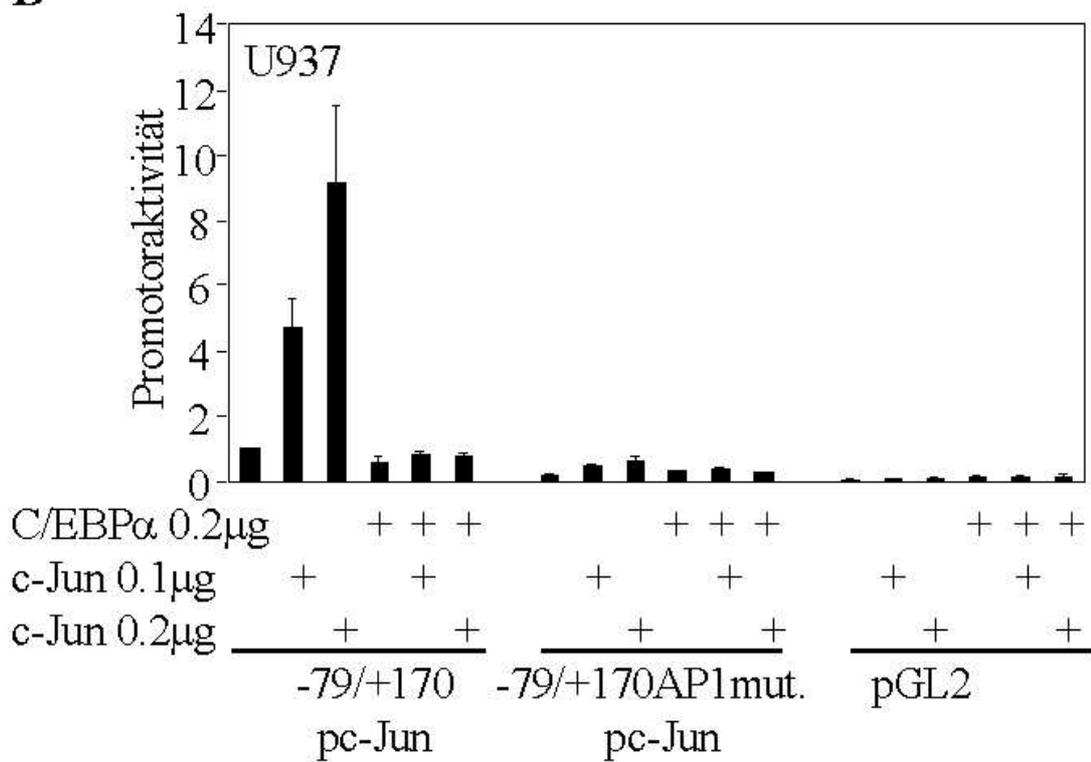
Abb. 10

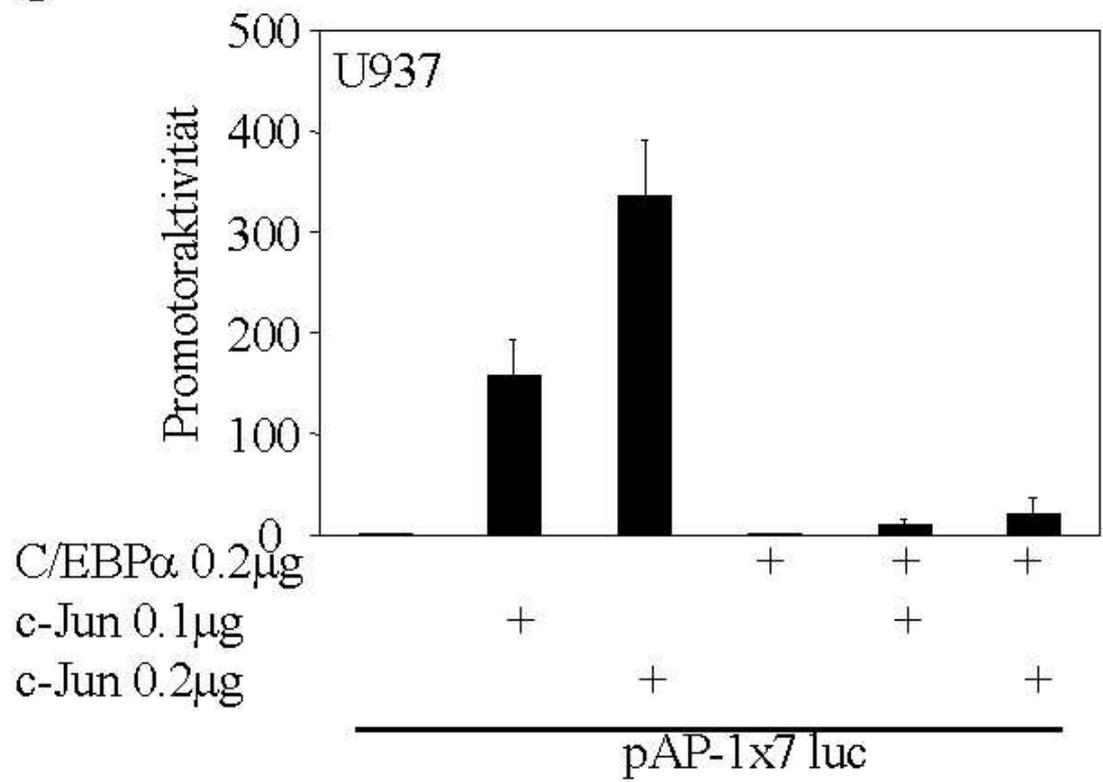
Abb. 10: C/EBP α blockiert die Autoregulationsfähigkeit c-Juns durch das Verhindern der c-Jun Bindung an die proximale AP-1 Bindungsstelle im c-Jun Promotor

A: Transiente Transfektionen in U937 myeloischen Zellen mit dem bp-1780/+731 c-Jun Promotorkonstrukt und dem pGL3 Vektor. Der C/EBP α Expressionsvektor wurde mit 0,2 μ g konstant gehalten, der c-Jun Expressionsvektor mit den Konzentrationen 0,1 μ g und 0,2 μ g variiert.

B

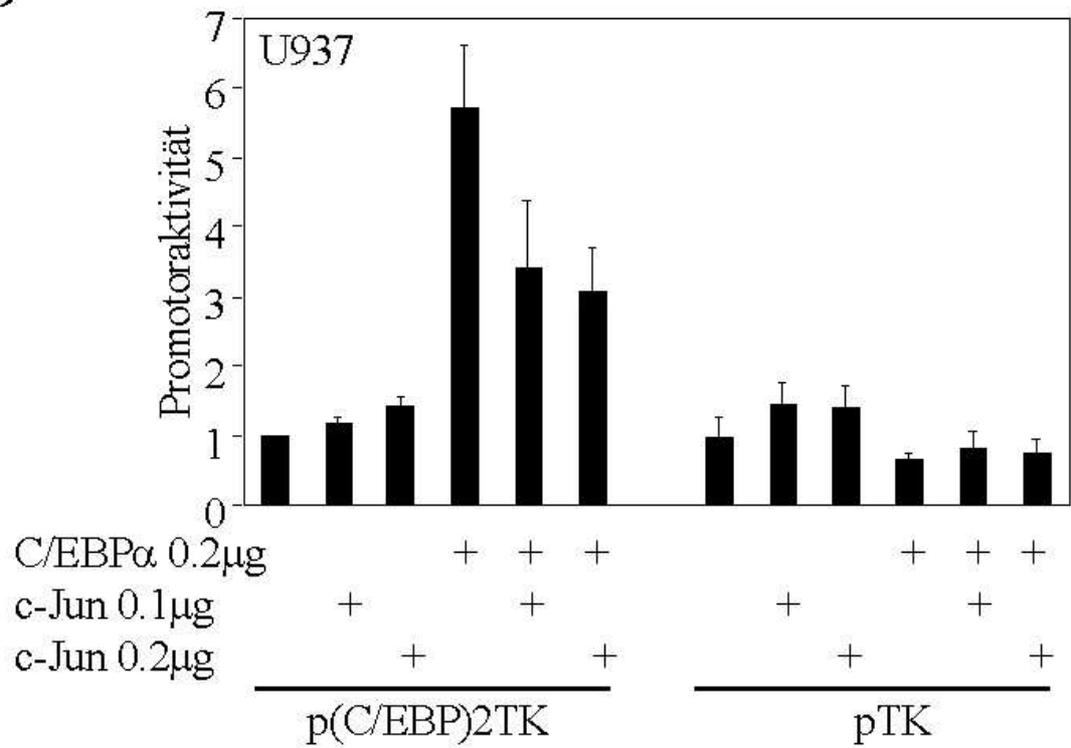
B: c-Jun Promotor-Konstrukte mit der Wildtyp AP-1 Bindungsstelle bp-79/+170 und der mutierten AP-1 Bindungsstelle bp-79/+170mut sowie der Vektorkontrolle pGL2 wurden transient mit 0,2 µg C/EBPα und ansteigenden c-Jun Konzentrationen transfiziert.

C



C: Das artifizielle AP-1 Luciferase-Konstrukt, das 7 sich wiederholende AP-1 Bindungsstellen besitzt, wurde für transiente Transfektionen mit c-Jun und C/EBPα in U937 myeloischen Zellen verwendet.

D



D: Als Positivkontrolle für die Transaktivationsaktivität C/EBPα wurde das p(C/EBPα)2TK Konstrukt und der leere Vektor pTK unter denselben Versuchsbedingungen verwendet wie oben.

3.6 Bedeutung der Herunterregulation der c-Jun Expression durch C/EBP α in der akuten myeloischen Leukämie

Die bisherigen Erkenntnisse wurden in verschiedenen Zelllinien auf mRNA- und Proteinebene sowie, basierend auf Promotorstudien mit verschiedenen Vektoren, in transienten Transfektionen gewonnen. In diesem Versuch verwendeten wir Proben von Patienten, die an der akuten myeloischen Leukämie erkrankt waren.

Pabst et al beschrieben kürzlich als erste dominant negative C/EBP α Mutationen in AML-Patienten. Diese Mutationen wurden durch Gensequenzierung in Patienten identifiziert, deren AML als M2 Subtyp ohne Translokation t(8;21) klassifiziert worden war.³¹ Wir untersuchten nun diese Proben mit C/EBP α Mutationen, sowie als Referenz Patientenproben vom gleichen Subtyp, aber ohne C/EBP α Mutationen, auf c-Jun mRNA Spiegel. Nach reverser Transkription und Realtime-PCR konnten wir die Kopien c-Juns und des Housekeeping Gens G6PD ins Verhältnis zueinander setzen. Die Versuche wurden dreimal durchgeführt, über dem dargestellten Mittelwert ist die mittlere Abweichung vom Mittelwert aufgetragen (Abb. 11).

Wir stellten fest, dass die Proben der AML-Patienten mit mutiertem C/EBP α einen 2,5 mal höheren Spiegel an c-Jun mRNA aufwiesen, als die Proben der Patienten ohne C/EBP α Mutationen.

³¹Vgl. Pabst et al: Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. 2001

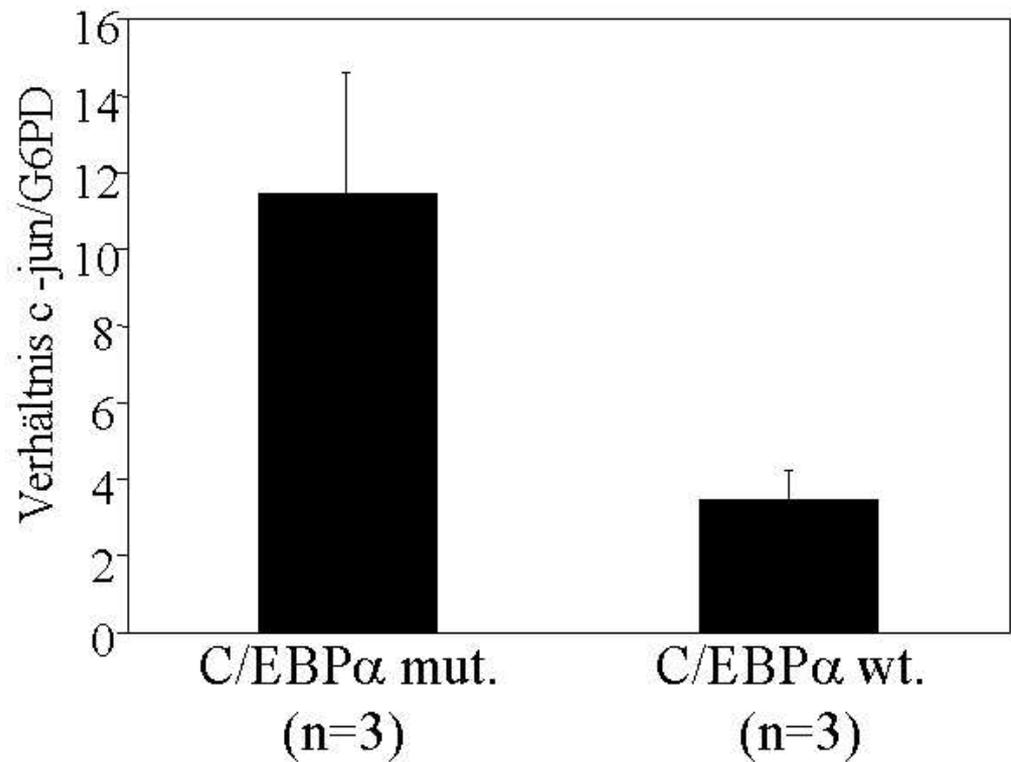
Abb. 11

Abb. 11: Bedeutung der Herunterregulation der c-Jun Expression durch C/EBPα in der akuten myeloischen Leukämie

Realtime-PCR Versuche mit Darstellung des c-Jun/G6PD mRNA-Verhältnisses aus Patientenproben mit AML-M2. Links wurden Proben mit C/EBPα Mutationen, rechts Proben vom C/EBPα Wildtyp verwendet. Die C/EBPα Mutationen waren durch Sequenzierung nachgewiesen worden. Die Säulen geben den Mittelwert von 3 Experimenten wider. Je Gruppe wurden 3 Patienten (n=3) untersucht.

4 Diskussion

4.1 Kontext der Forschungsarbeit

Aus heutiger Sicht wird die Hämatopoese als dynamischer Prozess verstanden, bei dem sich durch das Zusammenspiel von verschiedenen Transkriptionsfaktorkomplexen und der Modulation durch extrazelluläre Signale aus der vormals pluripotenten Stammzelle über Vorläuferzellen letztendlich die terminal differenzierten Blutzellen bilden. Je differenzierter die Zellen sind, desto weniger können sie proliferieren.

In der myeloischen Zellreihe kann sich ein und dieselbe Vorläuferzelle entweder in Monozyten oder in Granulozyten differenzieren. Es stellt sich nun die Frage nach den molekularen Mechanismen, die darüber entscheiden, in welche Richtung sich die bipotente Zelle weiterentwickelt. Den beiden Transkriptionsfaktoren C/EBP α und c-Jun fällt hier wahrscheinlich eine wichtige Rolle zu.

C/EBP α Knockout-Mäuse zeigen einen selektiven Differenzierungsblock neutrophiler Granulozyten. Es wurde gezeigt, dass die Expression von C/EBP α vor allem während der Differenzierung zu Granulozyten hoch ist, wohingegen sie in der Myelopoese rasch herunterreguliert wird.

Bereits die Expression des Transkriptionsfaktors C/EBP α reicht aus, um bipotente myeloide Vorläuferzellen zu neutrophilen Granulozyten zu differenzieren. Bei Induktion von C/EBP α konnte gezeigt werden, dass das monozytische Differenzierungsprogramm blockiert wird.³²

Die C/EBP α Expression geht einher mit der Hochregulation des G-CSF Rezeptors. In G-CSF Knockout-Mäusen wurden Granulozyten nachgewiesen, was nahe legt, dass noch weitere durch C/EBP α regulierte Gene für die Granulopoese von Bedeutung sein müssen. Nach heutiger Sicht wirken C/EBP α und G-CSF Rezeptorsignale zusammen, um granulozytische Gene wie die Myeloperoxidase und die neutrophile Elastase zu induzieren.

³²Vgl. Tenen et al: Transkription factors, normal myeloid development and leukemia. 1997

Die c-Jun Expression wird über den M-CSF reguliert, der für das Wachstum und die Differenzierung zu mononukleären Phagozyten (Makrophagen) benötigt wird.³³

Außerdem ist bekannt, dass Induktoren der myeloischen Differenzierung, wie TPA, Bryostatin, 1,25-Dihydroxyvitamin D3 und okadaic acid die c-Jun Aktivität durch Neusynthese und durch posttranslationale Mechanismen steigern.³⁴

Bei Überexpression c-Juns allein kann eine Differenzierung der Zellen mit Makrophagen-ähnlicher Morphologie beobachtet werden. Behre et al wiesen nach, dass c-Jun als JNK unabhängiger Koaktivator von PU.1 fungiert. PU.1 gilt als sehr wichtiger Transkriptionsfaktor für die Differenzierung zu Monozyten, weil es die Promotoraktivität des monozytenspezifischen M-CSF Rezeptors transaktiviert.³⁵

C/EBP α und c-Jun weisen ein gegensätzliches Expressionsmuster auf: hohe c-Jun mRNA Spiegel wurden in reifen Makrophagen und Hepatozyten von C/EBP α Knockout-Mäusen, nicht jedoch in Wildtyp-Mäusen detektiert. Die C/EBP α Expression in bipotenten Vorläuferzellen ist verantwortlich für die Differenzierung zu Granulozyten, während c-Jun die Differenzierung zu Monozyten unterstützt. Daraus schlossen wir, dass C/EBP α die c-Jun Expression im Zuge der Differenzierung zu Granulozyten herunterregulieren muss.³⁶

³³Vgl. folgende Titel: Zhang et al: Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice. 1997

Wang et al: EBP alpha bypasses granulocyte colony-stimulating factor signals to rapidly induce PU.1 gene expression, stimulate granulocytic differentiation, and limit proliferation in 32D cl3 myeloblasts. 1999

Radomska et al: CCAAT/Enhancer binding protein alpha is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors. 1998

³⁴Vgl. Bertani et al: Expression of c-Jun Protooncogen in Human Myelomonocytic Cells. 1989

Sherman et al: Transcriptional and posttranscriptional regulation of c-Jun expression during monocytic differentiation of human myeloid leukemic cells. 1990

Gaynor et al: Expression of c-Jun during macrophage differentiation of HL-60 cells. 1991

³⁵Vgl. Szabo et al: Constitutive c-Jun expression induces partial macrophage differentiation in U937cells. 1994

³⁶Vgl. Rana et al: Cell-Extracellular matrix interactions can regulate the switch between growth and differentiation in rat hepatocytes: Reciprocal expression of C/EBP alpha and immediate-early growth response transcription factors. response transcription factors. 1994

4.2 Verschiedene Ebenen der C/EBP α /c-Jun Interaktion

In den zurückliegenden Versuchen konnte nun belegt werden, dass der Transkriptionsfaktor C/EBP α als negativer Regulator der c-Jun Expression und der Transkriptionsaktivität fungiert.

Aus den Realtime-PCR-Daten der induzierbaren U937 C/EBP α Zelllinie geht anschaulich hervor, dass es mit Anstieg der C/EBP α mRNA-Expression zu einem signifikanten Abfall der endogenen c-Jun mRNA Spiegel kommt. Zu diesem Ergebnis kommen auch die Untersuchungen auf Proteinebene, aufgrund der zwischengeschalteten Translation leicht zeitversetzt. Je mehr der C/EBP α Proteinspiegel zunimmt, desto weniger c-Jun Protein ist nachweisbar.

In transienten Transfektionen gelang es Rangatia et al zu zeigen, dass der c-Jun Promotor durch C/EBP α sowohl in verschiedenen Zelllinien (CV.1, NIH3T3, 293E1A, CHO und Hela) negativ reguliert wird. Es kann also davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um ein allgemeines Phänomen und nicht um einen zelllinien-spezifischen Vorgang handelt. Des weiteren ergaben die Versuche, dass die Herunterregulation des c-Jun Promotors einer gewissen Sättigungskinetik unterliegt. Die These stärkend ist ebenfalls die Beobachtung, dass C/EBP α auch die über TPA induzierte Promotoraktivität c-Juns blockt.

Die genauere Untersuchung des c-Jun Promotors mittels Deletionskonstrukten ergab, dass die Sequenz zwischen bp-180 und bp-63 im Promotor für die C/EBP α vermittelte Herunterregulation der c-Jun Expression verantwortlich sein muss. Der menschliche c-Jun Promotor besitzt zwei Bindungsstellen für AP-1 Faktoren. Zwischen bp-180 und bp-63 liegt die proximale AP-1 Bindungsstelle. Frühere Untersuchungen zeigten, dass diese proximale Bindungsstelle im c-Jun Promotor ausreicht, um auf verschiedene Signale wie beispielsweise Phorbol ester (TPA, Serum, UV, Il-1) reagieren zu können. c-Jun wird über sein Produkt, die AP-1 Faktoren, autoreguliert.³⁷

Mithilfe einer mutierten pAP-1 Bindungsstelle konnte gesehen werden, dass C/EBP α nicht mehr in der Lage war, die c-Jun Promotoraktivität herunterzuregulieren. Es

³⁷Vgl. Hallahan et al: Prolonged c-Jun Expression in irradiated ataxia telangiectasia fibroblasts. 1996
 Unlap et al: Upstream regions of the c-Jun promoter regulate phorbol ester-induced transcription in U937 leukemic cells. 1992
 Angel et al: The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. 1988

kann davon ausgegangen werden, dass die Autoregulationskapazität c-Juns durch C/EBP α blockiert ist. Interessanterweise deutet das Kontrollexperiment darauf hin, dass auch die C/EBP α Aktivität zumindest teilweise durch c-Jun herunterreguliert werden kann.

Es stellte sich nun die Frage, ob die Transkriptionsfaktoren einander binden können. In GST-pull-down und CoIP-Versuchen wiesen Rangatia et al nicht nur die Bindung nach, sondern klärten auch den Mechanismus der Blockade auf.

C/EBP α und c-Jun verfügen beide über bZIP Domänen. Diese bestehen aus einer basischen Region für die DNA-Bindung und einer leucinreichen α -helicalen Struktur, die für die Dimerbildung entscheidend ist. In Versuchen mit Deletionskonstrukten für den Leucin-Zipper und die basenreiche Region gelang es zu zeigen, dass beide Transkriptionsfaktoren miteinander über ihre Leucin-Zipper binden. Der Komplex kann nun nicht mehr über die AP-1 Bindungsstelle an die DNA binden und hierüber den c-Jun Promotor transaktivieren. Über die C/EBP α /c-Jun Bindung wird somit die Autoregulation des Promotors durch c-Jun blockiert (Abb.12).

Interessant wäre es nun, weitere von c-Jun regulierte Gene zu untersuchen, um zu sehen, ob auch hier C/EBP α über den gleichen Mechanismus die Expression blockieren kann. Weitere Interaktionspartner der Proteine, wie beispielsweise PU.1, AML-1, p300, C/EBP β könnten ebenso im Zusammenspiel an spezifischen Promotoren von Bedeutung sein.³⁸

³⁸Vgl. Erickson et al: p300 Coactivates the Adipogenic Transcription Factor C/EBP α . 2001
Reddy et al: The granulocytic inducer C/EBP α inactivates the myeloid master regulator PU.1: possible role in lineage commitment decisions. 2002

Abb. 12

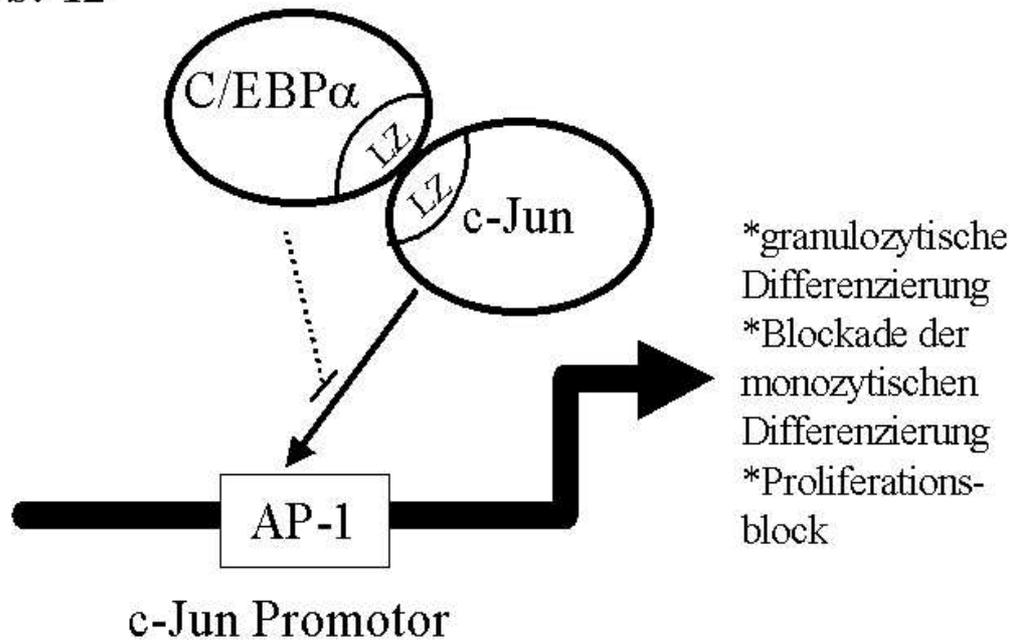


Abb. 12: Modell der Interaktion zwischen C/EBP α und c-Jun über ihre Leucin-Zipper-Domänen
 Die C/EBP α /c-Jun Interaktion verhindert, dass c-Jun an den proximalen AP-1 Bindungsstelle des eigenen Promotors binden und so die c-Jun Expression hochregulieren kann. Die C/EBP α /c-Jun Interaktion könnte sowohl die monozytische Differenzierung als auch die Proliferation blockieren und so zur Differenzierung zu Granulozyten führen.

4.3 Biologische Relevanz

Die bisherigen Erkenntnisse stammen vor allem aus Versuchen mit artifiziellen Konstrukten und spiegeln nur bedingt die Biologie der Gesamtzellen wider.

Weiterführende Experimente wie die retrovirale Transduktion sind näher an der Zelle. Die Vektoren werden durch die Viren ins Genom eingebracht und nicht mehr- wie bei der Transfektion- extrachromosomal exprimiert. Rangatia et al konnten C/EBP α und c-Jun Expressionsvektoren in Zellen transduzieren. Die c-Jun mRNA wurde über Realtime-PCR gemessen. Auch hier wurden bei der Koexpression von C/EBP α deutlich verminderte c-Jun mRNA Werte gemessen.

Bei Untersuchungen mit der Durchflußzytometrie wurden Marker bestimmt, die spezifisch für die Differenzierung zu Granulozyten sind. Die durch Transduktion mit C/EBP α ausgeprägten Oberflächenmarker waren bei Kotransduktion mit c-Jun um vieles schwächer ausgeprägt. Man kann daraus schließen, dass die durch C/EBP α induzierte Differenzierung durch Anwesenheit c-Juns blockiert wird. Wenn nun C/EBP α granulozytenspezifische Gene reguliert, muss die c-Jun Expression- und Funktion gehemmt sein.

Es ist durchaus auch vorstellbar, dass C/EBP α c-Jun von anderen Interaktionspartnern abziehen könnte, um so die Funktion zu hemmen, so z.B. bei der c-Jun Interaktion mit C/EBP β in der monozytischen Differenzierung durch TNF α . Udeda et al wiesen nach, dass CHOP, ein dominant negativer Regulator der C/EBP Familie, mit c-Jun durch die Leucin-Zipper-Domäne interagiert. Hierdurch wirkt CHOP mit c-Jun zusammen, um die Transkription über die AP-1/TRE Bindungsstelle zu aktivieren.³⁹

Im Gegensatz hierzu beobachten wir, dass die C/EBP α /c-Jun Interaktion c-Jun davon abhält, an die AP-1 Bindungsstelle im c-Jun Promotor zu binden. Der C/EBP α /c-Jun Komplex zieht c-Jun wahrscheinlich von Genen ab, die durch c-Jun reguliert werden. c-Jun spielt eine wichtige Rolle als Koaktivator des Transkriptionsfaktors PU.1 und verstärkt auf diesem Weg die Differenzierung zu Monozyten. In Anwesenheit von hoher C/EBP α Expression und TPA unterlaufen U937 myeloische Zellen nicht der

³⁹Vgl. Udeda et al: CHOP enhancement of gene transcription by interactions with Jun/Fos AP-1 complex proteins. 1999

Differenzierung zu Makrophagen.⁴⁰ Als Erklärung für diese von Radomska et al gemachte Beobachtung könnte dienen, dass C/EBP α das induzierte c-Jun bindet. So könnte die Rolle c-Juns als Koaktivator von PU.1 verhindert werden. Aber es wäre durchaus auch möglich, dass die Regulation PU.1 unabhängiger monozytischer Gene gestört wäre. So könnte c-Jun nicht mehr an AP-1 Bindungsstelle binden oder aber die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren, die wichtig für die Differenzierung zu myeloischen Zellen sind, würde nicht mehr funktionieren.

c-Jun besitzt jedoch auch die Fähigkeit, sich bei unkontrollierter Expression als Proto-Onkogen zu verhalten. Die Proliferation wird verstärkt und die leukämischen Blasten, die ja einem Differenzierungsblock unterliegen, hyperproliferieren. In Zellkulturstudien wurde herausgefunden, dass die c-Jun induzierte Proliferation durch C/EBP α gehemmt werden kann. Dies geht einher mit früheren Beschreibungen von C/EBP α als Proliferationshemmer.⁴¹

Harris et al zeigten, dass C/EBP α in den Zellzyklus mit eingreift. C/EBP α kann sowohl mit dem cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor p21 als auch mit der cyclin-abhängigen Kinase cdk2 interagieren. Über die Protein-Protein-Interaktion von C/EBP α mit p21 wird die Hemmung der cdk2 vermittelt. Dies hat den Stopp des Zellzyklus und hierdurch den Stopp des Zellwachstums zur Folge. Versuche mit C/EBP α Mutanten legen dar, dass diese Wirkungsweise von C/EBP α hier nicht durch DNA-Bindung, sondern nur durch Protein-Protein-Interaktionen zustande kommt. C/EBP α kann also zumindest auf zwei unterschiedliche Weisen seine Wirkung ausüben. Auf der einen Seite treibt C/EBP α die Differenzierung auf Promotorebene voran, auf der anderen inhibiert es über Protein-Protein-Interaktionen die Zellproliferation.⁴²

Ein und dasselbe Protein vereint in sich die Fähigkeiten zur Differenzierung und zur Proliferationshemmung. Es verhält sich auch auf dieser Ebene als Gegenspieler c-Juns: Tumorsuppressor versus Proto-Onkogen.

⁴⁰Vgl. Radomska et al: CCAAT/Enhancer binding protein alpha is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors. 1998

⁴¹Vgl. Umek et al: CCAAT-Enhancer binding protein: A component of a differentiation switch. 1999
Müller et al: Separation of C/EBP alpha - mediated proliferation arrest and differentiation pathways. 1999

⁴²Vgl. Harris et al: CCAAT/Enhancer binding Protein α Cooperates with p21 to Inhibit Cyclin-dependent Kinase-2 Activity and Induces Growth Arrest Independent of DNA Binding. 2001

Die Funktion der Transkriptionsfaktoren C/EBP α und c-Jun ist wahrscheinlich abhängig vom Differenzierungsschritt und vom Proteinspiegel. So könnte auch c-Jun entweder als Koaktivator von PU.1 dienen und so die Differenzierung zu Monozyten/Makrophagen herbeiführen oder aber als Proto-Onkogen wirken und für Hyperproliferation verantwortlich sein. Wichtig für die C/EBP α /c-Jun Interaktion scheint der Expressionsspiegel beider Proteine zu sein.

4.4 Bedeutung in der akuten myeloischen Leukämie

Zahlreiche Untersuchungen beschäftigen sich mit den Transkriptionsfaktoren C/EBP α und c-Jun in der akuten myeloischen Leukämie.

In der AML Subtyp M2 kommt es bei Translokation t(8;21) zur Ausbildung des Fusionsgens AML1-ETO. Es entsteht durch Neuverknüpfung eines Teils des AML1 Gens von Chromosom 21 mit fast dem gesamten ETO Gen von Chromosom 8. Pabst et al beschrieben, dass durch die Expression des daraus entstehenden Fusionsproteins AML1-ETO der Transkriptionsfaktor C/EBP α selektiv herunterreguliert und somit die Differenzierung zu Granulozyten verhindert wird. Expression von AML1-ETO in U937 Zellen regulierte die C/EBP α mRNA, das Protein und die DNA-Bindungsaktivität herunter.⁴³

AML Patienten mit der Translokation t(8;21) haben signifikant erniedrigte C/EBP α mRNA Spiegel, verglichen mit anderen Subgruppen der FAB-Klassifikation. Das CEBP α Protein war nicht nachweisbar in t(8;21) positiver Zellen.

In einer weiteren Arbeit von Pabst et al wurden dominant negative C/EBP α Mutationen durch Sequenzanalyse in AML-Patientenproben identifiziert. Das mutierte Protein blockiert die DNA-Bindung und die Transaktivierungskapazität des C/EBP α Wildtyps.⁴⁴

Bei Untersuchung derselben Patientenproben mit der Realtime-PCR-Methode beobachteten wir höhere c-Jun mRNA-Spiegel in den Proben mit mutiertem C/EBP α verglichen zu den Proben ohne Mutationen. Dieses Ergebnis unterstreicht die

⁴³Vgl. Pabst et al: AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia. 2001

⁴⁴Vgl. Pabst et al: Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. 2001

Bedeutung von C/EBP α bei der Kontrolle der c-Jun Expression und Transaktivierungsaktivität in der akuten myeloischen Leukämie. Die C/EBP α Mutationen könnten durchaus bedeutend für den Differenzierungsblock sein, der in der AML gefunden wird.

Doch nicht nur die C/EBP α Expression oder Funktion kann in der akuten myeloischen Leukämien betroffen sein, neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass auch c-Jun beteiligt ist. So zeigten Elsässer et al, dass die Expression des Proto-Onkogens c-Jun JNK-abhängig durch AML-ETO induziert wird.⁴⁵ Es wäre auch sehr gut möglich, dass c-Jun Mutationen in Patienten mit AML vorliegen würden. So würde sich die c-Jun Expression und Aktivität der Kontrolle durch C/EBP α entziehen. Bisher sind in der Literatur allerdings noch keine c-Jun Mutationen beschrieben.

⁴⁵Vgl. Elsässer et al: The fusion protein AML1-ETO in acute myeloid leukemia with translocation t(8;21) induces c-jun protein expression via the proximal AP-1 site of the c-jun promoter in an indirect, JNK-dependent manner. 2003.

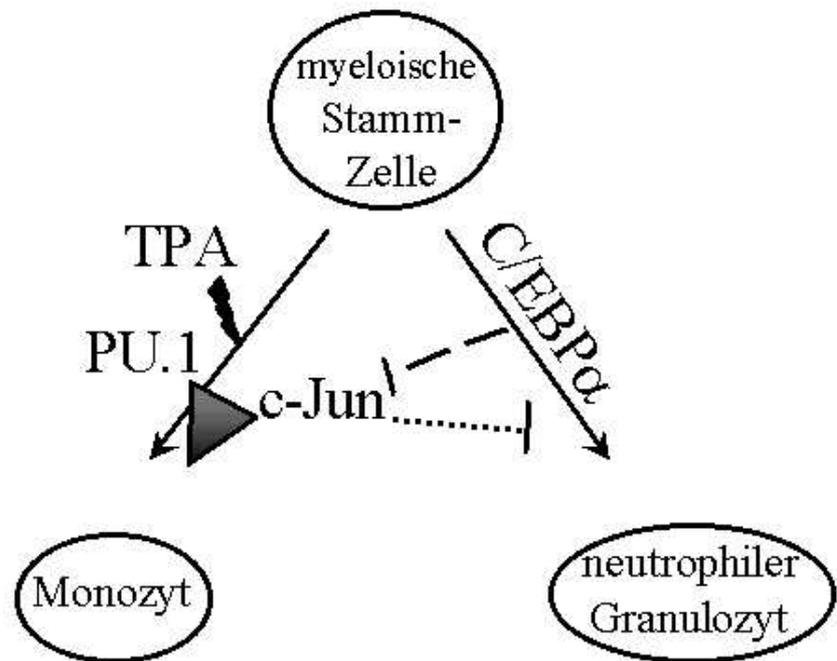
Abb. 13**Abb. 13: Modell des Zusammenspiels zwischen C/EBP α und c-Jun in der Myelopoese**

Schaubild der Myelopoese. Die bipotente myeloide Stammzelle kann sich bei Induktion durch TPA in Monozyten/Makrophagen oder bei Überexpression von C/EBP α in einen neutrophilen Granulozyten differenzieren. Die TPA-Induktion führt zum Anstieg der Expression und der Transkriptionsaktivität c-Juns. c-Jun fungiert als Koaktivator von PU.1 und verstärkt die Differenzierung. C/EBP α reguliert die Expression und Transkriptionsaktivität c-Juns herunter und verhindert so die TPA-induzierte Differenzierung. Gleichzeitig kann jedoch auch c-Jun die durch C/EBP α herbeigeführte Differenzierung zu Granulozyten blockieren.

4.5 Perspektiven

Die bisherigen Erkenntnisse sollen dem tieferen Verständnis der Myelopoese und der akuten myeloischen Leukämie vor allem des Subtyps M2 dienen.

Aufschlussreich wäre es nun, weitere durch c-Jun regulierte Gene auf ihr Verhalten bei gleichzeitiger Expression von C/EBP α zu untersuchen. Es ist sehr gut möglich, dass auch hier durch die C/EBP α /c-Jun Interaktion über die Leucin-Zipper-Domäne die DNA-Bindung c-Juns und somit die Transaktivierung des Promotors und Expression des Proteins verhindert wird. Doch nicht nur innerhalb des hämatopoetischen Systems bieten sich hierzu Untersuchungen an, da C/EBP α in zahlreichen weiteren Geweben wie in Lunge, Leber, Prostata und Fettgewebe exprimiert wird.

C/EBP α Mutationen wurden bisher nur in der akuten myeloischen Leukämie identifiziert und könnten durchaus auch bei anderen Neoplasien auf Expressions- und Funktionsniveau zum Differenzierungsstopp führen und so für die Tumorgenese von Bedeutung sein. Außerdem ist auch in der akuten myeloischen Leukämie noch nicht eindeutig geklärt inwieweit C/EBP α und c-Jun zum Differenzierungsblock beitragen. Klinisch sehr interessant könnten zwei Aspekte werden: Die C/EBP α Expression in Zellen mit Translokation t(8;21) führt zur neutrophilen Differenzierung. Somit könnte die Wiederherstellung der C/EBP α Expression zu einem therapeutischen Ziel werden. Auch c-Jun als wichtiger Regulator der Proliferation könnte für die Therapie bedeutsam werden. So konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung von AML Blasten mit A3D3, einem CD44 Antikörper, zur Herunterregulation der c-Jun mRNA und Protein-Expression führt.⁴⁶

⁴⁶ Vgl. Zada et al: Downregulation of c-Jun expression and cell cycle regulatory molecules in acute myeloid leukemia cells upon CD44 ligation. 2003.

5 Zusammenfassung

Verschiedene Transkriptionsfaktoren spielen eine Rolle in der Entwicklung myeloischer Zellen. c-Jun gehört zur Familie der AP-1 Transkriptionsfaktoren und ist ein Koaktivator des Transkriptionsfaktors PU.1, der für die Differenzierung zu Monozyten wichtig ist. C/EBP α ist ein an den CCAAT-Enhancer bindender Transkriptionsfaktor. Wird C/EBP α exprimiert, differenzieren sich bipotente myeloische Zellen zu neutrophilen Granulozyten. Die durch den Induktor TPA hervorgerufene Differenzierung zu Monozyten wird gehemmt. C/EBP α Knockout-Mäuse entwickeln dementsprechend keine ausgereiften Granulozyten. Gleichzeitig lässt sich in der Leber dieser Mäuse ein dramatischer Anstieg der mRNA für c-Jun beobachten.

Wir legen hier erste Beweise dafür vor, dass C/EBP α die Expression von c-Jun herunterreguliert, um so die Differenzierung zu Granulozyten voranzutreiben.

Ektoper Anstieg der C/EBP α Expression vermindert den c-Jun mRNA Spiegel und die Aktivität des menschlichen c-Jun Promotors wird herunterreguliert. C/EBP α und c-Jun können über ihre Leucin-Zipper-Domänen interagieren. In dieser Bindung kann c-Jun nicht mehr an die DNA binden. So wird die Fähigkeit c-Juns vermindert, den eigenen Promotor durch die proximale AP-1 Box zu autoregulieren. Andererseits kann durch eine Überexpression c-Juns die durch C/EBP α induzierte Differenzierung zu Granulozyten gehemmt werden. Zudem konnten wir beobachten, dass in AML-M2 Patienten mit dominant negative C/EBP α Mutationen die c-Jun Expression höher war verglichen zu AML-M2 Patienten ohne dominant negativen C/EBP α Mutationen.

Somit schlagen wir ein Modell vor, in dem C/EBP α sowohl die Expression als auch die Transaktivationskapazität von c-Jun herunterreguliert, um die Differenzierung von myeloischen Vorläuferzellen zu Granulozyten zu fördern.

6 Literaturverzeichnis

Angel, P.; Allgretto, E.A.; Okino, St.T.; Hattori, K.; Boyle, W.J.; Hunter, T. and Karin, M.: Oncogen jun encodes a sequence-specific transactivator similar to AP-1. In: Nature. 332.1988. pp.166-171

Angel, P.; Hattori, K.; Smeal, T. and Karin, M.: The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. In: Cell. 55. 1988. pp. 875-885

Bartl; Brack; Dietzfelbinger, Funk, Rastetter, Thomssen: Morhologische Diagnostik. In: Akute myeloische Leukämie und Myelodysplastisches Syndrom. Tumormanual München.1996

<http://www.krebsinfo.de/ki/empfehlung/leu/homepage.html>, entnommen am 12.09.2002

Behre, G.; Smith, L.T.; Whitmarsh, A.J.; Coghlan, M.P.; Hoang, T.; Carpenter, C.L.; Zhang, D.-E.; Davis, R.J. and Tenen, D.G.: Jun Is a JNK-independent Coactivator of the PU.1 Transcription Factor. In: J Biol Chem. 274.1999. pp. 4939-4946

Behre, G.; Smith, L.T. and Tenen, D.G.: Use of a promoterless Renilla luciferase vector as an internal control plasmid for transient co-transfection assays of Ras-mediated transcriptionactivation. In: Biotechniques. 26. 1999. pp. 24-26

Behre, G.; Zhang, P.; Zhang, D.-E. and Tenen, D.G.: Analysis of the modulation of transcriptional activity in myelopoiesis and leukemogenesis. In: Methods. 17. 1999. pp. 231-237

Bertani, A.; Polentarutti, N.; Sica, A.; Rambaldi, A.; Mantovani, A. and Colotta F.: Expression of c-Jun Protooncogen in Human Myelomonocytic Cells. In: Blood. 74. 1989. pp. 1811-181

Burel, S.A.; Harakawa, N.; Zhou, L.; Pabst, T.; Tenen, D.G. and Zhang, D.E.: Dichotomy of AML1-ETO functions: Growth arrest versus block of differentiation. In: Mol Cell Biol. 21. 2001. pp. 5577-5590

Büchner, T.: Akute myeloische Leukämie. In: Internist 37. 1993. pp. 1008-1012

Calabretta, B.: Dissociation of c-fos induction from macrophage differentiation in human myeloid leukemic cell lines. In: *Mol Cell Biol.* 7. 1987. pp. 769 -774

Cao, Z.; Umek, R.M. and McKnight, S.L.: Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. In: *Genes Dev.* 5. 1991. pp. 1538-1552

Elsasser, A.; Franzen, M.; Kohlmann, A.; Weisser, M.; Schnittger, S.; Schoch, C.; Reddy, V.A.; Burel, S; Zhang, D.E.; Ueffing, M.; Tenen, D.G.; Hiddemann, W. and Behre, G.: The fusion protein AML1-ETO in acute myeloid leukemia with translocation t(8;21) induces c-jun protein expression via the proximal AP-1 site of the c-jun promoter in an indirect, JNK-dependent manner. In: *Oncogene.* 36. 2003. pp. 5646-57

Emig, M.; Saussele, S.; Wittor, H.; Weisser, A.; Reiter, A.; Willer, A.; Berger, U.; Hehlmann, R.; Cross, N.C. and Hochhaus, A.: Accurate and rapid analysis of residual disease in patients with CML using specific fluorescent hybridization probes for real time quantitative RT-PCR. In: *Leukemia.* 13. 1999. pp. 1825-1832

Erickson, R.L.; Hemati, N.; Ross, S.E. and MacDougald, O.A.: p300 Coactivates the Adipogenic Transcription Factor C/EBP α . In: *JBC.*08/02/2001

Flodby, P.; Barlow, C.; Kylefjord, H.; Ährlund-Richter, L. and Xanthopoulos, K.G.: Increased hepatic cell proliferation and lung abnormalities in mice deficient in CCAAT/enhancer binding protein alpha. In: *JbiolChem.* 271. 1996. pp. 24753-24760

Gaynor, R.; Simon, K. and Koeffler, P.: Expression of c-Jun during macrophage differentiation of HL-60 cells. In: *Blood.* 77. 1991. pp. 2618-2623

Hallahan, D.E.; Dunphy, E.; Kuchibhotla, J.; Kraft, A.; Unlap, T. and Weichselbaum, R.: Prolonged c-Jun Expression in irradiated ataxia telangiectasia fibroblasts. In: *Int J Radiation Oncology Biol Phys.* 36. 1996. pp. 355-360

Harris, T.E.; Albrecht, J.H.; Nakanishi, M. and Darlington, G.J.: CCAAT/Enhancer binding Protein α Cooperates with p21 to Inhibit Cyclin-dependent Kinase-2 Activity and Induces Growth Arrest Independent of DNA Binding. In: *JBC.* 276. 2001. pp. 29200-29209

- Hiddemann, W.: Akut Myeloische Leukämie. In: Seeber, S.; Schütte, J. (Hrsg.): *Therapiekonzepte Onkologie*. 3. Aufl. Berlin u.a. 1998. pp.163-179
- Hu, H.-M.; Baer, M.; Williams, S.C.; Johnson, P.F. and Schwartz, R.C.: Redundancy of C/EBP α , - β , and δ in supporting the lipopolysaccharide-induced transcription of IL-6 and monocyte chemoattractant protein-1. In: *The Journal of Immunology*. 160. 1998. pp. 2334-2342
- Huang, L.; Guan, R.J. and Pardee, A.B.: Evolution of transcriptional control from prokaryotic beginnings to eukaryotic complexities. In: *Crit. Rev. Eukaryo. Gene Expr*. 9. 1999. pp. 175-182
- Hurst, H.C.: Transcription factors: bZIP proteins. In: *Protein Profile*. 2. 1995. pp. 101-168
- Kiaris, H.; Schally, A.V.; Sun, B.; Armatis, P. and Groot, K.: Inhibition of growth of human malignant glioblastoma in nude mice by antagonists of Bombesin/gastrin-releasing peptide. In: *Oncogene* 18. 1999. pp. 7168-7173
- Lamph, W.W.; Wamsley, P.; Sassone-Corsi, P. and Verma, I.M.: Induction of protooncogene JUN/AP-1 by serum and TPA. In: *Nature* 334. 1988. pp. 629-31
- Landschulz, W.H.; Johnson, P.F. and McKnight, S.L.: The DNA binding domain of the rat liver nuclear protein C/EBP is bipartite. In: *Science*. 243. 1989. pp. 1681-1688
- Landschulz, W.H.; Johnson, P.F. and McKnight, S.L.: The leucine zipper: A hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. In: *Science*. 240. 1988. pp. 1759-1764
- Lekstrom-Himes, J. and Xanthopoulos, K.G.: Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. In: *JBC*. 273. 1998. pp. 28545-28548
- Lewin, B.: *Genes VII*. Oxford 2000
- Lord, K.A.; Abdollahi, A.; Hoffman-Liebermann, B. and Liebermann, D.A.: Protooncogenes of the fos/jun family of transcription factors are positive regulators of myeloid differentiation. In: *Mol Cell Biol*. 13. 1993. pp. 841-851

- McKnight, S.L.; Lane, M.D. and Gluecksohn-Waelsch, S.: Is CCAAT/enhancer-bindingprotein a central regulator of energy metabolism? In: *Genes Dev.* 3. 1989. pp. 2021-2024
- Müller, C.; Alunni-Fabbroni, M.; Kowenz-Leutz, E.; Mo, X.; Tommasino, M. and Leutz, A.: Separation of C/EBP alpha-mediated proliferation arrest and differentiation pathways. In: *Proc Natl Acad Sci USA.* 96. 1999. pp. 7276-7281
- Nakamura, T.; Datta, R.; Kharbanda, S. and Kufe, D.: Regulation of jun and fos gene expression in human monocytes by the macrophage colony-stimulating factor. In: *Cell Growth & Differentiation.* 2. 1991. pp. 267-272
- Okada, S.; Wang, Z.Q.; Grugoriadis, A.E.; Wagner, E.F. and Ruden, T.: Mice lacking c-fos have normal hematopoietic stem cells but exhibit altered B-cell differentiation due to an impaired bone marrow environment. In: *Mol Cell Biol.* 14. 1994. pp. 382-390
- Ossipow, V.; Descombes, P. and Schibler, U.: CCAAT/enhancer binding protein mRNA is translated into multiple proteins with different transcription activation potentials. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90. 1993. pp. 8219-8223
- Pabst, T.; Mueller, B.U.; Harakawa, N.; Schoch, C.; Haferlach, T.; Behre, G.; Hiddemann, W.; Zhang, D.-E. and Tenen, D.G.: AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia. In: *Nat Med.* 7. 2001. pp. 444-451
- Pabst, T.; Mueller, B.U.; Zhang, P.; Radomska, H.; Narravula, S.; Schnittger, S.; Behre, G.; Hiddemann, W. and Tenen, D.G.: Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. In: *Nat Genet.* 27. 2001. pp. 263-270
- Petrides, P.E.: Blut. In: Löffler, Petrides (Hrsg.): *Biochemie und Pathobiochemie.* 5. Aufl. Berlin u.a. 1997. pp.880-947
- Radomska, H.; Huettner, C.; Zhang, P.; Cheng, T.; Scadden, D. and Tenen, D.G.: CCAAT/Enhancer binding protein alpha is a regulatory switch sufficient for

induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors. In: *Mol Cell Biol.* 18. 1998. pp. 4302-4314

Ramij, D.P. and Foka, P.: CCAAT Enhancer Binding Proteins: Structure, Function and Regulation. In: *Biochem J.* 365. 2002. pp. 561-575

Rana, B.; Mischoulon, D.; Xie, Y.; Bucher, N. and Farmer, S.: Cell-Extracellular matrix interactions can regulate the switch between growth and differentiation in rat hepatocytes: Reciprocal expression of C/EBP alpha and immediate-early growth response transcription factors. In: *Mol Cell Biol.* 14. 1994. pp. 5858-5869

Reddy, V.A.; Iwama, A.; Iotzova, G.; Schulz, M.; Elsässer, A.; Vangala, R.K.; Tenen, D.G.; Hiddemann, W. and Behre G.: The granulocytic inducer C/EBP α inactivates the myeloid master regulator PU.1: possible role in lineage commitment decisions. In: *Blood.*100(2). 2002. pp.483-490

Sassone-Corsi, P.; Ransone, L.J.; Lamph, W.W. and Verma I.M.: Direct interaction between fos and jun nuclear oncoproteins: role of the 'leucine zipper' domain. In: *Nature.* 336. 1988. pp. 692-695

Schilling von, C.; Duyster, J. und Herrmann, F.: Fortschritte im Verständnis der Leukämieentstehung. In: *Internist* 37. 1996. pp. 971-981

Scott, L.M.; Civin, C.I.; Rorth, P. and Friedman, A.D.: A novel temporal expression pattern of three C/EBP family members in differentiating myelomonocytic cells. In: *Blood.* 80. 1992. pp. 1725-1735

Sherman, M.L.; Stone, R.M.; Rakesh, V.; Bernstein, S.H. and Kufe, D.W.: Transcriptional and posttranscriptional regulation of c-Jun expression during monocytic differentiation of human myeloid leukemic cells. In: *J Biol Chem.* 265. 1990. pp. 3320-3323

Slovak, M.L.; Kopecky, K.J; Cassileth, P.A. et al: Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/ Eastern Cooperative Oncology Group study. In: *Blood.* 96. 2000. pp. 4075-4083

- Sieweke, M.H.; Graf, T.: A transcriptionfactor party during blood cell differentiation. In: *Current Opinion in Genetics & Development*. 8. 1998. pp. 545-551
- Szabo, E.; Preis, L.H. and Birrer, M.J.: Consitutive c-Jun expression induces partial macrophage differentiation in U-937 cells. In: *Cell Growth & Differentiation*. 5. 1994. pp. 439-446
- Tengku, S.T-M.; Hughes, T.; Ranki, H.; Cryer, A. and Ramji, D.: Differential regulation of macrophage CCAAT-Enhancer binding protein isoforms by lipopolysaccharide and cytokines. In: *Cytokine*. 12. 2000. pp. 1430-1436
- Tenen, D.G.; Hromas, R.; Licht, J.D.; Zhang D.-E.: Transcription Factors, Normal Myeloid Developement, and Leukemia. In: *The American Society of Hematology*. Review article. pp. 489-519
- Timchenko, N.A.; Harris, T.E.; Wilde, M.M Bilyeu, T.A.; Burgess-Beusse, B.L.; Finegold, M.J. and Darlington, G.J.: CCAAT/Enhancer binding protein a regulates p21 Protein and hepatocyte proliferation in newborn mice. In : *Mol. Cell. Biol*. 17. 1997. pp.7353-7361
- Ubeda, M.; Vallejo, M. and Habener, J.F.: CHOP enhancement of gene transcription by interactions with Jun/Fos AP-1 complex proteins. In: *Mol Cell Biol*. 19. 1999. pp. 7589-7599
- Umek, R.; Friedman, A.D. and McKnight, S.L.: CCAAT-Enhancer binding protein: A component of a diffenertiation switch. In: *Science*. 251. 1999. pp. 288-292
- Unlap, T.; Franklin, C.C.; Wagner, F. and Kraft, A.S.: Upstream regions of the c-Jun promoter regulate phorbol ester-induced transcription in U937 leukemic cells. In: *Nucleic Acids Res*. 20. 1992. pp. 897-902
- Wang, H.; Iakova, P.; Wilde, M.; Welm, A.; Goode, T.; Roesler, W. J. and Timchenko, N.A.: C/EBP α arrests cell proliferation through direct inhibition of cdk2 and cdk4. In: *Mol. Cell*. 8. : 2001. pp. 817-824

Wang, N.-D.; Finegold, M.J.; Bradley, A.; Ou, C.N.; Abdelsayed, S.V.; Wilde, M.D.; Taylor, L.R.; Wilson, D.R. and Darlington, G.J.: Impaired energy homeostasis in C/EBP α knockout mice. In: *Science*. 269. 1995. pp. 1108-1112

Wang, X.; Scott, E.; Sawyers, C. and Friedman, A.D.: C/EBP α bypasses granulocyte colony-stimulating factor signals to rapidly induce PU.1 gene expression, stimulate granulocytic differentiation, and limit proliferation in 32D cl3 myeloblasts. In: *Blood*. 94. 1999. pp. 560-571

Wei, P.; Inamdar, N. and Vedeckis V.W.: Transrepression of c-Jun gene expression by the glucocorticoid receptor requires both AP-1 sites in the c-Jun promoter. In: *Mol Endo.* 12. 1998. pp. 1322-1333

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

Zada, A.A; Singh, S.M.; Reddy, V.A.; Elsasser, A.; Meisel, A.; Haferlach, T.; Tenen D.G.; Hiddemann, W. and Behre G.: Downregulation of c-Jun expression and cell cycle regulatory molecules in acute myeloid leukemia cells upon CD44 ligation. In: *Oncogene*. 22. 2003. pp. 2296-308

Zagariya, A.; Mungre, S.; Lovis, R.; Ness, S.; Thimmapya, B. and Pope, R.: Tumor Necrosis Factor α gene regulation: Enhancement of C/EBP β -induced activation by c-Jun. In: *Mol Cell Biol*. 18. 1998. pp. 2815-2824

Zhang, D.-E.; Zhang, P.; Wang, N.-D.; Hetherington, C.J.; Darlington, G.J. and Tenen, D.G.: Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein α -deficient mice. In: *Proc Natl Acad Sci USA*. 94. 1997. pp.569-574

Zhang, P.; Iwama, A.; Datta, M.W.; Darlington, G.J.; Link, D.C. and Tenen, D.G.: Upregulation of interleukin 6 and granulocyte colony-stimulating factor receptors by transcription factor CCAAT enhancer binding protein α (C/EBP α) is critical for granulopoiesis. In: J. Exp. Med. 188. 1998. pp. 1173-1184

Erklärung nach § 2

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

**Herunterregulation des Proto-Onkogens c-Jun
durch das
CCAAT/Enhancer bindende Protein α
in der Myelopoese und in der akuten myeloischen Leukämie**

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

Herrn Professor Dr. med. W. Hiddemann

mit der Unterstützung durch

Herrn Privatdozent Dr. med. G. Behre

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

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur
Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher
noch nicht erworben habe.

Teile dieser Dissertation wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Rangatia, J.; Vangala, R.K.; Treiber, N.; Zhang, P.; Radomska, H.; Tenen, D.G.;
Hiddemann W. and Behre, G.: Downregulation of c-Jun expression by transcription
factor C/EBPalpha is critical for granulocytic lineage commitment.

In: Mol. Cell. Biol.. 22. 2002. pp. 8681-8694

München, Oktober 2004

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Nicolai Treiber
 Geburtsdatum: 12.04.1977
 Geburtsort: Leutkirch im Allgäu
 Adresse: Böblinger Straße 8
 89077 Ulm

Schulbildung:

08/83-07/87 Grundschole Deuchelried
 08/87-07/96 Rupert-Neß-Gymnasium Wangen
 im Allgäu
 07/96 Abitur

Zivildienst:

08/96-09/97 Oberschwaben Klinik Krankenhaus
 Wangen

Studium:

10/97 Beginn des Medizinstudiums an der
 Ludwig-Maximilians-Universität
 München
 08/99 Physikum
 08/00 1.Staatsexamen
 03/03 2.Staatsexamen
 07/04 3.Staatsexamen

Famulaturen:

03/00 Viszeral- und Abdominalchirurgie im
 Krankenhaus im Friedrichshain in Berlin

03-04/01	Allergologie, Dermatologie und Pulmonologie in der Zürcher Höhenklinik in Davos, Schweiz
08/01	Ambulantes Operationszentrum am Harras in München
03/02	Hämatologie und Onkologie im Peter MacCallum Cancer Institute in Melbourne, Australien

Praktisches Jahr:

04/03-08/03	1.Terzial in der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München
08/03-11/03	2.Terzial an der Medizinischen Klinik des Hôpital de l' Archet II, der Universität Nizza, Frankreich
12/03-03/04	3.Terzial im Krankenhaus Dritter Orden München-Nymphenburg

Arzt im Praktikum:

07/04-10/04	Klinik für Dermatologie und Allergologie der Universität Ulm
-------------	--

Weiterbildung:

seit 10/04	Assistenzarzt an der Klinik für Dermatologie und Allergologie der Universität Ulm
------------	---

Präsentationen:

11/00	Posterpräsentation beim Munich Research Festival
12/00	Posterpräsentation beim ASH Meeting in San Francisco. Titel: C/EBP α downregulates c-Jun in myeloid cells and its significance in granulopoiesis.

- 02/01 Harvard-Munich AML meeting in
Eibsee
- 06/02 Posterpräsentation beim 4.
Wissenschaftlichen Symposium der
Medizinischen Klinik III in Wildbad
Kreuth

Publikation:

Rangatia, J.; Vangala, R.K.; Treiber, N.; Zhang, P.; Tenen, D.G; Hiddemann, W. und Behre, G.: Downregulation of c-Jun expression by transcription factor C/EBPalpha is critical for granulocytic lineage commitment.

In: Mol. Cell. Biol.. 22. 2002. pp. 8681-8694

München, Oktober 2004

Danksagung

Die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von Oktober 1999 bis April 2002 in der Klinischen Kooperationsgruppe Leukämie des GSF-Hämatologikums und der Medizinischen Klinik und Poliklinik III - Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München angefertigt.

Großer Dank gebührt Frau Dr. hum. biol. Janki Rangatia, wie auch den anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe PD Dr. Behre, für ihre unerschöpfliche Hilfsbereitschaft beim Erlernen der molekularbiologischen Methoden und den vielen sehr anregenden Diskussionen im Rahmen dieser Arbeit.

Herrn Privatdozent Dr. med. Gerhard Behre bin ich zu besonderem Dank verpflichtet für seine Anregung zu diesem Thema, seine freundschaftliche Unterstützung und den engagierten und stetigen Gedankenaustausch.

Zuletzt, aber nicht weniger herzlich möchte ich meinem akademischen Lehrer und Betreuer Herrn Professor Dr. med. W. Hiddemann für die exzellenten Arbeitsbedingungen und für seine wissenschaftliche Unterstützung danken.