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

Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Hiddemann

Das leukämische Fusionsprotein AML1-ETO erhöht die Expression des Transkriptionsfaktors und Protoonkogens c-Jun

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

vorgelegt von
Michael Franzen
aus
München
2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Wolfgang Hiddemann
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Peter B. Becker
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Walter Neupert
	Prof. Dr. Ludger Klein
Mitbetreuung durch den Promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. med. G. Behre
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. M Reiser, FACR
Tag der mündlichen Prüfung:	30.10.2008

Weißes Blut.

Außer sehr wenig rothen Blutkörperchen bestand der ungleichh größere Theil auf denselben farblosen oder weißen Körpern, die auch im normalen Blut vorkommen, nämlich kleinen, nicht ganz regelmäßigen Protëinmolecülen, größeren, körnigen, fetthaltigen, kernlosen Körperchen und granulierten Zellen mit einem rundlichen, hufeisenförmigen oder kleeblattartigen oder mit mehreren napfförmigen, distincten Kernen. Die größeren dieser Zellen hatten ein leicht gelbliches Aussehen. Das Verhältniß zwischhen den farbigen und farblosen Blutkörperchen stellte sich hier ungefähr umgekehrt, wie im normalen Blut, indem die farblosen die Regel, die farbigen eine Art von Ausnahme zu bilden schienen. Wenn ich daher von weißem Blute spreche, so meine ich in der That ein Blut, in welchem die Proportion zwischen den rothen und farblosen (in Masse weißen) Blutkörperchen eine umgekehrte ist, ohne daß eine Beimischung fremdartiger chemischer oder morphologischer Elemente zu bemerken wäre.

ich würde mich glüchklich schätzen, der Wissenschaft dadurch zu einer neuen und, wie es mir scheint, nicht unwichtigen Thatsache verholfen zu haben. –

Dr. Virchow.[I]

[I] aus Virchow R. Weisses Blut. Frorieps Notizen 1845;36:151-156.

MEINER FRAU ELEONORA GEWIDMET

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung 1
1.1 Akute myeloische Leukämie (AML) und Hämatopoese 1
1.2 Die Translokation t(8;21) und das Fusionsprotein AML1-ETO 9
1.3 Das Protoonkogen c-Jun 14
1.4 Fragestellung 17

2 Material und Methoden 19
2.1 Materialien 19
2.1.1 Reagenzien 19
2.1.2 Reaktionskits 20
2.1.3 Enzyme und Marker 20
2.1.4 Laborgeräte und Verbrauchsmaterial 21
2.1.5 Puffer und Lösungen 22
2.1.6 Expressionsvektoren, Reporterkonstrukte und Primer 24
2.1.6.1 Eukaryotische Expressionsvektoren 24
2.1.6.2 Reporterkonstrukte 25
2.1.6.3 Primer 26
2.1.7 Antikörper 26
2.1.8 Verwendete Zelllinien und Bakterien 27
2.1.9 Kulturmedien 29
2.1.9.1 Bakterien 29
2.1.9.2 Suspensionszellen 29
2.2 Methoden 31
2.2.1 Zellkultur 31
2.2.1.1 Kulturbedingungen für Suspensionszellen 31
2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen 31
2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl 32
2.2.2 Transiente Transfektionen 32
2.2.2.1 DNA-Präparation 33

2.2.2.2 Elektroporation 33
2.2.2.3 Effectene® 33
2.2.2.4 Dual-Luciferase® Reporter Assay 34
2.2.3 Western Blot 36
2.2.3.1 Gewinnung der Zell-Lysate 36
2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration 36
2.2.3.3 In vitro Translation 37
2.2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 37
2.2.3.5 Western Blot 38
2.2.3.6 Stripping-Verfahren 39
2.2.3.7 Densitometrsiche Messung 39
2.2.4 Realtime PCR 40
2.2.4.1 RNA-Extraktion 40
2.2.4.2 cDNA-Synthese 40
2.2.4.3 Realtime-Polymerase-Kettenreaktion 41
2.2.5 MTT Proliferationsassay 43

3 Ergebnisse 45
3.1 AML1-ETO erhöht die Aktivität des vollständigen humanen c-Jun Promotors 45
3.2 Die Aktivierung des c-Jun Promotors durch AML1-ETO ist dosisabhängig 48
3.3 AML1 und CBFβ führen nicht zu einer Transaktivierung des c-Jun Promotors 50
3.4 Für die Transaktivierung des c-Jun Promotors durch AML1-ETO ist die proximale AP-1 Bindungsstelle entscheidend 52
3.4.1 Verschiedene Deletionskonstrukte des c-Jun Promotors sind transkriptionell aktiv 52
3.4.2 AML1-ETO erhöht die transkriptionelle Aktivität verschiedener Deletionskonstrukte des c-Jun Promotors 53
3.4.3 Wichtige Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen im proximalen c-Jun Promotor 55

3.4.4 Die proximale AP-1 Bindungsstelle ist für die Transaktivierung des c-Jun Promotors durch AML1-ETO verantwortlich 57
3.5 AML1-ETO und c-Jun kooperieren an der proximalen AP-1 Bindungsstelle des c-Jun Promotors 60
3.6 AML1-ETO und c-Jun kooperieren am AML1 Promotor, der die Expression von AML1-ETO reguliert 62
3.7 Die Expression von AML1-ETO in einer Tetracyclin-induzierbaren Zelllinie erhöht die c-Jun mRNA-Expression 65
3.8 AML1-ETO erhöht die c-Jun Protein Expression in U937 Zellen 68
3.9 Überexpression von AML1-ETO vermindert die Proliferation von U937 Zellen 72

4 Diskussion 75
4.1 AML1-ETO und c-Jun 75
4.2 Leukämie-Entstehung – Blockierung der Differenzierung durch AML1-ETO 79
4.3 Leukämie-Entstehung – Proliferation und AML1-ETO 82

5 Zusammenfassung 85

6 Literaturverzeichnis 87

7 Abkürzungsverzeichnis 103

8 Danksagungen 105

9 Lebenslauf 107

10 Erklärung nach § 2 108

1 EINLEITUNG

1.1 Akute myeloische Leukämie (AML) und Hämatopoese

Der Begriff Leukämie (gr. τό λευκό αἷμα = das weiße Blut) wurde 1845 von Rudolf Virchow geprägt. Er hatte in einer Blutprobe eines an einer chronisch myeloischen Leukämie erkrankten Patienten nach Zentrifugation eine weiße Bande zwischen Erythrozyten und Blutplasma bemerkt und damit erstmals die deutliche Zunahme der Leukozyten gegenüber den übrigen Blutzellreihen bei einer Leukämie beschrieben[86].

155 Jahre später erkrankten nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts im Jahr 2000 in Deutschland über 8900 Menschen an einer Leukämie[72].
Neben den klinisch chronisch verlaufenden Leukämien und der überwiegend im Kindesalter auftretenden akuten lymphatischen Leukämie macht die akute myeloische Leukämie (AML) mit einer altersbereinigten Inzidenz von ca. 3,4/100.000 Einwohnern in den USA[36] etwa ein Viertel aller Leukämieerkrankungen aus, wobei in den Industrienationen die höchsten Inzidenzraten vorherrschen[II].

An den akuten Leukämien bei Erwachsenen hat die AML einen Anteil von etwa 80%. In Abbildung 1-1 ist die altersspezifische Inzidenz der AML in den USA dargestellt. Es ist davon auszugehen, dass die Inzidenz der AML, die eine Erkrankung des höheren Lebensalters ist (medianes Erkrankungsalter: 65 Jahre, Inzidenz bei über 65-jährigen 17/100.000), bei der steigenden Lebenserwartung in den Industrieländern weiter zunehmen wird.

[II] Ries LAG EM, Kosary CL, Hankey BF, et al., editors. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2000. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2003. URL: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2000 entnommen am 26.03.2006.

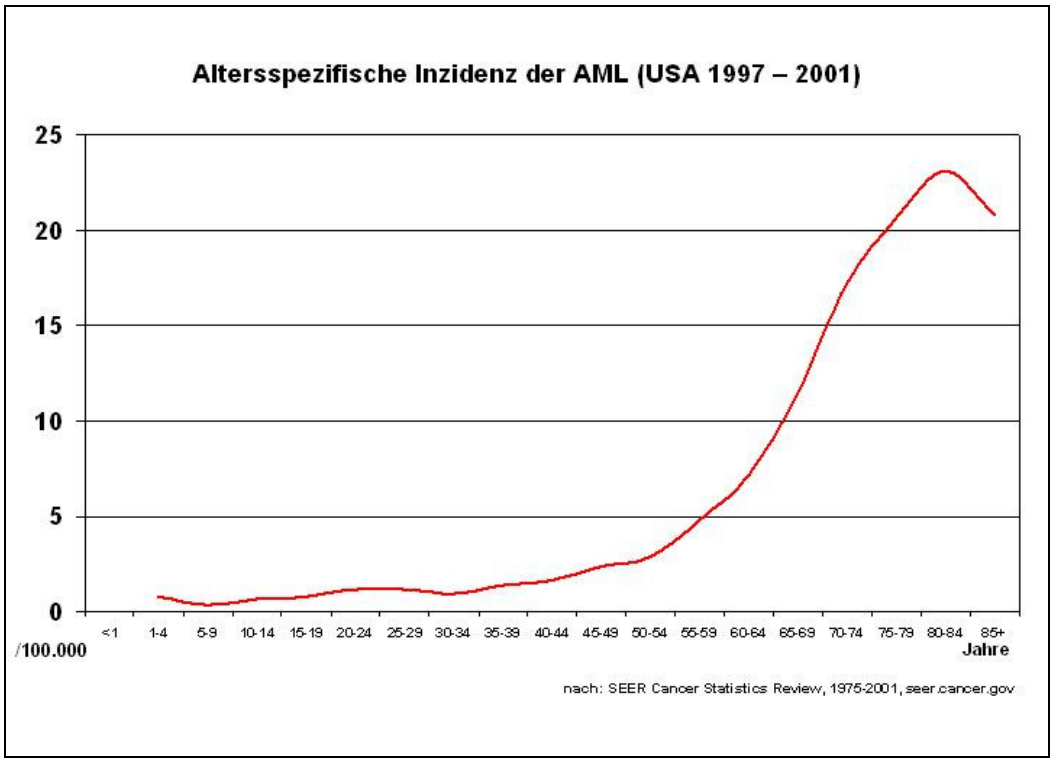


Abbildung 1-1:
Altersspezifische Inzidenz der AML in den USA (1997-2001)[III]

Die Geschlechtsverteilung ist ungefähr ausgeglichen. In den meisten Untersuchungen sind Männer etwas häufiger von einer AML betroffen als Frauen[IV].

Bisher konnten eine Reihe von pathogenetischen Faktoren für eine AML identifiziert werden, unter anderem genetische Erkrankungen wie das Down-Syndrom oder die Exposition gegenüber bestimmten chemischen Stoffen wie zum Beispiel Benzol.
Eine zunehmende Rolle spielen die therapieassoziierten AML-Erkrankungen (tAML), die noch Jahre nach einer Radio- und/oder Chemotherapie auftreten

[III] aus Cancer statistics Review, seer.cancer.gov, entnommen am 26.03.2006

[IV] Parkin DM WS, Ferlay J, Raymond L, Young J, editors. Cancer Incidence in Five Continents. Volume VII. IARC Scientific Pub. No. 143. Lyon, France: IARC Scientific Publications, 1997.

können. Bei ca. 6% der Patienten über 45 Jahre mit einer neu diagnostizierten AML handelt es sich um eine tAML. Sie zeichnen sich durch eine schlechtere Klassifizierbarkeit nach den FAB-Kriterien und eine schlechtere Prognose mit häufig ungünstigen genetischen Aberrationen aus. Besonders häufig tritt eine tAML nach der Behandlung eines Mammakarzinoms oder eines Hodgkin-Lymphoms auf. Für beide Erkrankungen konnte gezeigt werden, dass das Leukämie-Risiko nicht aufgrund des Grundleidens erhöht, sondern durch die Art der durchgeführten Therapie bedingt ist[3,13,41]. Eine besonders wichtige Rolle spielt die Wahl der Chemotherapeutika. Alkylantien und Topoisomerase-II-Hemmer sind am stärksten leukämogen, ohne dass der genaue Pathomechanismus bisher bekannt wäre.

Die pathogenetische Grundlage der akuten myeloischen Leukämie ist die maligne Transformation einer multipotenten hämatopoetischen Stammzelle, die zur klonalen Proliferation mit reduzierter Fähigkeit zur Differenzierung führt. Als Ergebnis kommt es zu einer Akkumulation dieser leukämischen Zellen insbesondere im Knochenmark mit einer Verdrängung der Produktion anderer Blutbestandteile, wie es Virchow beschrieben hat: „Wenn ich daher von weißem Blute spreche, so meine ich in der That ein Blut, in welchem die Proportion zwischen rothen und farblosen (in Masse weißen) Blutkörperchen eine umgekehrte ist,…“ [86]. Die Hauptsymptome der Erkrankung sind somit vor allem auf die Verdrängung der übrigen Blutzellreihen zurückzuführen und resultieren in Infektanfälligkeit, da auch die normale Leukopoese durch den malignen Klon verdrängt wird, Anämie und Blutungen. Zusätzlich klagen die Patienten über unspezifische Allgemeinsymptome wie Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Fieber, Gewichtsverlust und Dyspnoe.

Die AML wurde bisher in der French American Britisch (FAB) Klassifikation nach zytomorphologischen und zytochemischen Gesichtspunkten in acht Untergruppen AML-M0 bis AML-M7 eingeteilt, wie es in Tabelle 1-1 dargestellt ist. Bis auf wenige Ausnahmen ist dabei das Vorhandensein von mindestens 30% Blasten im Knochenmark für die Diagnose einer AML erforderlich. Die

zunehmenden Einblicke in die Biologie der AML und das Wissen um Chromosomenaberrationen haben dazu geführt, dass die WHO eine neue Klassifikation vorgeschlagen hat, die in Tabelle 1-2 dargestellt ist und sich mehr an diesen Gesichtspunkten orientiert[30].

FAB	Subtyp	häufige genetische Aberration	Produkt
M0	undifferenziert		
M1	myeloblastär ohne Reifung		
M2	myeloblastär mit Reifung	t(8;21)	AML1-ETO
M3	hypergranulär-promyelozytär	t(15;17)	PML-RARα
M4	myelomonozytär	Inv16, t(16;16)	CBFβ-MYH11
M4 Eo	Mehr als 5% Eosinophile		
M5	monozytär/monoblastär	t(9;11), t(11q23)	
M6	Erythroleukämie		
M7	Megakaryoblastenleukämie		

Tabelle 1-1:
FAB-Klassifikation der AML[V]

Die WHO-Klassifikation teilt die AML in vier Hauptgruppen ein. Zur ersten Gruppe zählt die AML mit rekurrenten zytogenetischen Aberrationen. Durch diese Gruppe wird den zunehmenden Erkenntnissen aus der Molekularbiologie Rechnung getragen. Eine weitere Neuerung ist die Absenkung des geforderten Blasten-Anteils im Knochenmark von 30 auf 20%.

[V] nach Bennett JM et al.

1. AML mit rekurrenten zytogenetischen Aberrationen	AML mit t(8;21), t(15;17), inv(16), t(16;16)
2. AML mit Mehrlinien-Dysplasie	mit oder ohne MDS in der Vorgeschichte
3. Therapie-assoziierte AML und MDS	nach Therapie mit Alkylanzien, Epipodophyllotoxinen oder sonstigen Typen
4. AML ohne weitere Spezifizierung	Einteilung nach zytomorphologischen und zytochemischen Gesichtspunkten

Tabelle 1-2:
WHO-Klassifikation der AML[VI]

Noch vor 25 Jahren hatte die Therapie der AML fast ausschließlich palliativen Charakter. Heute können viele Patienten dank der Optimierung der supportiven Therapie und der besseren Behandlungsmöglichkeiten von Infektionen und anderen Komplikationen mit einem kurativen Ansatz therapiert werden. Das primäre Ziel ist, mittels einer Induktionstherapie, die aus einer intensivierten zytostatischen Kombinationstherapie besteht, eine Remission zu erreichen, was mit den heutigen Therapieschemata in der Gruppe der 15-60-jährigen bei ca. 70-80% der Patienten gelingt. Bei etwa 25–35% dieser Patienten kann ein leukämiefreies Langzeitüberleben erreicht werden[7]. An die Induktionstherapie schließt sich die Postremissionstherapie an, deren wichtigste Elemente neben der Chemotherapie die autologe und allogene Stammzelltransplantation sind.

Grundlage für das Verständnis der Entstehung einer Leukämie sind die Vorgänge bei der normalen Hämatopoese. Unter Hämatopoese versteht man den komplexen Vorgang, bei dem sich aus einer pluripotenten hämatopoetischen Vorläuferzelle des Knochenmarks über mehrere Zwischenschritte die reifen, im peripheren Blut zu findenden Blutzellen entwickeln.

[VI] nach N. Lee Harris, JCO 1999

Die Hämatopoese des Menschen ist ein durch das komplexe Zusammenspiel von Wachstums- und Transkriptionsfaktoren in hohem Maße kontrollierter und regulierter Prozess. Zunächst entwickelt sich aus einer pluripotenten Stammzelle, die die sog. selfrenewal capacitiy besitzt, unter bestimmten Bedingungen, die im Detail noch nicht vollständig verstanden sind, die Ausdifferenzierung in Richtung der myeloischen, der erythropoetischen, der megakaryozytären oder der lymphatischen Zellreihe. Eine essentielle Rolle bei der Differenzierung in eine bestimmte Richtung spielen dabei Transkriptionsfaktoren. Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die durch bestimmte Mechanismen wie z.B. Bindung an die Promotorregion eines Gens, die Expression von Genen sowohl positiv als auch negativ regulieren können.

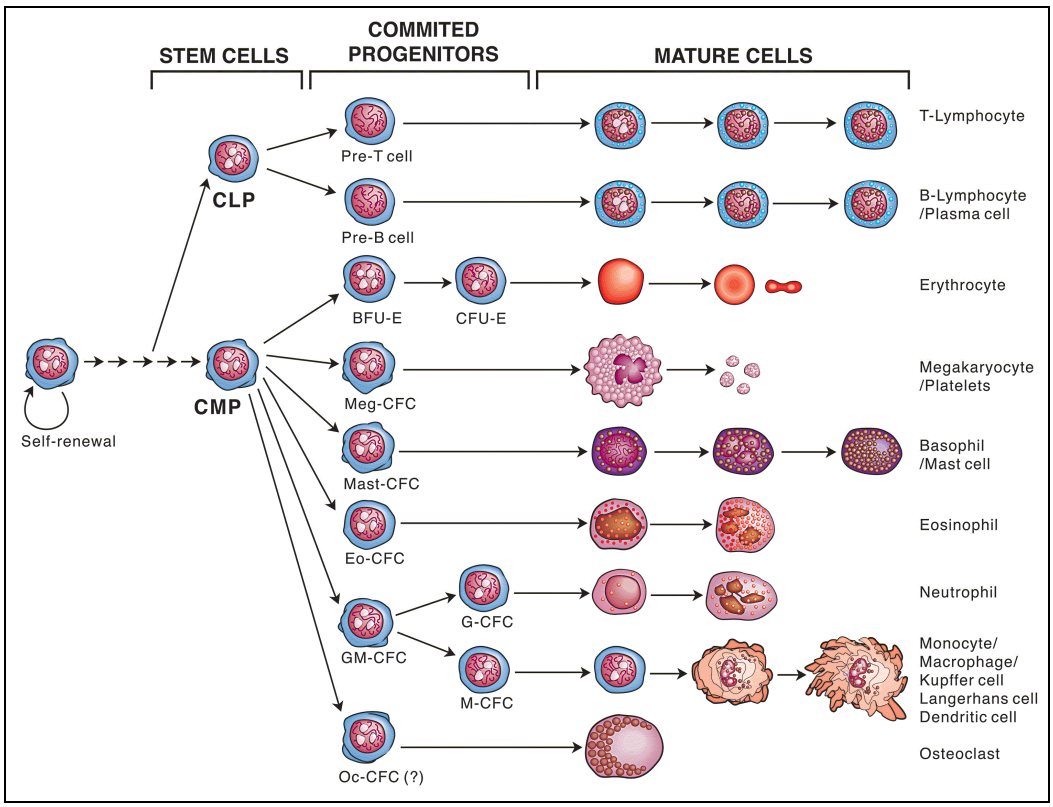


Abbildung 1-2:
Schematische Darstellung der Hämatopoese[VII]

[VII] aus http://www.bloodlines.stemcells.com, entnommen am 15.04.07.

Bei Leukämien sind die Gene, die für Transkriptionsfaktoren kodieren, häufig von genetischen Aberrationen betroffen. Diese führen zu einem Funktionsverlust der regulierenden Genprodukte und damit zum Verlust der Kontrolle über Proliferation und Differenzierung und damit letztendlich zur Entstehung einer Leukämie[74]. Das Ergebnis ist somit eine maligne entartete Zelle, deren Proliferationsfähigkeit erhalten geblieben und deren Fähigkeit zur Differenzierung verloren gegangen ist.

In bis zu 65% aller akuten Leukämien können somatisch erworbene, chromosomale Translokationen oder Inversionen nachgewiesen werden[76]. Zu den häufigen Translokationen bei der AML zählen die Translokation t(8;21) und die Inversion 16, die beide prognostisch vorteilhaft sind[9]. Sie alleine sind für eine maligne Transformation einer Zelle jedoch nicht ausreichend; in der Regel sind zusätzliche genetische Veränderungen nötig, um zu einer Leukämie zu führen. Eine wichtige Rolle bei dieser 2-Treffer-Hypothese könnten dabei aktivierende Mutationen im FLT3 (Fms-like tyrosine kinase 3)-Gen spielen. Diese so genannten Klasse 1-Mutationen führen zusammen mit der Mutation eines Transkriptionsfaktors (Klasse 2-Mutation) zur Entwicklung einer Leukämie[26]. Diese Hypothese bietet wichtige Anregung für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien.

Ein weiterer Pathomechanismus, über den leukämische Fusionsproteine zur Leukämieentstehung beitragen können, wurde 2003 von Alcalay et al. beschrieben. In Microarray-Untersuchungen wurde gezeigt, dass durch Überexpression der Fusionsproteine PML-RARα und AML1-ETO Gene aktiviert werden, die für die Erhaltung des Stammzell-Status verantwortlich sind und damit die Stammzell-Erneuerung aktiviert wird. Zum anderen werden DNA-Reperatur-Gene supprimiert, was zu einer Akkumulation von DNA-Schäden führt[1]. Leukämische Fusionsproteine scheinen so zum einen einen proleukämischen Zustand herbeizuführen und tragen zum anderen möglicherweise zur Entstehung von „second hits“ bei. Wenn diese einen sensiblen Bereich treffen, wie z.B. ein Tyrosinkinase-Gen, kann das schließlich zur Leukämieenstehung führen.

Der Begriff akute myeloische Leukämie bezeichnet somit nicht eine einzelne Erkrankung, sondern subsumiert vielmehr – je nach Art und Auswirkung der genetischen Mutation – eine Vielzahl verschiedener Krankheitsentitäten mit unterschiedlichem Krankheitsverlauf und Prognose für den betroffenen Patienten. Die Konsequenz daraus ist, dass je nach Art der Mutation die Erkrankung unterschiedlich behandelt werden muss. Dabei kann die Therapie umso spezifischer sein, je mehr über die chromosomale Aberration und die daraus resultierenden Veränderungen bekannt ist.

Das Wissen um die molekularbiologischen Grundlagen der akuten Promyelozytenleukämie, die mit der Translokation t(15;17) und dem daraus resultierenden Fusionsprotein PML/RARα assoziiert ist, hat auch die Therapie wesentlich beeinflusst. Die Therapie mit dem Vitamin-A-Säure-Derivat all-trans-Retinsäure ist die erste – und bisher einzige – spezifische, auf den Pathomechanismus ausgerichtete Therapie der akuten Leukämie. Diese führt zu einer Ausdifferenzierung des Leukämieklons und zur Wiederherstellung der normalen polyklonalen Hämatopoese[34,37].

1.2 Die Translokation t(8;21) und das Fusionsprotein AML1-ETO

Die Translokation t(8;21) wurde erstmals 1973 beschrieben[67]. Die zwei von der Translokation betroffenen Gene, AML1 (acute myeloid leukemia 1) und ETO (Eight Twenty One) konnten jedoch erst Anfang der 1990er Jahre identifiziert werden. Das daraus resultierende Fusionsprotein AML1-ETO findet sich in 22,0% aller AML-Fälle, bei der AML-M2, bei der es am häufigsten nachweisbar ist, in 44,8%[11]. Wesentlich seltener ist es auch bei der AML M0, M1 und M4 nachweisbar.

Bei der Translokation t(8;21) kommt es zu einer Fusion von einem Teil des AML1-Gens auf Chromosom 21q22 mit nahezu dem gesamten ETO-Gen auf Chromosom 8q22[17,53]. Das Ergebnis ist das Protein AML1-ETO, bei dem der N-terminale Anteil von AML1 mit dem C-terminalen Anteil von ETO fusioniert ist[50]. Die runt homology domain (RHD) von AML1, die für die DNA-Bindung und Protein-Protein-Interaktionen von entscheidender Bedeutung ist, bleibt dabei erhalten, während die gesamte Transaktivierungsdomäne von AML1 verloren geht[55].

AML1 (auch RUNX1, CBFα und PEBP2αB genannt) gehört zur RUNX-Familie, zu der neben AML1 noch AML2 und AML3 gehören und ist Bestandteil des Core Binding Transcription Factors (CBF), der häufig in Translokationen bei AML involviert ist. Es handelt sich dabei um ein Heterodimer, das sich aus der CBFα-Untereinheit und der CBFβ-Untereinheit zusammensetzt. Das normale AML1-Gen, das aus neun Exons besteht und unter der Kontrolle von zwei unabhängigen Promotoren steht[25], kodiert für mehrere Proteine. Die wichtigsten sind AML1B und AML1b. Bei dem Protein AML1A fehlt – wie in AML1-ETO – die Transaktivierungsdomäne, es wurde deshalb in Experimenten als kompetitiver Inhibitor von AML1B eingesetzt. Zur effektiven DNA-Bindung bildet AML1 ein Heterodimer mit CBFβ über die Runt-Domäne, die dem Drosophila-Protein Runt sehr ähnlich ist[49].

Interessanterweise betreffen zwei weitere chromosomale Aberrationen, die bei AML vorkommen, die Inversion 16 inv(16) und Translokation t(16;16) den Bindungspartner von AML1 CBFβ[17,43]. In AML1-ETO ist die Runt-Domäne erhalten, wodurch die Bindung an Zielgen-Promotoren von AML1 möglich bleibt.

AML1 ist an mehreren chromosomale Translokationen beteiligt. Neben der Translokation t(8;21) sind bisher noch die Translokationen t(16;21) [22], die zur Fusion von AML1 und MTG16 führt und die Translokation t(3;21) [54], die in der Blastenkrise bei chronisch myeloischer Leukämie gefunden wird, bekannt. Das Fusionsprotein dieser Translokation ist AML1-EVI1. Die häufigste Translokation bei der B-Zell-Leukämie, t(12;21) [27], resultiert in dem Fusionsprotein AML1-TEL. Die Inversion inv(16) [43], bei der MYH11 mit CBFβ, einem wichtigen Bindungspartner von AML1, fusioniert ist, betrifft die Funktion von AML1 indirekt.

Als Zielgene von AML1 wurden unter anderem Interleukin 3 (IL-3)[82], GM-CSF[80], und CSF-1[94] identifiziert. Es gibt jedoch Hinweise, dass AML1 auch Transkriptions-hemmend wirken kann.

Die Hypothese, dass AML1, das bei Leukämien sehr häufig von chromosomalen Translokationen betroffen ist, ein wichtiger Regulator der Hämatopoese ist, wurde durch Experimente mit AML1-null Mäusen bestätigt, die keine hämatopoetischen Vorläuferzellen bilden können. Die Tiere sterben an Tag 12,5 durch Hämorrhagien verursacht durch den hämatopoetischen Defekt[57]. Neueste Untersuchungen an adulten Mäusen mit einem konditionalen AML1-Knockout-System entwickeln ca. 2 Monate nach Induktion ein Syndrom ähnlich einem myelodysplastischen Syndrom[62].

CBFβ ist ein 187 Aminosäuren großes Protein, das selbst nicht an DNA bindet, aber die DNA-Bindung und die transkriptionelle Kapazität von AML1 erhöht[56].

Wie wichtig CBFβ für die normale Funktion von AML1 ist, zeigt, dass CBFβ null Mäuse die gleichen Symptome wie AML1 knockout Mäuse vorweisen[70,88].

ETO (auch MTG8 für myeloid transforming gene 8 genannt) war bis zu seiner Entdeckung als Fusionspartner von AML bei der Translokation t(8;21) unbekannt. Deshalb ist ETO ein Akronym für die Translokation (8;21) (Eight Twenty One).

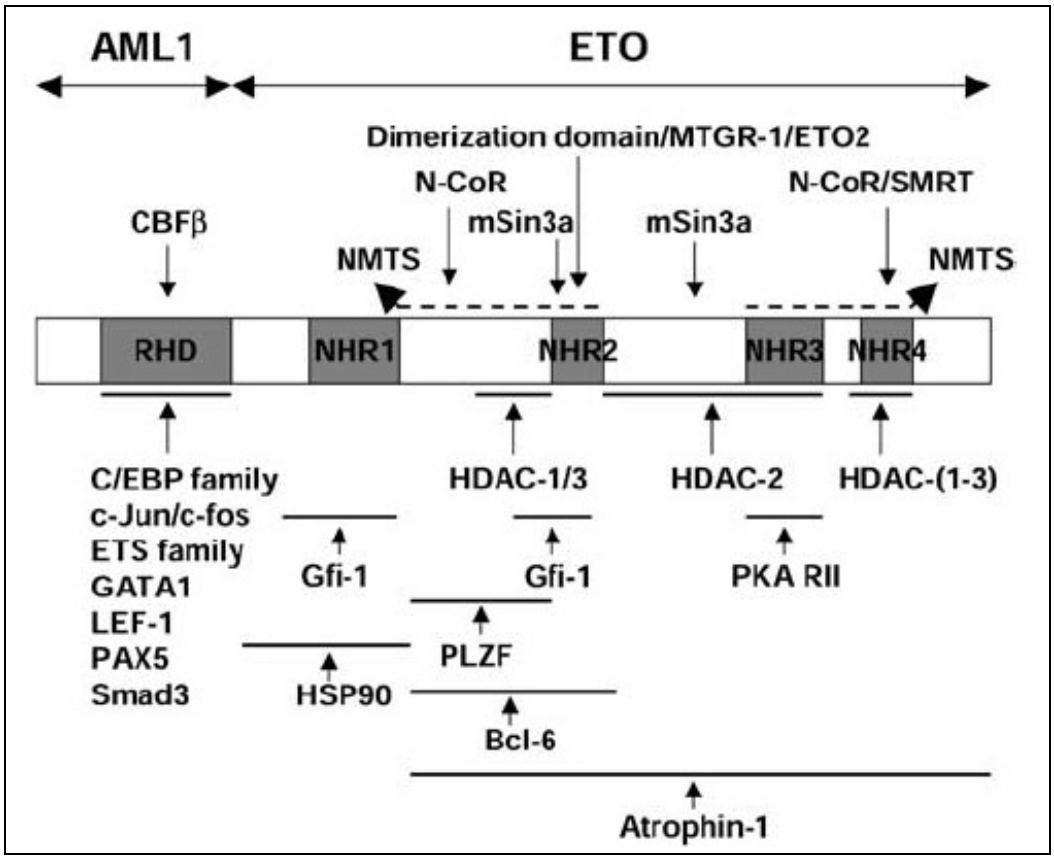


Abbildung 1-3:

Schematischer Aufbau von AML1-ETO mit Protein-Protein-Bindungsstellen. Die runt homology domain (RHD) von AML1 ist vollständig vorhanden, während die Transaktivierungsdomäne nicht Bestandteil des Fusionsproteins ist. Die vier nervy homology regions (NHR) von ETO sind dagegen alle auch im Fusionsprotein enthalten.[VIII]

[VIII] aus Peterson et al. The 8;21 translocation in leukemogenesis

ETO hat vier evolutionär konservierte Domänen, die wegen Ihrer Ähnlichkeit zum Drosophila Protein Nervy Homology regions 1-4 genannt werden[14,18].
Über diese Domänen interagiert ETO mit anderen Proteinen. Eine kritische Rolle scheint dabei die Zink-Finger-Domäne von NHR 4 zu spielen, an die SMRT und N-CoR binden, die wiederum einen Corepressor-Komplex mit Sin3a und Histon Deacetylasen bilden können[24,35,47,87]. Dieser Corepressor-Komplex führt zu einer negativen Regulation der Transkription von Zielgenen. Doch auch an andere Bereiche von ETO können diese Corepressoren binden[2].

Das Fusionsprotein hat die Fähigkeit zur Bindung an die AML1-DNA-Bindungsstelle ($TG^{T}/_{C}GGT$) über die Runt-DNA-Domäne, die dem Drosophila-Protein Runt sehr ähnlich ist, behalten[49].

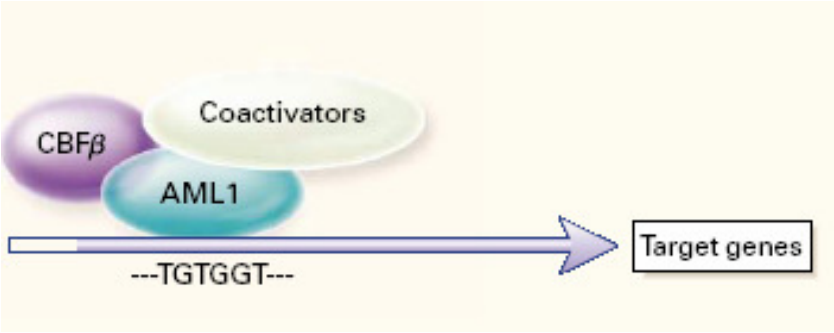


Abbildung 1-4:
Schematische Darstellung der Funktion von AML1 und CBFβ. AML1 bindet über die runt-Domäne an die DNA in der Promotorregion der Zielgene. CBFβ und andere Coaktivatoren verstärken das Transaktivationspotential von AML1.[IX]

An der Zielsequenz scheint es als dominanter Repressor zu fungieren. Diese Funktion scheint durch eine direkte Interaktion von ETO mit dem Corepressor-Komplex vermittelt zu sein[44,45].

[IX] aus Löwenberg et al.: Acute Myeloid Leukemia{Lowenberg, Downing, et al. 1999 77 /id}

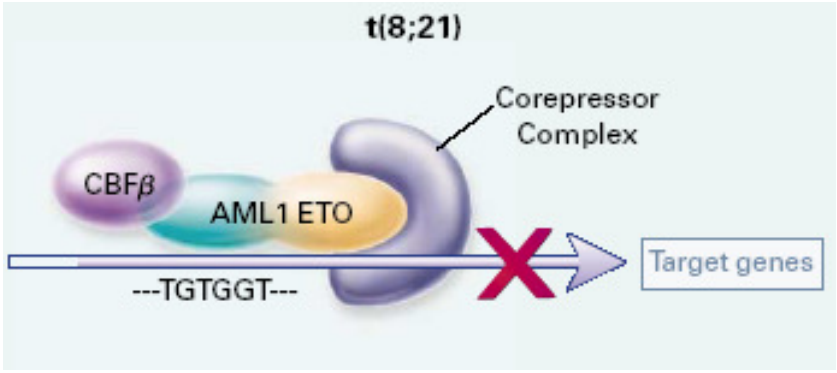


Abbildung 1-5:
Schematische Darstellung der repressiven Funktion von AML1-ETO. AML1-ETO bindet über die erhaltene runt-Domäne ebenfalls an die DNA im Bereich des Promotors der Zielgene. Über den ETO-Anteil des Fusionsproteins bindet der Corepressor-Komplex, der die Transskription der Zielgene hemmt.[IX]

Wie Untersuchungen am Mausmodell zeigen, ist AML1-ETO allein jedoch nicht in der Lage zu einem Differenzierungsblock oder zur Entstehung einer Leukämie zu führen. AML1-ETO knockin-Mäuse versterben in der Embryonalphase; jedoch nicht an einer Leukämie, sondern – ähnlich wie AML1 knockout-Mäuse – durch einen Verlust der normalen Hämatopoese. Wenn man – um diese embryonale Letalität zu umgehen – Mäuse mit konditional steuerbarem AML1-ETO generiert, haben diese nur minimale hämatopoetische Aberrationen. Erst nach zusätzlichen genetischen Schädigungen der hämatopoetischen Vorläuferzelle kommt es zur Entwicklung einer akuten myeloischen Leukämie mit AML1-ETO typischen Charakteristika[33,60,65,93].

Neueste Untersuchungen weisen darauf hin, dass insbesondere die Kombination aus chromosomalen Translokationen, die häufig Transkriptionsfaktoren wie CBF involvieren und Punktmutationen, die häufig Gene der innerzellulären Signalübertragung betreffen, zur Entstehung einer Leukämie führen[71].

1.3 Das Protoonkogen c-Jun

Das Protoonkogen c-Jun, das ursprünglich 1987 als zelluläres Gegenstück zu dem viralen Onkogen v-Jun entdeckt wurde[48], ist Bestandteil der AP-1 (activator protein-1) Transkriptionsfaktorfamilie, zu der neben der Jun-Gruppe mit c-Jun, JunB und JunD auch die Untergruppen Fos, Maf und ATF gehören. Gemeinsam ist diesen Transkripitonsfaktoren, dass sie TPA (Tetradecanoyl-12,13-phorbolacetat)-response elements (TRE, 5′-TGAG/CTCA-3′) oder cAMP response elements (CRE, 5′-TGACGTCA-3′) erkennen können[10] und dass sie zur bZIP-Familie gehören, die über die Leucin-Zipper-Region dimerisieren und an die DNA binden.

Das 39kDa große c-Jun Protein besteht aus einer C-terminalen Leucin-Zipper DNA-Bindungs-Region (b-ZIP) und einer N-terminalen Transkriptions-Aktivierungs-Domäne. Jun N-terminal kinase (JNK) bindet über eine Docking-Domäne im Bereich der δ-Region an c-Jun und führt über die Phosphorylierung von Serin 63/73 und unter bestimmten Umständen auch von Threonin 91/93[32] zu einer Erhöhung des Transaktivations-Potentials von c-Jun[61,75].

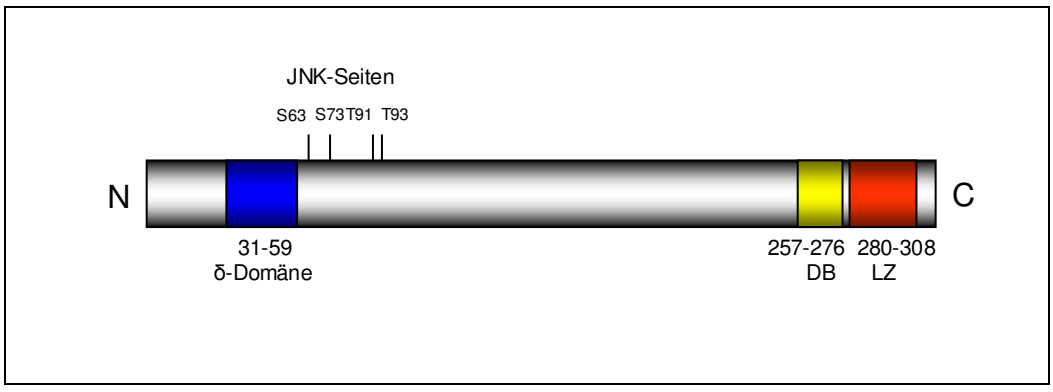


Abbildung 1-6:
Schematische Darstellung von c-Jun mit DNA-Bindungs-Domäne (DB)und Leucin-Zipper-Domäne (LZ), über die es zur Homo- oder Hetero-Dimerisierung kommt. Jun N-terminal kinase bindet über eine Docking-Region im Bereich der δ-Domäne und phosphoryliert c-Jun an den Phosphorylierungsstellen.

c-Jun, der potenteste transkriptionelle Aktivator der AP-1-Familie bildet mit den anderen AP-1 Mitgliedern Homo- oder Heterodimere und bindet über die Leucin-Zipper an die DNA, wobei es je nach Bindungspartner TPA- oder cAMP-response elements in einem Promotor erkennt[69]. Heterodimere haben dabei eine höhere DNA-Bindungs-Affinität als Homodimere.

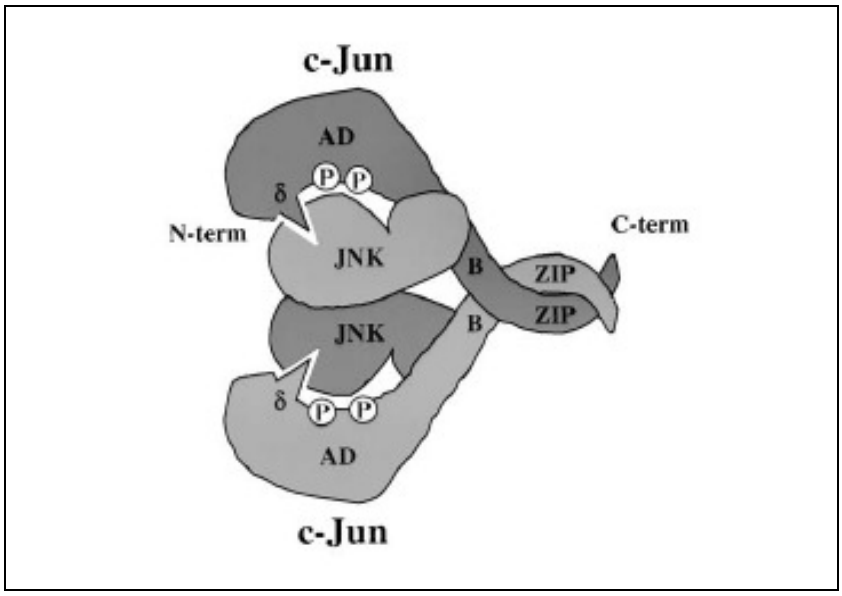


Abbildung 1-7:
JNK (Jun N-terminal kinase) bindet über die Docking-Domäne in der δ-Region an c-Jun und führt über die Phosphorylierung von S63/73 zur Steigerung der transkriptionellen Aktivität. Dieser Bereich von c-Jun wird daher als Aktivierungsdomäne (AD) bezeichnet. In dieser Darstellung kommt es über die C-terminal gelegene Leucin-Zipper-Domäne (ZIP) zur Homodimerisierung.[X]

Die Promotorregion des c-Jun Gens enthält selbst zwei AP-1/CRE-Bindungsstellen, wobei eine von ihnen proximal und eine distal gelegen ist. c-Jun stimuliert durch Bindung an die AP-1/CRE Bindungsstellen in seinem Promotor seine eigene Transkription im Sinne einer positiven Autoregulation[89].

[X] aus Dunn et al.: Molecular mechanism and biological functions of c-Jun N-terminal kinase signalling via the c-Jun transcription factor{Dunn, Wiltshire, et al. 2002 220 /id}

Die AP-1-Aktivität wird durch multiple Faktoren wie Wachstumsfaktoren, Zytokine, bakterielle und virale Infektionen und einer Vielzahl von physikalischen und chemischen Stressfaktoren stimuliert. Die Aktivierung von c-Jun erfolgt dabei vor allem über die JNK- und p38 mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Kaskade, an deren Ende die Phosphorylierung von c-Jun und anderen AP-1-Mitgliedern und damit die Erhöhung der transkriptionellen Aktivität steht. Durch Bindung an die AP-1 Bindungsstellen im c-Jun Promotor kommt es auch zu einer erhöhten Transkription von c-Jun selbst[29]. Die funktionellen Eigenschaften von c-Jun sind vielfältig, stark vom jeweiligen Zelltyp abhängig und noch nicht bis ins Detail verstanden. Es gibt experimentelle Hinweise dafür, dass c-Jun sowohl eine wichtige Rolle bei der Zell-Proliferation und Tumorentstehung, als auch bei der Apoptose spielt.

In Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von AML1-ETO zu erhöhten Werten von phosphoryliertem c-Jun und erhöhter AP-1-Aktivität und in Verbindung damit zu maligner Transformation führt[20]. Die pathophysiologische Bedeutung dieser Ergebnisse – insbesondere in myeloischen Zellen – ist jedoch noch unklar und soll Gegenstand dieser Arbeit sein.

1.4 Fragestellung

Anhand folgender Fragestellungen sollen in dieser Arbeit die möglichen Mechanismen der malignen Transformation hämatopoetischer Zellen untersucht werden.

Führt die Überexpression des Fusionsproteins AML1-ETO zu einer Aktivierung des c-Jun Promotors in U937-Zellen?

Über welche DNA-Bindungsstelle wird der c-Jun Promotor durch AML1-ETO aktiviert?

Haben c-Jun und/oder AML1-ETO allein oder zusammen einen Effekt auf die Transkriptionsaktivität der Promotoren, die die Expression von AML1-ETO kontrollieren?

Führt die Aktivierung des c-Jun Promotors zu erhöhter c-Jun-Transkription?

Wird die Translation des Transkriptionsfaktors c-Jun erhöht und ist das c-Jun-Protein in erhöhten Spiegeln nachweisbar?

Wird die Proliferation von U937 Zellen durch Überexpression des Fusionsproteins AML1-ETO erhöht?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Reagenzien

Acrylamid- Bisacrylamid	BioRad GmbH, München, Deutschland
Agarose	Life Technologies, Paisley, Schottland
Ammoniumperulphat (APS)	BioRad GmbH, München, Deutschland
DMEM	PANBiotech, Aidenbach,Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidium Bromid	Life Technologies, Paisley, Schottland
Fetal Bovine Serum	Life Technologies, Paisley, Schottland
L-Glutamin	Gibco BRL, Rockville, MD, USA
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	Gibco BRL, Rockville, MD, USA
PCR Primer	Metabion, Martinsried, Deutschland
RPMI 1640 Medium	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
SDS	BioRad GmbH, München, Deutschland
Stickstoff, flüssig	Linde, München, Deutschland
Temed	BioRad GmbH, München, Deutschland
Tris	BioRad GmbH, München, Deutschland
Trypsin	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Trypanblau 0,5%	Serva, Heidelberg, Deutschland
Zinksulfat	Sigma, St.Louis, USA

2.1.2 Reaktionskits

Biorad-Protein-Estimation Kit	BioRad GmbH, München, D.
Detection system ECL	Amersham, Braunschweig, D.
Effectene®	Qiagen, Hilden, Deutschland
Fast Start SYBR Green I Kit	Roche Diagnostik, Mannheim, D.
Dual-Luciferase® Reporter Assay Kit	Promega, Mannheim, Deutschland
Maxiprep DNA-Isolations Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
MTT-Assay	LGC Promochem GmbH, Wesel, D.
Omniscript® RT cDNA Synthese Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Plasmid Isolations Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
TNT-Reticulocyte-lysate-system	Promega, Mannheim, Deutschland

2.1.3 Enzyme und Marker

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

2.1.4 Laborgeräte und Verbrauchsmaterial

Inkubator für Bakterien	Heraus, Hanau, Deutschland
Schüttler für Bakterien	New Brunswick Scientific, Nürtlingen, D.
Blotting Papier	Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland
Cryovials	Nunc, Roskilde, Dänemark
ECL-Filme	Amersham, Braunschweig, D.
Entwicklungs-Maschine	Agfa, Leverkusen, Deutschland
Gelelektkrophorese-System	Bio-rad GmbH, München, D.
Heizblock	Techne, Cambridge, Großbritannien
Light Cycler™ Real time PCR Maschine	Roche, Mannheim, Deutschland
Luminometer Turner Designs TD-20/20	Promega, Madison, WI, USA
pH-Meter	WTW, Weilheim, Deutschland
Photometer	Pharmacia, Freiburg, Deutschland
Pipetten	Gilson, Langfeld, Deutschland
Pipettenspitzen	Star Labs, K&K Laborbedarf, München, D.
QuickSpin®Säulen	Roche, Mannheim, Deutschland
Tank für flüssigen Stickstoff	Cryoson, Schöllkrippen, Detuschland
Inkubator	WTB, Tuttlingen, Deutschland
Mikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugiergefäße	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sterile Arbeitsbank	BDK, Sonnenbühl, Deutschland
Sterile Filter	Gelman Sciences, Ann Arbor, USA
Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland

2.1.5 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen, die nicht in fertigen Kits enthalten waren, sind im Folgenden aufgeführt:

Zell-Lysier-Puffer

RIPA Lysier-Puffer	1% NP40
	0,5% Natriumdeoxycholat
	0,1% SDS
	0,15M NaCl
	5mM EDTA
	50mM Tris (pH 8,0)
	1mM PMSF
	10mM Natriumpyrophosphat
	50mM Natriumfluorid
	0,2mM Natriumorthovanadat
	10µg/ml Chymostatin
	10µg/ml Pepstatin A
	10µg/ml Leupeptin A
	10µg/ml Aprotinin
	10µg/ml Antipain

Lösungen für Gel-Elektrophorese (SDS-Page)

Tankpuffer (4x) (pH 8,5)	12g Tris
	57,6g Glycin
	4g SDS
Transfer Puffer (pH 8,5)	25mM Tris
	0,2M Glycin
	20% Methanol

Loading Dye (2x)	125mM Tris/HCl (pH 6,8) 4% SDS 10% β-Mercapto-Ethanol 30% Glycerol 0,004% Bromophenol Blau

SDS/Acrylamid Gel

Running Gel (10%)	Stacking Gel (10%)
3,0ml Acrylamid (40%)	0,65ml Acrylamid (40%)
3,8ml 1,5M Tris (pH 8,8)	1,25ml 0,5% Tris (pH 6,8)
0,1ml 10% SDS	0,05ml 10% SDS
0,2ml 10% APS	0,05ml 10% APS
5,0µl TEMED	5,0µl TEMED
2,8ml dH_2O	3,0ml dH_2O

Western Blot Lösungen

TBS-Puffer (10x) (Tris-buffered saline)	24,2g Tris 80g NaCl mit HCl auf pH 7,6 einstellen auf 1l H_2O
TBST	0,05% Tween 20 in 1x TBS
Block-Puffer	0,1% Tween 20 in 1x TBS 5% Magermilchpulver
Verdünnungspuffer für Antikörper	0,05% Tween 20 in 1x TBS 2,5% Magermilchpulver

Stripping Lösung	0,1M β-Mercapto-Ethanol 2% SDS 1M Tris (pH 6,8)
TE Puffer	10mM Tris/HCl (pH 8,0) 1mM EDTA

2.1.6 Expressionsvektoren, Reporterkonstrukte und Primer

2.1.6.1 Eukaryotische Expressionsvektoren

pCMV5

eukaryoter Expressionsvektor mit einer Größe von 4,7 kb mit einem Ampicillin Resistenz Gen und starkem CMV-Promotor. Bezugsquelle: Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland

pCMV5-AML1-ETO

pCMV5-AML1

pCMV5-ETO

pCMV5-CBFβ

Expressionsvektoren. Bezugsquelle: Scott Hiebert, St. Jude Children´s Hospital, Memphis, USA[40].

pGdBBX

vollständige G6PD-cDNA im Expressionsvektor pUC12. Bezugsquelle: Andreas Hochhaus, III. Medizinische Universitätsklinik, Mannheim, Deutschland[16].

2.1.6.2 Reporterkonstrukte

pRL-null

Interner Kontroll-Vektor für den Dual-Luciferase® Reporter Assay Systems, der die cDNA enthält, die für die Renilla Luciferase kodiert und keinen weiteren eukaryotischen Promotor oder Enhancer enthält. Bezugsquelle: Promega, Madison, WI, USA.

pGL2

Bezugsquelle: Promega, Mannheim, Deutschland

pGL3

Bezugsquelle: Promega, Mannheim, Deutschland

pXP2

Bezugsquelle: Behre

Menschlicher c-Jun Promotor (bp -1780/bp +731) in pGL3
Menschlicher c-Jun Promotor (bp -952/bp +731) in pGL3
Menschlicher c-Jun Promotor (bp -719/bp +731) in pGL3
Menschlicher c-Jun Promotor (bp -345/bp +731) in pGL3
Menschlicher c-Jun Promotor (bp -180/bp +731) in pGL3
Menschlicher c-Jun Promotor (bp -63/bp +731) in pGL3

Bezugsquelle: Wayne Vedeckis, State University Medical Center, New Orleans, USA[89].

Menschlicher c-Jun Promotor (bp -79/bp +170) in pGL2
Menschlicher c-Jun Promotor (bp -79/bp +170) in pGL2, proximale AP-1 site mutiert

Bezugsquelle: Xiao-Fan Wang, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina, USA[78,91].

Menschlicher M-CSF-Rezeptor Promotor (bp -416/bp +71) in pXP2

Bezugsquelle: D. E. Zhang, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA[66].

Menschlicher distaler AML1 Promotor in pGL2

Menschlicher proximaler AML1 Promotor in PGL2

Bezugsquelle: G. Behre, III. Medizinische Klinik der Universität München, Deutschland.

2.1.6.3 Primer

c-Jun Sense:	5' -gca tga gga acc gca tcg ctg cct cca agt- 3'[38]
c-Jun Antisenese:	5' -gcg acc aag tcc ttc cca ctc gtg cac act- 3'[38]
G6PD Sense:	5' -ccg gat cga cca cta cct ggg caa g- 3'[16]
G6PD Antisenes:	5' -gtt ccc cac gta ctg gcc cag gac ca- 3'[16]
AML1-ETO Sense:	5' -atg acc tca ggt ttg tcg gtc g- 3'
AML1-ETO Antisense:	5' –tga act ggt tct tgg agc ctc ct- 3'

2.1.7 Antikörper

Primäre Antikörper

Anti c-Jun/AP-1

Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen die Amino-terminale Domäne. Verdünnung für den Western Blot. 1:1000, Bezugsquelle: Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA

Anti ETO

Polyklonaler Ziegen-Antikörper gegen das Carboxy-Ende von ETO. Verdünnung für den Western Blot 1:1000, Bezugsquelle: Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA

Anti β-Tubulin

Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen die Aminosäuren 210-444 am Carboxy-Ende von β-Tubulin. Verdünnung für den Western Blot: 1:500, Bezugsquelle: Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA

Sekundäre Antikörper

Anti Kaninchen-IgG

HRP-konjugierter Esel-Antikörper. Verdünnung für den Western Blot 1:2000, Bezugsquelle: Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland

Anti Ziegen IgG

HRP-konjugierter Kaninchen-Antikörper. Verdünnung für den Western Blot 1:2000, Bezugsquelle: DAKO, Dänemark

2.1.8 Verwendete Zelllinien und Bakterien

U937

Es wurden U937 Zellen verwendet, die aus einer humanen monozytären Tumorzelllinie stammen[79]. In Abbildung 2-1 sind U937 Zellen lichtmikroskopisch dargestellt.

Bezugsquelle: ACC5, DSMZ, Braunschweig, Deutschland.

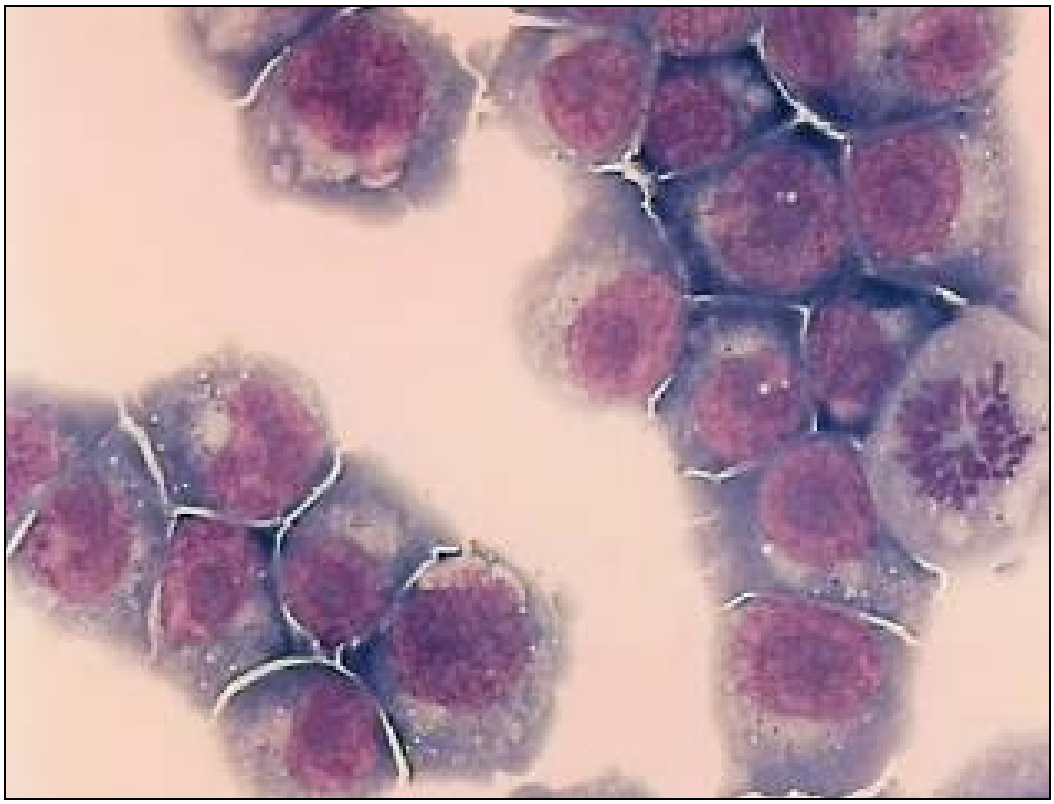


Abbildung 2-1:
Lichtmikroskopische Darstellung von U937 Zellen

U937 mit Zink-induzierbarer Expression von AML1-ETO (U937 Zn/AE)

Für einige Versuche wurden U937 Zellen, die mit einem Zink-induzierbaren AML1-ETO-Expressions-Vektor stabil transfiziert worden waren, verwendet. Die Expression von AML1-ETO wurde durch Hinzufügen von 100µM Zn^{2+} zum Zellkulturmedium induziert.

Bezugsquelle: Pier Guiseppe Pelicci, Mailand, Italien[19].

U937 mit Tetracyclin-regulierter Expression von AML1-ETO (U937 TET/AE)

Für die Realtime PCR und den Western Blot wurden U937 Zellen, die mit einem Tetracyclin-regulierten (Tet-off-System) AML1-ETO-Expressionsvektor stabil transfiziert worden waren, verwendet. Die Expression von AML1-ETO wurde durch dreimaliges Waschen der Zellen in PBS und Aussäen in Tetracyclin-freiem Kulturmedium induziert.

Bezugsquelle: Dong-Er Zhang, The Scripps Research Institute, La Jolla, USA[8].

Escherichia coli DH 5α

Zur Herstellung der benötigten DNA wurden mit den jeweiligen Plasmiden transformierte Escherichia coli DH 5α Bakterien verwendet.

Bezugsquelle: Life Technologies, Paisley, Schottland

2.1.9 Kulturmedien

2.1.9.1 Bakterien

Zur Kultivierung von Bakterien wurde LB (luria bertani) Medium mit entsprechenden Antibiotika verwendet.

2.1.9.2 Suspensionszellen

U937 und U937 Zn^{2+} induzierbare AML1-ETO Zelllinie:

RPMI

10% FBS

1% L-Glutamin

1% Penicillin-Streptomycin

U937/TET Zelllinie:

RPMI

10% FBS

1% L-Glutamin

1µg/ml Tetracyclin

0,5µg/ml Puromycin

U937/TET/AML1-ETO Zelllinie:

RPMI

10% FBS

1% L-Glutamin

1µg/ml Tetracyclin

0,5µg/ml Puromycin

1mg/ml G418

Einfriermedium:

70% RPMI

20% FBS

10% DMSO

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kulturbedingungen für Suspensionszellen

Die U937-Zellen wurden in Begasungsbrutschränken bei 37°C, 96% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 inkubiert. Alle 2-3 Tage wurde das Kulturmedium gewechselt und die Suspensionszellen in einer Dichte von 1 x 10^5 Zellen/ml eingesetzt. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer sterilen Arbeitsbank durchgeführt.

2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die verwendeten U937-Zelllinien wurden in flüssigem Stickstoff aufbewahrt und bei Bedarf wieder aufgetaut.
Zum Einfrieren wurden die Zellen zunächst in Suspension gebracht und durch 5-minütige Zentrifugation bei 1000rpm pelletiert. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium zur Vermeidung von Eiskristallen resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Nunc Cryovials (2ml) 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 wurde die gefrorene Zellsuspension bei 37°C in einem Wasserbad auf 4°C erwärmt und anschließend mit 10ml Vollmedium vermischt. Nach 2-minütiger Zentrifugation bei 1000rpm wurden der Überstand verworfen. Das Pellet wurde erneut in Vollmedium aufgenommen. Die Zellen wurden auf 10 oder 15cm Kulturschalen mit einer Dichte von 1 x 10^5 Zellen/ml ausgesät.

2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Zellzahlbestimmung wurden 10µl der Zellsuspension aus den Zellkulturflaschen entnommen und im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau-Lösung zur Anfärbung nicht vitaler Zellern verdünnt und in das zuvor mit einem Deckglas abgedeckte Zählfeld einer Neubauer-Zählkammer eingebracht. Die vier Zählfelder wurden unter dem Mikroskop ausgezählt und die Zellzahl/ml in den Kulturflaschen nach der Formel

$$Zellzahl/ml = ausgezählte\ Zellen / 4 \times 10^4$$

errechnet.

2.2.2 Transiente Transfektionen

Um die regulatorische Wirkung bestimmter Transkriptionsfaktoren oder des Transfusionsproteins AML1-ETO auf den c-Jun Promotor zu untersuchen, wurden c-Jun Promotor-Reporterkonstrukte entweder in Zelllinien eingeschleust, die mit einem induzierbaren AML1-ETO-Expressionsvektor bereits stabil transfiziert waren oder es erfolgte die Kotransfektion dieser Reporterkonstrukte zusammen mit Expressionsvektoren in eine naive U937 Zelllinie. Durch die Transfektion kommt es zur vorübergehenden Expression der eingeschleusten Transkriptionsfaktorgene und ihre regulatorische Wirkung auf die eingebrachten Reporterkonstrukte kann mit Hilfe des Dual-Luciferase® Reporter Assays quantifiziert werden.

2.2.2.1 DNA-Präparation

Zur Herstellung der benötigten DNA wurden mit oben genannten Konstrukten transformierte Escherichia coli DH5α Bakterien über Nacht in LB Medium bei 37°C kultiviert und am folgenden Tag mit 6000g für 15 Minuten zentrifugiert. Die DNA-Präparation erfolgte anschließend mittels Maxi-Prep Kit™ nach Herstelleranweisung.

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

2.2.2.2 Elektroporation

24h vor der Elektroporation wurden die Zellen auf eine Konzentration von 3 x 10^5 Zellen/ml eingesetzt. Pro Ansatz wurden 1 x 10^7 Zellen verwendet. Die Zellen wurden bei 1000rpm für 10min zentrifugiert und anschließend in 30ml RPMI ohne Zusätze resuspendiert. Nach nochmaliger 10-minütiger Zentrifugation bei 1000rpm wurden die Zellen in 400µl RPMI ohne Zusätze resuspendiert und mit 20µl DNA in Elektroporationsküvetten gegeben. Nach 10min auf Eis wurden die Zellen bei 300V und 950F elektroporiert und anschießend nochmals 10min auf Eis stehen gelassen. Danach wurden die elektroporierten Zellen in 10ml RPMI mit 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Glutamin resuspendiert und für 24h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

2.2.2.3 Effectene®

24h vor der Transfektion mit Effectene® wurden die Zellen auf eine Konzentration von 3 x 10^5 Zellen/ml eingesetzt. 1 x 10^6 Zellen wurden in 1,6ml

RPMI mit 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Glutamin in 6-well plates eingesetzt. 10µg DNA wurden in 90µl EC Buffer verdünnt und mit 8µl Enhancer und nach 5 min mit 15µl Effectene® gemischt. Nach weiteren 10min wurden 600µl RPMI mit 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Glutamin zugegeben und das Gemisch zu den Zellen pipettiert. Anschließend wurden die Zellen für 24h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

2.2.2.4 Dual-Luciferase® Reporter Assay

Das Reportergen der verschiedenen pGL3- und pGL2-Plasmidkonstrukte exprimiert das Enzym Firefly Luciferase, das Reportergen des jeweils kotransfizierten pRL-null Referenzplasmidkonstrukts exprimiert das Enzym Renilla Luciferase und dient als interne Kontrolle. Auf der Grundlage der von Firefly und Renilla Luciferase katalysierten Biolumineszenz-Reaktionen erfolgte die Messung ihrer Aktivitäten mittels des Dual-Luciferase® Reporter Assay Systems. Dieses erlaubt eine integrierte Quantifizierung beider Reporter, die sequentiell in einer einzigen Probe gemessen werden können. Dies ist möglich, da die Firefly und die Renilla Luciferase entsprechend ihres verschiedenen evolutionären Ursprungs verschiedene Enzymstrukturen und Substraterfordernisse haben.

Die Firefly Luciferase benötigt für seine enzymatische Aktivität keine post-translationale Prozessierung und funktioniert deshalb unmittelbar nach der Translation als genetischer Reporter. Sie katalysiert unter Mitwirkung von ATP, O_2 und Mg^{2+} die Oxidation des Substrats Beetle Luciferin zu Oxyluciferin, wobei es zur Photonenemission kommt.

Die Renilla Luciferase katalysiert unter Sauerstoffverbrauch die Umwandlung des Substrats Coelenterat-Luciferin (=Coelenterazin) in Coelenteramid.

Die Assays zur Bestimmung der Aktivität der Firefly und der Renilla Luciferase sind hoch sensitiv und weisen einen breiten linearen Messbereich auf.

Nach Transfektion und Inkubation der Zellen wurden diese zunächst durch Zentrifugation pelletiert und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 100µl verdünnter „passive lysis buffer“ hinzugefügt, die Suspension für 30 Minuten geschüttelt und dabei lysiert.

Zunächst wurde der Firefly Luciferase Assay gestartet, indem in einem silikonisierten Polypropylen-Messröhrchen 100µl Luciferase Assay Reagent II (LAR II) zu 20µl des zu messenden Zelllysats hinzupipettiert wurden. Unmittelbar nach Quantifizierung der Firefly Luciferase Aktivität in einem Bioluminometer wurde zum Ansatz im gleichen Messröhrchen 100µl Stop&Glo Reagent hinzugefügt. Dadurch wird das Biolumineszenz-Signal aus der Firefly Luciferase Reaktion „gestoppt“ und simultan durch das im Stop&Glo Reagent enthaltene Renilla Luciferase Substrat die Renilla Luciferase Biolumineszenz in Gang gesetzt.

Der Quotient aus der gemessenen Firefly- und Renilla-Luciferase-Aktivität wurde vom Luminometer automatisch gemessen.

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

2.2.3 Western Blot

2.2.3.1 Gewinnung der Zell-Lysate

1 x 10^7 Zellen wurden 10min bei 1000rpm zentrifugiert und mit 25ml PBS gewaschen. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen in 1ml PBS resuspendiert, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und für 30s bei 13.000rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden anschließend in 50µl RIPA-Puffer lysiert und 30min auf Eis inkubiert. Nach weiteren 30min bei 4°C wurden die Zell-Lysate nochmals 30s bei 13.000rpm zentrifugiert, der Überstand in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bei –80°C aufbewahrt.

2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zunächst wurden je 20µl von sechs Standardproben mit Proteinkonzentrationen von 0,125µg/µl, 0,25µg/µl, 0,5µg/µl, 1µg/µl, 2µg/µl und 4µg/µl in Einweg-Photometer-Küvetten pipettiert und eine Küvette mit 20µl destilliertem Wasser als Leerwert vorbereitet. Die Proben wurden 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt und 20µl der verdünnten Lösung ebenfalls in Einweg-Photometer-Küvetten pipettiert. Das Biorad Dye reagent wurde 1:4 mit destilliertem Wasser verdünnt. Von dieser Lösung wurden je 1ml zu den Standardproben, dem Leerwert und den Proben gegeben und diese gemischt. Anschließend wurden die Küvetten 15min geschüttelt und dann bei 595nm in einem Photometer gemessen. Anhand einer durch die Standardproben ermittelten Eichkurve konnte die Proteinkonzentration der Proben ermittelt werden.

2.2.3.3 In vitro Translation

AML1-ETO und c-Jun wurden unter Verwendung des TnT® Reticulocyte Lysate System mit einer SP6 Polymerase in vitro translatiert. Für einen Reaktionsansatz mit 50µl wurden folgende Zusätze verwendet:

TnT® rabbit reticulocyte lysate	25µl
TnT® reaction buffer	2µl
SP6 Polymerase	1µl
Aminosäuren ohne Methionin	1µl
Aminosäuren ohne Leucin	1µl
Ribonuclease-Inhibitor (Rnasin)	1µl
DNA	1µg in variablem Volumen
dH_20	ad 50µl

Die Reagenzien wurden gemischt und für 90min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die in vitro translatierten Proteine bei –80°C aufbewahrt.

2.2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine können in einem Acrylamidgel durch Elektrophorese nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt werden. In vertikale Gelapparaturen wurde zunächst das 10%ige Running Gel gegossen, wobei die Polimerisation nach Zugabe von 5µl TEMED erfolgte. Um eine glatte Oberfläche zu erreichen, wurde das Running Gel bis zur Polimerisation mit Isopropanol überschichtet. Anschließend wurde oberhalb das Stacking Gel gegossen und mit Hilfe eines Kamms Freiräume zum späteren Laden der Proben geschaffen.

Nach Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben wurden jeweils 100µg Protein in 2x loading dye verdünnt und bei 95°C für 5min denaturiert und

anschließend in die Kammern des Stacking Gels geladen. Die Elektrophorese erfolgte mit einer Spannung von 125 Volt. In jedem Gel wurden zur Zuordnung des Molekulargewichts 10µl eines vorgefärbten Proteinstandards (Protein Rainbow ladder) geladen.

2.2.3.5 Western Blot

Um die in der SDS-Gel-Elektrophorese aufgetrennten Proteine mit spezifischen Antikörpern nachzuweisen und ihre Konzentration in semiquantitativer Weise bestimmen zu können, werden die aufgetrennten Proteine mit Hilfe des Elektro-Blottings auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen.

Die Membran wurde genau auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten, kurz in Methanol eingetaucht, in destilliertem Wasser gewaschen und anschließend für 15min im Transfer-Puffer belassen.
Anschließend wurde die Transfer-Kassette mit dem „Blotting-Sandwich“, bestehend aus Schwamm, Filterpapier, Gel, Nitrozellulosemembran, Filterpapier und Schwamm bestückt und in den komplett mit Transfer Puffer gefüllten Blotting Tank eingebracht. Verwendet wurde die Blotting-Apparatur der Firma Bio-Rad. Im Kühlraum bei 4°C wurden die Proteine bei einer Spannung von 100V für 90min auf die Nitrozellulose-Membran transferiert.

Anschließend wurde die Membran für 2h in Blocking Puffer geschwenkt, um unspezifische Antikörper-Bindungen zu verhindern. Nach dreimaligem Waschen in TBST wurde die Membran anschließend über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 in TBST mit 2,5% Magermilchpulver inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBST für jeweils 5min erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden sekundären Antikörper, der an den Fc-Teil des ersten Antikörpers bindet, für 1h in TBST mit 2,5% Magermilchpulver bei Raumtemperatur.

An die sekundären Antikörper ist eine Peroxidase gekoppelt, wodurch die Abbildung durch Chemolumineszenz möglich ist. Dafür wurden beide ECL Lösungen nach Herstelleranweisung im Verhältnis 1:1 (2 + 2ml für eine 10 x 10cm große Membran) gemischt und auf die feuchte Membran aufgebracht. Nach einer Minute Inkubation erfolgte die Exposition auf ECL-Hyperfilm. Nach 60s konnte dann der erste Film entwickelt werden. Die Bandendarstellung wurde durch entsprechend längere oder kürzere Expositionszeiten optimiert.

2.2.3.6 Stripping-Verfahren

Um auf einer Membran nacheinander mehrere Proteine nachweisen zu können, müssen die Antikörper wieder entfernt werden.
Mit Hilfe des Stripping-Verfahrens können die Antikörper gelöst und die Membran bis zu drei Mal mit anderen Antikörpern inkubiert werden. Dafür wurde die Membran 30min bei 55°C unter Drehbewegungen im Stripping-Puffer inkubiert.
Nach Waschen in TBST und erneutem Blocken für 2h konnte die Membran anschließend mit dem primären Antikörper, wie oben beschrieben, inkubiert werden.
Auf jeder Membran wurden so zunächst c-Jun oder AML1-ETO und nach dem Stripping-Verfahren jeweils β-Tubulin, das als interne Kontrolle für eine gleichmäßige Protein-Ladung diente, detektiert.

2.2.3.7 Densitometrsiche Messung

Zur quantitativen Auswertung der Banden im Western Blot wurde die Software ImageJ Version 1.40g[XI] verwendet.

[XI] Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, http://rsb.info.nih.gov/ij/, 1997-2007. Entnommen am 11.05.2008

2.2.4 Realtime PCR

2.2.4.1 RNA-Extraktion

Für die RNA-Extraktion wurde der RNeasy® Kit der Firma Qiagen verwendet.
Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurden 3 x 10^6 Zellen aus den Zellkulturflaschen entnommen und zweimal in PBS gewaschen und in 1ml PBS in Eppendorf-Röhrchen überführt. Um die Zellen zu lysieren wurden sie 5min bei 300g zentrifugiert und das Pellet in 350µl Puffer RLT gelöst. Die Suspension wurde direkt auf die QIAshredder-Säule gegeben und bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Nach Hinzufügen von 70%igem Ethanol wurde die Probe auf der RNeasy®-mini Spin-Säule aufgebracht, in der die RNA an der Membran anhaftet. Kontaminationen wurden durch Waschen bei 10.000rpm für 15s mit 700µl Puffer RW1 und 500µl Puffer RPE entfernt. Um das gesamte Ethanol sicher zu entfernen, wurde die Säule anschließend nochmals mit 500µl RPE Puffer für 2min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert.
Abschließend wurde die Säule auf ein Eppendorf-Röhrchen aufgesetzt und die RNA mit 40µl RNAse-freiem Wasser bei 10.000rpm für 1min ausgewaschen. Nach photometrischer Bestimmung der RNA-Konzentration wurden die Röhrchen bei -80°C aufbewahrt.

2.2.4.2 cDNA-Synthese

Als Vorbereitung für die Realtime PCR wurde die aus den Proben gesammelte RNA mit Hilfe einer retroviralen reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Verwendet wurde dafür das Omniscript® RT cDNA Synthese Kit mit folgendem Reaktionsansatz:

5mM dNTPs	2µl
10x RT Puffer	2µl
10µM Oligo-dT	2µl

RNase-Inhibitor (10U/µl)	1µl
Omniscript® RT	1µl
RNA 1µg	variabel
RNase freies dH2O	ad 20µl

Die cDNA-Synthese-Mischung wurde für 90min bei 37°C inkubiert und die cDNA dann bei –20°C aufbewahrt.

2.2.4.3 Realtime-Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Realtime-Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung des LightCycler™-Systems (Roche Diagnostics) bietet im Unterschied zur herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zwei wesentliche Vorteile:

Zum einen besteht die Möglichkeit, die synthetisierten PCR-Produkte in Echtzeit, d.h. nach jedem PCR-Zyklus, zu messen. Dafür ist der Einbau eines fluoreszierenden Farbstoffes in die synthetisierte doppelsträngige DNA nötig. SYBR Green I bindet zuverlässig an doppelsträngige DNA und emittiert bei 522nm grünes Licht und bietet so optimale Voraussetzungen.

Zum anderen besteht die Möglichkeit der Quantifizierung der Ausgangskonzentration der Zielsequenz. Da das PCR-Produkt bei jedem Zyklus logarithmisch vermehrt wird, kann die Ausgangskonzentration des Produkts errechnet werden.

Die nach reverser Transkription zu cDNA umgeschriebene mRNA des Transkriptionsfaktors c-Jun in der myeloischen Zelllinie U937, die mit einem Tetracyclin induzierbarem Expressionsvektor für AML1-ETO stabil transfiziert worden war, wurde mit der Realtime-PCR quantifiziert. Bei jeder Probe wurde außer der Expression von c-Jun die Konzentration des „Housekeeping-Gens“ G6PD bestimmt, um Schwankungen der Effektivität der cDNA-Synthese

auszugleichen. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 10000fg/µl, 1000fg/µl und 100fg/µl des G6PD-Expressionsplasmids.
So war es möglich, die Konzentrationen des „Housekeeping Gens“ in Bezug zu einer Standardkurve zu setzen und das Zielgen zu quantifizieren, indem es in Relation zum „Housekeeping Gen“ (Zielgen/G6PD) gesetzt wurde.

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

Mastermix	2µl
cDNA	2µl
MgCl	2,4µl
Sense Primer	0,5µl
Antisense Primer	0,5µl
dH2O	12,6µl

Programm:
Zur Durchführung der Realtime-PCR wurde folgendes Programm zur Amplifikation verwendet:

Denaturierung: 95°C für 10min
Aktivierung der Polymerase: 95°C für 0s
Anheften der Primer: 64°C für 10s
Extension: 72°C für 25s
Es wurden jeweils 35 Zyklen durchgeführt.

Die Fluorenszenz von SYBR Green I wurde nach jedem Zyklus bei 530nm gemessen.

Schmelzkurve:
Nach dem letzten PCR-Zyklus wurde zur Beurteilung der Spezifität des PCR-Vorgangs eine Schmelzkurven-Analyse durchgeführt. Dabei wird die Temperatur langsam erhöht, wobei es bei einer für das PCR-Produkt spezifischen Temperatur zur Auftrennung des Doppelstrangs in zwei Einzelstränge kommt. Dabei wird SYBR Green I frei und eine Abnahme der Fluoreszenz kann detektiert werden.
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. Die Größe der Reaktionsprodukte entsprach der errechneten Größe (c-Jun 409bp, G6PD 343bp).

Zur Darstellung der Ergebnisse wurde der c-Jun-Expression zum Zeitpunkt null der Wert 1 zugewiesen und die durch AML1-ETO-Expression induzierte Aktivität als x-facher Wert dieser Basisaktivität dargestellt. Die Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt und entsprechend als Mittelwert und Standard-Abweichung angegeben.

2.2.5 MTT Proliferationsassay

Auswirkungen einer Überexpression von AML1-ETO auf das Proliferationsverhalten von U937-Zellen wurden mit dem MTT-Proliferationsassay untersucht.

Diese 1983 beschriebene Methode[51] beruht auf der Funktion mitochondrialer Dehydrogenasen lebender Zellen, die Tetrazoliumbromid MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) zu Formazan reduzieren; die Reaktion ist in Abbildung 2-2 dargestellt. Formazan bildet einen dunkelblauen

Niederschlag. Nach Lyse der Zellen kann durch Messung der Extinktion bei 590nm in einem Photometer die Zahl vitaler Zellen bestimmt werden.

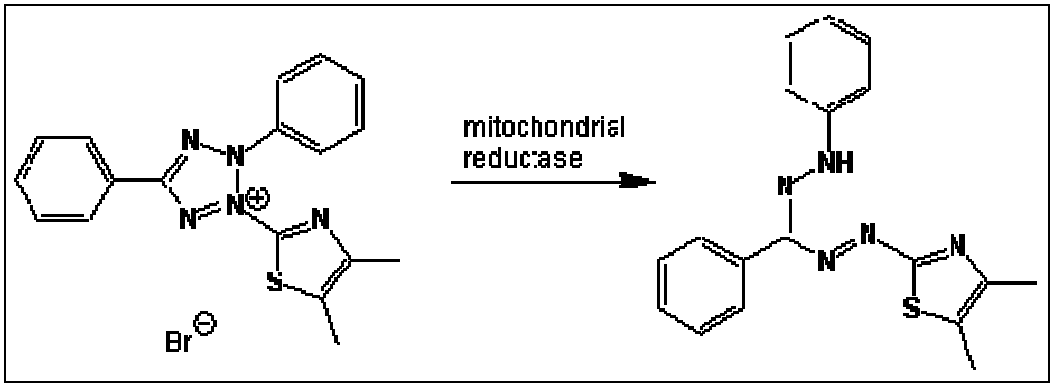


Abbildung 2-2:
Reduktion von MTT zu Formazan

Verwendet wurde der ATCC-MTT-Cell Proliferation Assay entsprechend den Herstellerangaben.

Zn^{2+}-induzierbare U937-Zellen wurden in einer Dichte von $1x10^3$ Zellen in 100µl in 96-well-Platten eingesetzt und für 96h inkubiert. Dabei wurde die Expression von AML1-ETO durch die Zugabe von Zink zum Kulturmedium bewirkt. Zum Ausschluss von toxischen Zink-Effekten dienten U937 Zellen als Kontrolle.

Nach Ende der Inkubation wurde zu den Zellen jeweils 20µl MTT Reagent hinzugefügt und die Zellen für weitere 2h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 100µl Detergent Reagent lysiert und die Extinktion bei 570nm in einem Beckmann Photometer gemessen.

3 ERGEBNISSE

3.1 AML1-ETO erhöht die Aktivität des vollständigen humanen c-Jun Promotors

Ausgehend von den Daten von *Frank et al.*[20], die in NIH3T3 Zellen – einer Fibroblasten-Zelllinie – erhöhte Spiegel von phosphoryliertem c-Jun (ser63) unter AML1-ETO-Expression gefunden hatten, wurde zunächst die Frage untersucht, ob das Fusionsprotein AML1-ETO einen regulatorischen Einfluss auf den c-Jun Promotor in der Lymphom-Zelllinie U937 besitzt.

Dazu wurden U937 Zellen wie in 2.2.2.2 beschrieben transient durch Elektroporation (350V, 950F) transfiziert. Dabei wurden zum einen 1,0µg des vollständigen humanen c-Jun Promotors im Reportervektor pGL3, zum anderen 10,0µg AML1-ETO im Expressionsvektor pCMV5 in die Zellen eingebracht. In jedem Ansatz wurden als interne Kontrolle 5,0µg pRL-null transfiziert und die DNA-Menge in jedem Ansatz auf insgesamt 20,0µg DNA durch Zugabe des „leeren“ Expressionsvektors pCMV5 angeglichen. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 24h inkubiert und anschließend zentrifugiert und lysiert. Im Dual-Luciferase® Reporter Assay wurde die Firefly Luciferase als Reporter- und die Renilla Luciferase als Kontroll-System benutzt, wie unter 2.2.2.4 beschrieben. Dazu wurden die Biolumineszenz-Signale der Firefly und der Renilla Luciferase gemessen und der Quotient gebildet. Zur besseren Darstellung wurde die basale Promotoraktivität des c-Jun Promotors und des „leeren“ Reporterkonstrukts pGL3 jeweils auf 1 gesetzt und die Aktivierung durch AML1-ETO in x-facher Promotoraktivität angegeben.

Die Versuche wurden dreimal wiederholt und die Ergebnisse in den Abbildungen als Mittelwerte plus Standard-Abweichungen angegeben. Das gleiche gilt auch für alle folgenden Transfektionsexperimente.

In Abbildung 3-1 ist die Promotor-Aktivität des vollständigen humanen c-Jun Promotors ohne (schwarze Balken) und mit (graue Balken) AML1-ETO-Expression dargestellt.

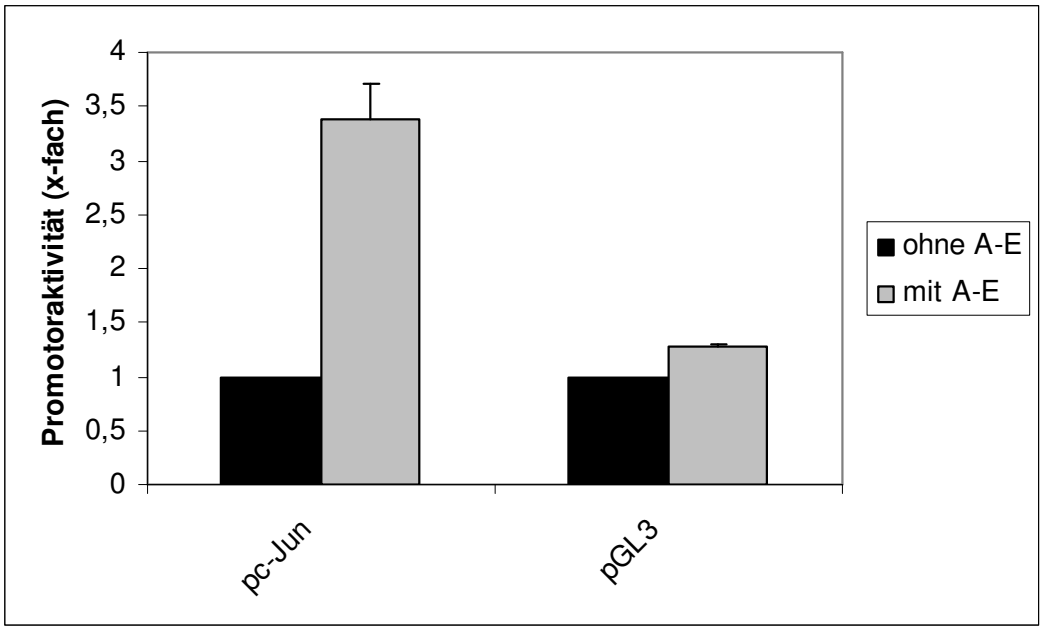


Abbildung 3-1:

Transiente Transfektion mittels Elektroporation (300V, 950F) des vollständigen humanen c-Jun Promotors (pc-Jun) in U937 Zellen. Der Promotor ist in den Luciferase Reportervektor pGL3 integriert. Der „leere" Reportervektor pGL3 wurde als Kontrolle verwendet. Es wurden jeweils 1,0µg des Reporterkonstrukts, 10,0µg AML1-ETO im Expressionsvektor pCMV5 und 5,0µg pRL-null als interne Kontrolle transfiziert. Jeder Ansatz wurde durch Zugabe des „leeren" Expressionsvektors pCMV5 auf insgesamt 20,0µg DNA angeglichen. Die Zellen wurden nach der Transfektion für 24h inkubiert und anschließend zentrifugiert und lysiert. Die Promotor-Aktivität wurde mittels des Dual-Luciferase® Reporter Assays bestimmt. Es wurde der Quotient Firefly/Renilla Luciferase errechnet und die basale Promotoraktivität jedes Konstrukts ohne AML1-ETO (ohne A-E) auf 1 gesetzt (schwarze Balken). Die Werte mit AML1-ETO (mit A-E) wurden als x-fache Promotoraktivität im Vergleich zu den Promotorkonstrukten allein angegeben (graue Balken).

Es zeigt sich eine nahezu 3,4-fache Transaktivierung des vollständigen humanen c-Jun Promotors durch AML1-ETO. Die Kotransfektion von AML1-ETO hat

dabei auf den „leeren“ Reportervektor pGL3, der als Kontrolle dient, nahezu keinen Effekt.

Ausgehend von den Ergebnissen von *Frank et al.*[20], die in Fibroblasten-Zellen erhöhte Werte von phosphoryliertem c-Jun unter AML1-ETO-Expression gemessen hatten, konnte gezeigt werden, dass AML1-ETO in U937 Zellen die Aktivität des c-Jun Promotors steigert.

3.2 Die Aktivierung des c-Jun Promotors durch AML1-ETO ist dosisabhängig

Nachdem im ersten Versuch gezeigt werden konnte, dass das Fusionsprotein AML1-ETO zu einer positiven Transaktivierung des humanen c-Jun Promotors führt, wurde untersucht, ob dieser Effekt von der Menge des kotransfizierten AML1-ETO Expressionsvektors abhängig ist.

Der Versuch wurde analog zum oben bereits beschriebenen Vorgehen mittels Elektroporation (300V, 950F) wie in 2.2.2.2 beschrieben in U937 Zellen durchgeführt. Es wurden jeweils 1,0µg des Reporterkonstrukts und 5,0µg pRL-null verwendet. Um die Gesamt-DNA-Menge auf 20,0µg anzugleichen, wurden erneut unterschiedliche Mengen des „leeren“ Expressionsvektors pCMV5 zu jedem Ansatz zugegeben. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 24h inkubiert und danach mittels Dual-Luciferase® Reporter Assays wie in 2.2.2.4 beschrieben die Biolumineszenz gemessen. Die Aktivität des c-Jun Promotors und des „leeren“ Reportervektors pGL3 ohne Kotransfektion von AML1-ETO wurden jeweils auf 1 gesetzt und die Transaktivierung in x-facher Promotoraktivität angegeben.

In Abbildung 3-2 ist gezeigt, dass die Transaktivierung des c-Jun Promotors mit steigender Menge des transfizierten AML1-ETO Expressionsvektors zunimmt (schwarze Balken). Die Aktivität des „leeren“ Reportervektors pGL3 (graue Balken) fällt mit steigender AML1-ETO-Konzentration zunehmend ab, was eventuell mit einer zunehmenden Toxizität bzw. einer Aktivierung der Apoptose von AML1-ETO in steigenden Konzentrationen zusammenhängen könnte. Durch diesen Effekt auf den „leeren“ Vektor wird die mit zunehmender AML1-ETO-Konzentration zunehmende Transaktivierung des c-Jun Promotors wie in Abbildung 3-2 dargestellt noch unterschätzt und der konzentrationsabhängige Anstieg der Promotoraktivität fällt noch deutlicher aus.

Die Transkativierung des humanen c-Jun Promotors durch AML1-ETO in U937 Zellen ist somit dosisabhängig. Bei hohen Dosen von AML1-ETO kann ein toxischer Effekt beobachtet werden.

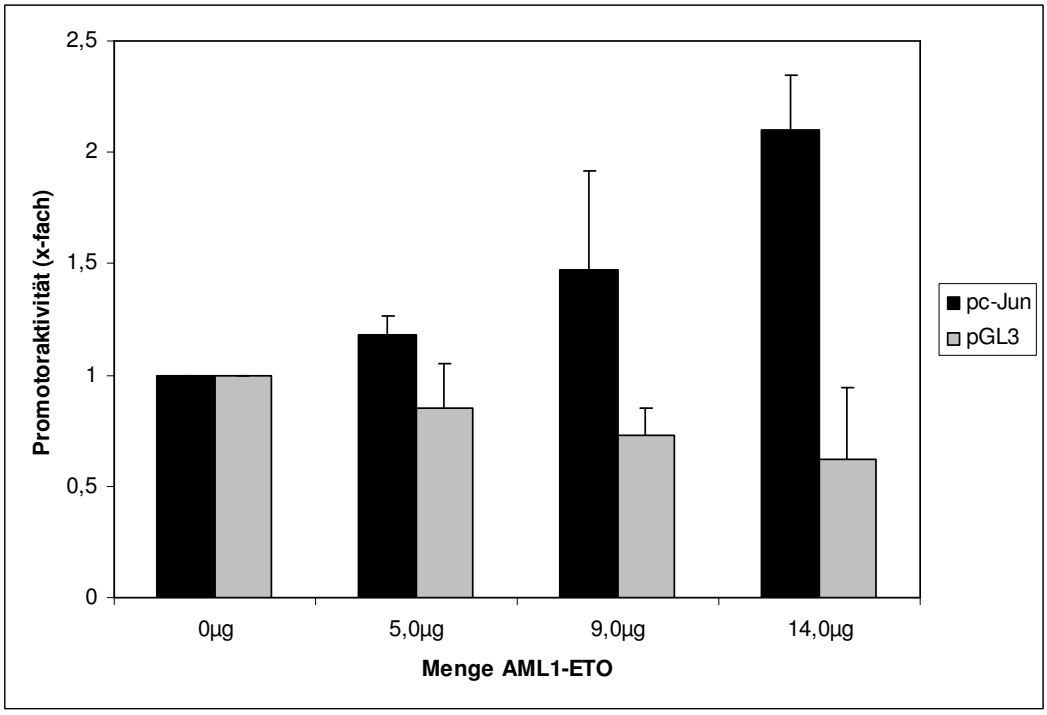


Abbildung 3-2:

Transiente Transfektion des humanen c-Jun Promotors (pc-Jun) im Reporterkonstrukt pGL3 zusammen mit AML1-ETO im Expressionsvektor pCMV5 in steigender Menge (0; 5,0; 9,0 und 14,0µg) mittels Elektroporation (300V, 950F) in U937 Zellen. Die Zellen wurden nach der Transfektion für 24h inkubiert und die Promotor-Aktivität mittels des Dual-Luciferase® Reporter Assays wie in 2.2.2.4 beschrieben bestimmt. Die Aktivität des c-Jun Promotors (schwarze Balken) und des „leeren" Reportervektors pGL3 (graue Balken) ohne Kotransfektion von AML1-ETO wurden jeweils auf 1 gesetzt und die Transaktivierung in x-facher Promotoraktivität angegeben.

3.3 AML1 und CBFβ führen nicht zu einer Transaktivierung des c-Jun Promotors

Wie in den letzten zwei Abbildungen gezeigt wurde, erhöht AML1-ETO die Transaktivierung des vollständigen humanen c-Jun Promotors. Dabei besteht eine positive Korrelation zur transfizierten Menge von AML1-ETO. Da AML1-ETO ein Fusionsprotein ist, das den größten Teil des in der Hämatopoese zentralen Transkriptionsfaktors AML1 enthält, stellt sich die Frage, ob diese Erhöhung der Transaktivierung eine Eigenschaft des Fusionsproteins AML1-ETO ist, oder ob der c-Jun Promotor auch durch den Core Binding Factor mit seinen synergistisch wirkenden Untereinheiten AML1 und CBFβ transaktiviert werden kann.

Zur Klärung dieser Frage wurde der vollständige humane c-Jun Promotor bzw. als Kontrolle der M-CSF-Rezeptor Promotor zusammen mit AML1 und CBFβ transient in U937 Zellen transfiziert. *Rhoades et al.*[66] haben 1996 gezeigt, dass der M-CSF-Rezeptor Promotor durch AML1 und CBFβ stark transaktiviert wird, weshalb dieser Promotor als Kontrolle eingesetzt wurde.

Im Gegensatz zu den Experimenten 3-1 und 3-2 wurde die transiente Transfektion nicht mittels Elektroporation, sondern wie in 2.2.2.3 beschrieben mit Effectene® durchgeführt. Die Vorteile dieses Systems sind die deutlich geringere Menge DNA, die für die Transfektion benötigt wird, und die höhere Transfektionseffektivität. Es wurden 0,35µg des humanen c-Jun Promotors im Reportervektor pGL3 bzw. 0,35µg des M-CSF-Rezeptor Promotors im Reportervektor pXP2 mit 0,3µg AML1 und 0,3µg CBFβ transfiziert. In jedem Ansatz war als interne Kontrolle 0,05µg pRL-null enthalten. Die Gesamt-DNA-Menge wurde mit dem „leeren“ Expressionsvektor pCMV5 auf 1,0µg angeglichen. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 24h inkubiert und danach mittels Dual-Luciferase® Reporter Assays wie in 2.2.2.4 beschrieben die Biolumineszenz gemessen. Die Aktvität des c-Jun Promotors, des M-CSF-Rezeptor Promotors und des „leeren“ Reportervektors pGL3 ohne Kotransfektion

von AML1 und CBFβ wurden wie in den bisherigen Experimenten zur besseren Darstellung jeweils auf 1 gesetzt und die Aktivierung in x -fach angegeben.

In Abbildung 3-3 wird gezeigt, dass der c-Jun Promotor nicht durch die Kotransfektion von AML1 und CBFβ transaktiviert wird. Um zu zeigen, dass AML1 und CBFβ aktiv sind, dient der M-CSF-Rezeptor Promotor als positive Kontrolle. Die Transaktivierung durch AML1 und CBFβ ist mehr als 5-fach.
Daraus kann geschlossen werden, dass die Fähigkeit, den c-Jun Promotor zu aktivieren, eine neue Eigenschaft des Fusionsproteins AML1-ETO ist.

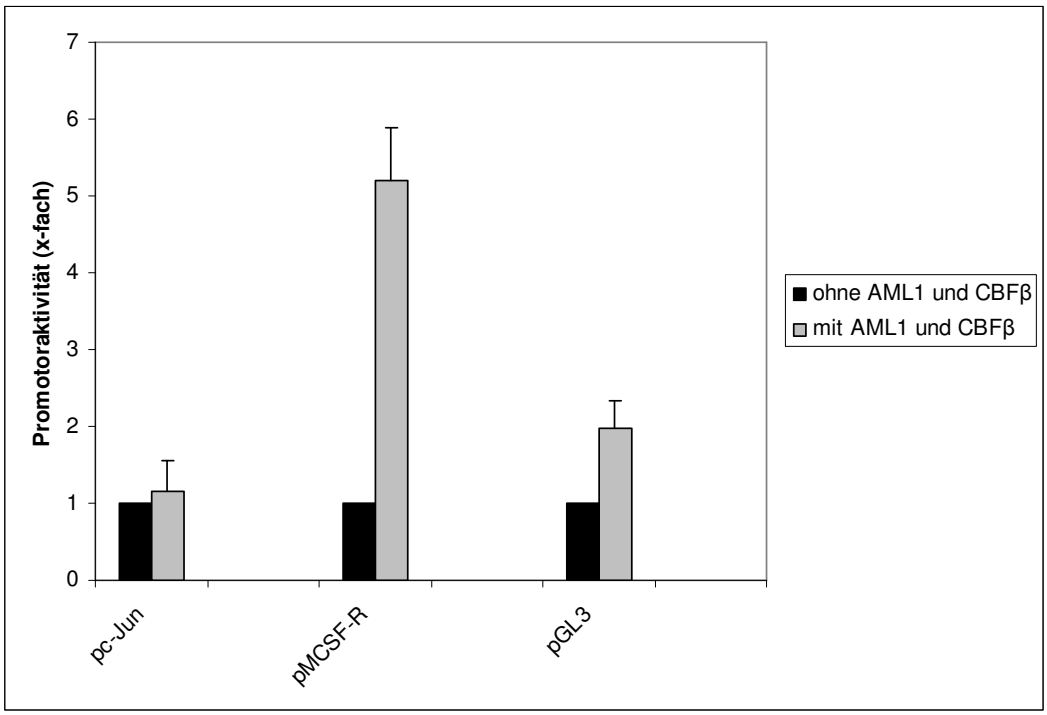


Abbildung 3-3:
Transiente Transfektion des humanen c-Jun Promotors (pc-Jun) bzw. des MCSF-Rezeptor Promotors (pMCSF-R) ohne (schwarze Balken) oder zusammen mit 0,3µg AML1 und 0,3µg CBFβ jeweils im Expressionsvektor pCMV5 (schwarze Balken) in U937 Zellen mittels Effectene® wie in 2.2.2.3 beschrieben. Die Zellen wurden nach der Transfektion für 24h inkubiert und die Promotor-Aktivität mittels des Dual-Luciferase® Reporter Assays wie in 2.2.2.4 beschrieben bestimmt. Die Aktivität des c-Jun Promotors, des M-CSF-Rezeptor Promotors und des „leeren" Reportervektors pGL3 ohne Kotransfektion von AML1 und CBFβ wurden jeweils auf 1 gesetzt und die Aktivierung in x -fach angegeben.

3.4 Für die Transaktivierung des c-Jun Promotors durch AML1-ETO ist die proximale AP-1 Bindungsstelle entscheidend

3.4.1 Verschiedene Deletionskonstrukte des c-Jun Promotors sind transkriptionell aktiv

Zur Klärung der Frage, welcher Abschnitt des c-Jun Promotors für den transaktivierenden Effekt von AML1-ETO verantwortlich ist, wurden Deletionskonstrukte des vollständigen humanen c-Jun Promotors verwendet, die freundlicherweise von Wayne Vedeckis[89] zur Verfügung gestellt worden waren. Bei diesen Konstrukten wurde von distal nach und nach ein immer größerer Anteil des c-Jun Promotors entfernt und die verschiedenen Deletionskonstrukte in den Reportervektor pGL3 kloniert.

Zunächst wurde untersucht, ob die Deletionskonstrukte des c-Jun Promotors in U937 Zellen transkriptionell aktiv sind. Dazu wurden die verschiedenen Deletionskonstrukte mittels Effectene® transient in U937 Zellen transfiziert. Es wurden von den Deletionskonstrukten jeweils 0,9µg und 0,1µg pRL-null verwendet. Die Aktivität nach 24-stündiger Inkubation der Zellen wurde im Dual-Luciferase® Reporter Assay ermittelt. Die Aktivität des vollständigen humanen c-Jun Promotors wurde auf 1 gesetzt und die Aktivität der anderen Konstrukte in x-fach angegeben.

In Abbildung 3-4 wird gezeigt, dass alle Deletionskonstrukte inklusive des kürzesten Konstrukts pc-Jun -63/+731 eine ausreichende Eigenaktivität im Vergleich zum „leeren“ Vektor pGL3 besitzen. Das transkriptionell aktivste Konstrukt ist pc-Jun -716/+731, was darauf hinweist, dass distal von bp-716 aktivitäts-hemmende Stellen liegen.

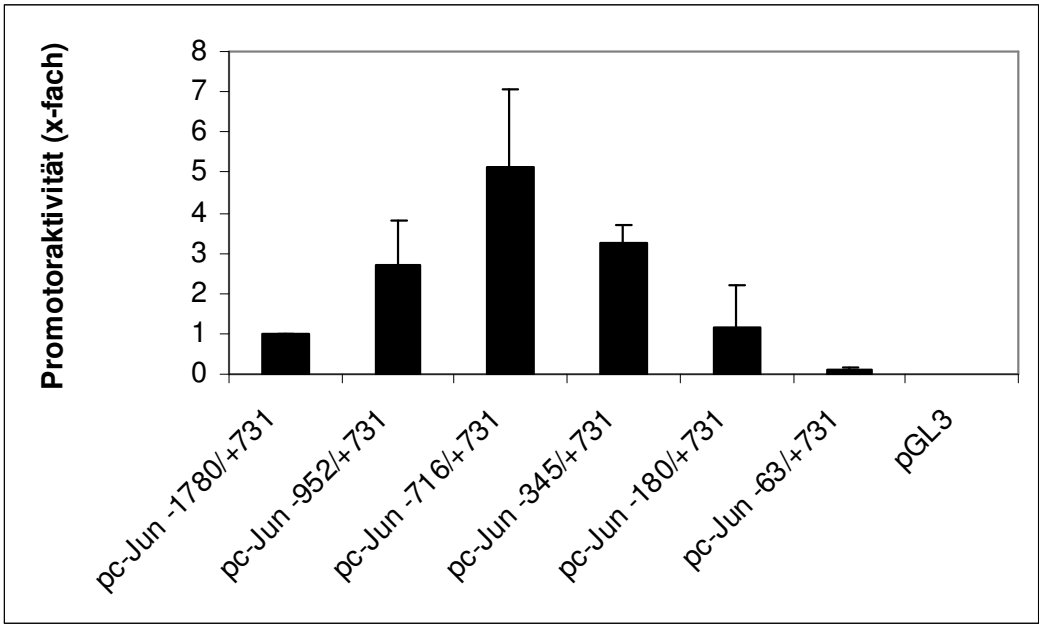


Abbildung 3-4:

Transiente Transfektion mittels Effectene® von verschiedenen c-Jun Promotor Deletionskonstrukten im Reportervektor pGL3 in U937 Zellen ohne Kotransfektion von Expressionsvektoren. Es wurden 0,9µg des jeweiligen Reporterkonstruktes zusammen mit 0,1µg pRL-null transfiziert. Als Kontrolle diente der „leere" Reportervektor pGL3. Die Zellen wurden nach der Transfektion für 24h inkubiert und die Promotor-Aktivität mittels des Dual-Luciferase® Reporter Assays wie in 2.2.2.4 beschrieben bestimmt. Die Aktivität des vollständigen c-Jun Promotors wurde auf 1 gesetzt und die Aktivität der Deletionskonstrukte in x-facher Aktivität angegeben.

3.4.2 AML1-ETO erhöht die transkriptionelle Aktivität verschiedener Deletionskonstrukte des c-Jun Promotors

Die transkriptionelle Aktivierung des c-Jun Promotors durch AML1-ETO wurde bisher nur für den vollständigen humanen c-Jun Promotor gezeigt. Um die Region des c-Jun Promotors identifizieren zu können, die für die Transaktivierung durch AML1-ETO verantwortlich ist, wurde im folgenden Experiment die Wirkung von AML1-ETO auf die unterschiedlichen Deletionskonstrukte des c-Jun Promotors untersucht.

Dazu wurden erneut transiente Transfektionen der c-Jun Promotor Deletionskonstrukte mittels Effectene® in U937 Zellen durchgeführt. Es wurden 0,1µg des jeweiligen c-Jun Promotor Deletionskonstrukts bzw. der „leere“ Reportervektor pGL3 als Kontrolle zusammen mit 0,1µg der internen Kontrolle pRL-null transfiziert. Es wurden 0,5µg AML1-ETO (A-E) im Expressionsvektor pCMV5 kotransfiziert und die Gesamt-DNA-Menge mit dem „leeren“ Expressionsvektor pCMV5 auf 1,0µg gebracht. Die Zellen wurden nach der Transfektion für 24h inkubiert und die Promotor-Aktivität mittels des Dual-Luciferase® Reporter Assays wie in 2.2.2.4 beschrieben bestimmt.

Zur besseren Darstellung wurde die basale Promotoraktivität der einzelnen c-Jun Promotor-Konstrukte und des „leeren“ Reporterkonstrukts pGL3 im Gegensatz zum vorhergehenden Experiment jeweils auf 1 gesetzt und die Aktivierung durch AML1-ETO in x-facher Aktivität angegeben.

Aus Abbildung 3-5 wird deutlich, dass die Transaktivierung der verschiedenen Deletionskonstrukte des c-Jun Promotors durch AML1-ETO (graue Balken) in unterschiedlich starker Ausprägung gefunden werden kann. Interessant ist dabei, dass der vollständige c-Jun Promotor durch AML1-ETO am stärksten transaktiviert wird. Eine Transaktivierung des „leeren“ Reportervektors pGL3 findet nicht statt.

Bei dem -180/+731 Deletionskonstrukt des c-Jun Promotors kann noch eine knapp 3-fache Transaktivierung durch AML1-ETO gefunden werden. Diese geht bei dem -63/+731 Deletionskonstrukt verloren. Die Region, über die die Aktivierung des c-Jun Promotors durch AML1-ETO vermittelt wird, muss demnach im Bereich zwischen bp-180 und bp-63 liegen.

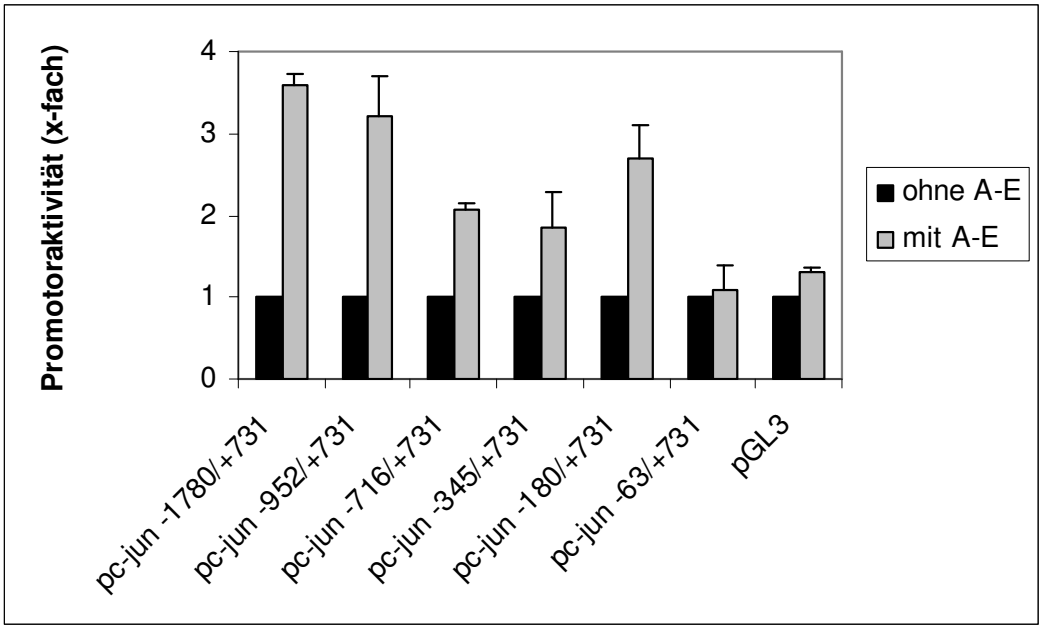


Abbildung 3-5:

Transiente Transfektion der verschiedenen c-Jun Promotor Deletionskonstrukte mittels Effectene® mit (mit A-E) und ohne (ohne A-E) Kotransfektion von AML1-ETO in U937 Zellen. Als Kontrolle diente der „leere" Reportervektor pGL3. Es wurden 0,1µg des jeweiligen Reporterkonstrukts, 0,1µg pRL-null ohne (schwarze Balken) oder mit (graue Balken) Kotransfektion von 0,5µg AML1-ETO im Expressionsvektor pCMV5 verwendet. Die Zellen wurden nach der Transfektion für 24h inkubiert und die Promotor-Aktivität mittels des Dual-Luciferase® Reporter Assays wie in 2.2.2.4 beschrieben bestimmt. Die Aktivität der einzelnen Deletionskonstrukte und des „leeren" Reportervektors pGL3 ohne Kotransfektion von AML1-ETO wurde jeweils auf 1 gesetzt und die Aktivierung in x-fach angegeben.

3.4.3 Wichtige Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen im proximalen c-Jun Promotor

Nachdem durch die vorhergehenden Versuche die für die Transaktivierung durch AML1-ETO verantwortliche Stelle im c-Jun Promotor auf die Region zwischen bp-180 und bp-63 eingegrenzt werden konnte, wurde eine Literatursuche durchgeführt, um wichtige bekannte Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren in diesem Bereich zu identifizieren.

In Abbildung 3-6 ist die proximale Region des c-Jun Promotors im Bereich von bp-200 und bp+1 schematisch dargestellt. Die distale AP-1 Bindungsstelle bei bp-190 bis bp-183 ist im Deletionskonstrukt pc-Jun -180/+731 nicht mehr enthalten und trotzdem findet eine Transaktivierung dieses Konstrukts durch AML1-ETO statt. Die verantwortliche Region muss also weiter proximal liegen. Da bei dem Deletionskonstrukt pc-Jun -63/+731 die Transaktivierung durch AML1-ETO nicht mehr nachweisbar ist, schränkt sich die Region auf den Bereich von bp-183 bis bp-63 ein.

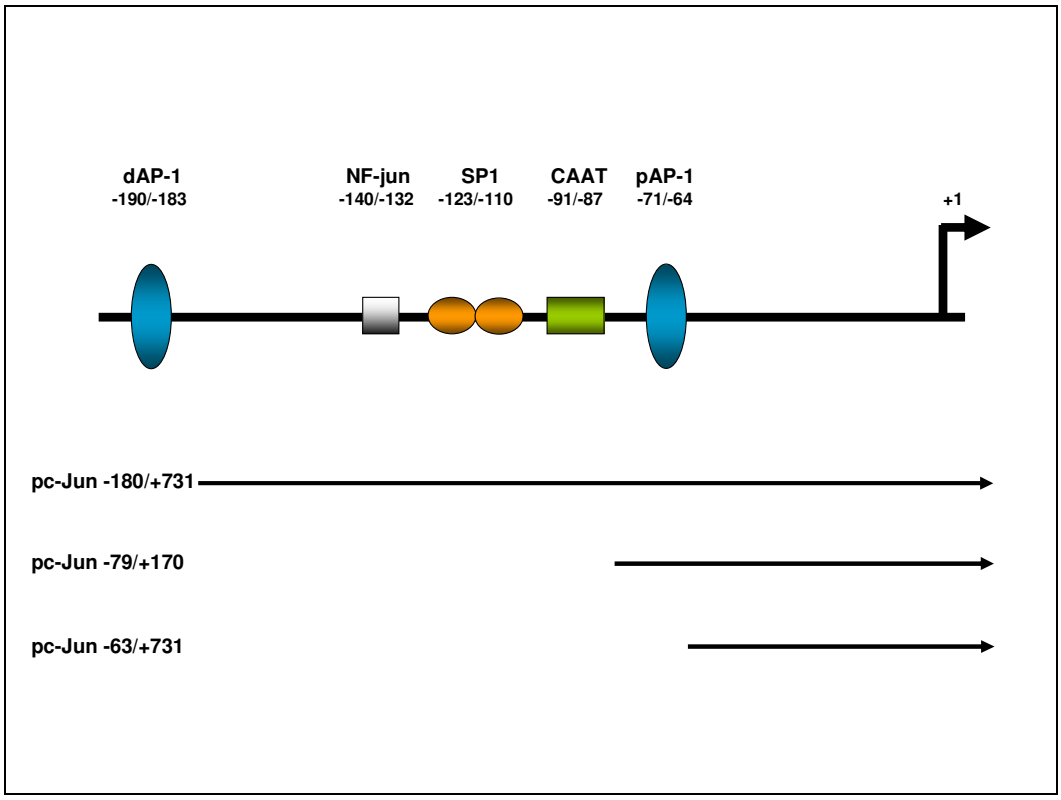


Abbildung 3-6:

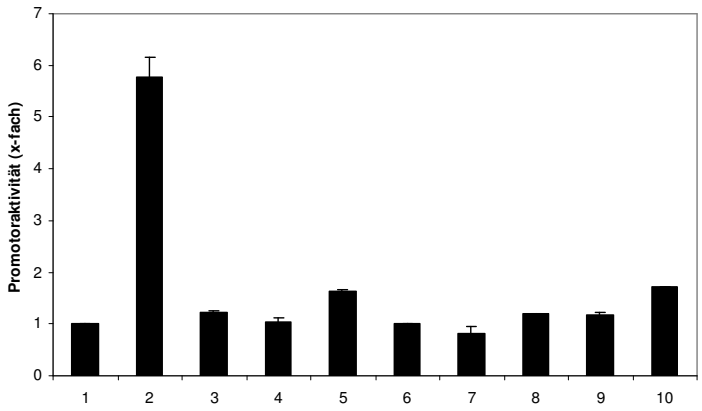
Schematische Darstellung des proximalen c-Jun Promotors mit wichtigen, in der Literatur beschriebenen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Die Längen der verwendeten Deletionskonstrukte sind ebenfalls schematisch dargestellt. Die distale AP-1 Bindungsstelle (dAP-1) ist im Deletionskonstrukt pc-Jun -180/+731 nicht mehr enthalten. Die proximale AP-1 Bindungsstelle (pAP-1) bei bp-71/-64 ist in den Konstrukten pc-Jun -180/+731 und pc-Jun -79/+170 enthalten. Im Konstrukt pc-Jun -63/+731 fehlt sie. Die Bindungsstellen für NF-jun, SP1 und CAAT sind nur im Deletionskonstrukt pc-Jun -180/+731 enthalten und fehlen in den Konstrukten pc-Jun -79/+170 und pc-Jun -63/+731.

In diesem Bereich finden sich fünf potentielle DNA-Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren: Eine NF-jun Bindungsstelle bei bp-140/-132, zwei SP1 Bindungsstellen, die unmittelbar nebeneinander bei bp-123/-110 liegen, eine CAAT Bindungsstelle bei bp-91/-87 und die proximale AP-1 Bindungsstelle bei bp-71/-64. Ebenfalls dargestellt ist das bisher noch nicht verwendete Deletionskonstrukt pc-Jun -79/+170, das nur noch die proximale AP-1 Bindungsstelle enthält[4,68,83].

3.4.4 Die proximale AP-1 Bindungsstelle ist für die Transaktivierung des c-Jun Promotors durch AML1-ETO verantwortlich

Um die Lage der für die Transaktivierung kritischen Stelle noch näher einzugrenzen, wurde ein weiteres Deletionskonstrukt, das nur die Sequenz von bp-79 bis bp+170 und somit als einzige DNA-Bindungsstelle die proximale AP-1 Bindungsstelle enthält, verwendet, das freundlicherweise von Xiao-Fan Wang zur Verfügung gestellt worden war[78,91].

Dieses Promotorkonstrukt wurde wiederum in einer transienten Transfektion mittels Effectene® in U937 Zellen verwendet. Im Gegensatz zu den bisher verwendeten Konstrukten wurde pc-Jun -79/+170 in den Reportervektor pGL2 kloniert, dessen Firefly Luciferase Expression deutlich geringer ist als die von pGL3[28]. Aus diesem Grund wurden deutlich höhere Mengen der Reporterkonstrukte, nämlich jeweils 0,57µg verwendet. Von AML1, CBFβ und AML1-ETO wurden jeweils 0,2µg, von der internen Kontrolle pRL-null nur 0,03µg verwendet. Die Differenz zu 1,0µg DNA/Ansatz wurde wiederum mit dem „leeren“ Expressionsvektor pCMV5 aufgefüllt.
Die Zellen wurden nach der Transfektion für 24h inkubiert und die Promotor-Aktivität mittels des Dual-Luciferase® Reporter Assays wie in 2.2.2.4 beschrieben bestimmt. Die Aktivität des pc-Jun -79/+170-Konstruktes und des „leeren“ Reportervektors pGL2 ohne Kotransfektion wurden jeweils auf 1 gesetzt und die Aktivierung in x-fach angegeben.



	pc-Jun -79/+170					pGL2				
AML1-ETO		+					+			
AML1			+		+			+		+
CBFβ				+	+				+	+

Abbildung 3-7:

Transiente Transfektion mittels Effectene® in U937 Zellen mit dem Deletionskonstrukt -79/+170 des c-Jun Promotors (pc-Jun -79/+170), das in den Reportervektor pGL2 integriert ist. AML1-ETO, AML1 und CBFβ wurden jeweils im Expressionsvektor pCMV5 in unterschiedlichen Kombinationen kotransfiziert. Von den Reporterkonstrukten wurden jeweils 0,57µg transfiziert, von AML1, CBFβ und AML1-ETO jeweils 0,2µg. Von der internen Kontrolle pRL-null wurden 0,03µg verwendet. Als Kontrolle diente der „leere" Reportervektor pGL2 (Säulen 6-10). Die Zellen wurden nach der Transfektion für 24h inkubiert und die Promotor-Aktivität mittels des Dual-Luciferase® Reporter Assays wie in 2.2.2.4 beschrieben bestimmt. Die Aktivität des pc-Jun -79/+170-Konstruktes und des „leeren" Reportervektors pGL2 ohne Kotransfektion wurden jeweils auf 1 gesetzt und die Aktivierung in x-fach angegeben.

In Abbildung 3-7 kommt es zusammen mit AML1-ETO zu einer mehr als 5-fachen Transaktivierung des Promotorkonstrukts pc-Jun -79/+170 (Säule 2). Weder mit AML1 noch mit CBFβ noch mit beiden Transkriptionsfaktoren zusammen zeigt sich hingegen eine gesteigerte Promotoraktivität (Säulen 3-5). Auf den „leeren" Reportervektor pGL2, der als Kontrolle dient, zeigen sich nur geringe Effekte (Säulen 6-10).

Die Region, die für die Transaktivierung des c-Jun Promotors durch AML1-ETO verantwortlich ist, konnte somit auf den Bereich bp-79 bis bp-63 eingegrenzt werden; d.h. auf genau die Region, in der sich die proximale AP-1 Bindungsstelle befindet. Wie schon in 3.3 für den vollständigen c-Jun Promotor gezeigt, konnte in diesem Versuch auch für das kurze Deletionskonstrukt -79/+170 nachgewiesen werden, dass AML1 auch zusammen mit CBFβ keinen transaktivierenden Effekt hat und dieser eine neue Eigenschaft des Fusionsproteins AML1-ETO ist.

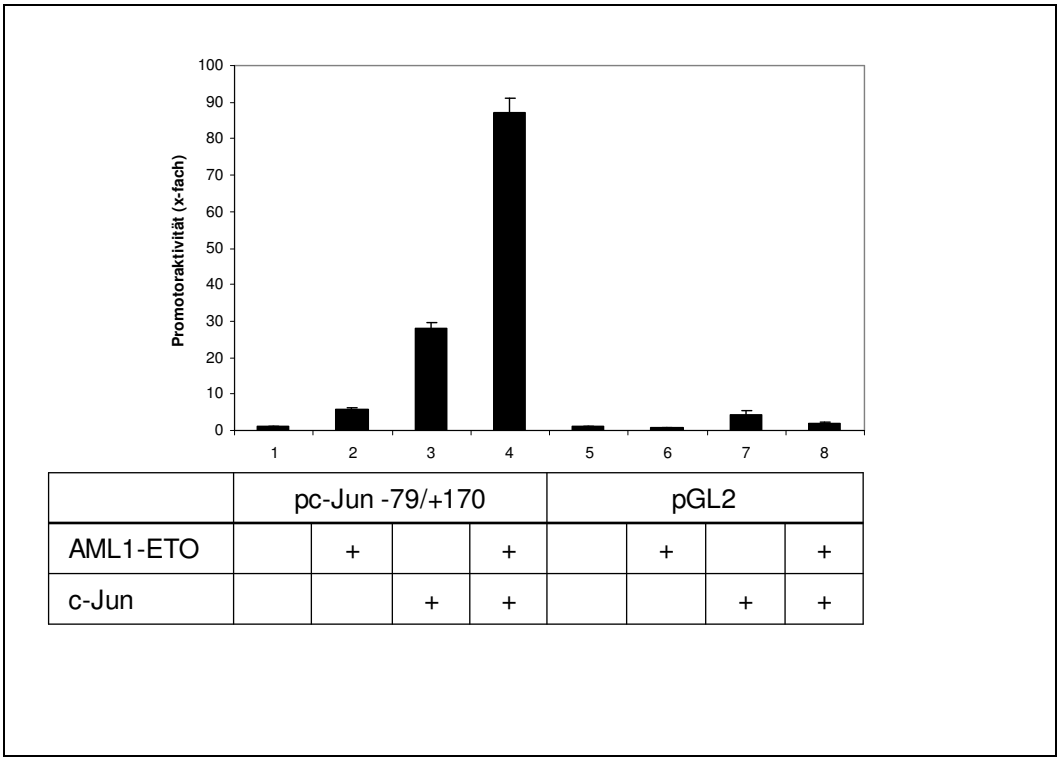
3.5 AML1-ETO und c-Jun kooperieren an der proximalen AP-1 Bindungsstelle des c-Jun Promotors

Es ist bekannt, dass c-Jun an seinen eigenen Promotor bindet, ihn transaktiviert und so in einer positiven Feedback-Schleife seine eigene Expression erhöht. Vermittelt ist diese Funktion vor allem über die proximale AP-1 Bindungsstelle, die in dem Deletionskonstrukt pc-Jun -79/+170 enthalten ist[4].

Um die Effekte von c-Jun und AML1-ETO auf das pc-Jun -79/+170 Konstrukt zu untersuchen, wurden U937 Zellen analog zu Experiment 3.4.4 mit jeweils 0,57µg pc-Jun -79/+170 oder des „leeren" Reportervektors pGL2 mit Hilfe von Effectene® transfiziert. Von AML1-ETO wurde 0,2µg und von c-Jun 0,1µg verwendet. Beide waren im Expressionsvektor pCMV5 enthalten. Von der internen Kontrolle pRL-null wurden 0,03µg verwendet. Die Gesamt-DNA/Ansatz wurde mit dem „leeren" Expressionsvektor pCMV5 auf 1,0µg angeglichen. Die Aktivität nach 24-stündiger Inkubation der Zellen wurde im Dual-Luciferase® Reporter Assay ermittelt. Die Aktvität des pc-Jun -79/+170-Konstruktes und des „leeren" Reportervektors pGL2 ohne Kotransfektion wurden jeweils auf 1 gesetzt und die Aktivierung in x-fach angegeben.

In Abbildung 3-8 wurden die Effekte einer gemeinsamen Transfektion von AML1-ETO und c-Jun auf das -79/+170 Deletionskonstrukt des c-Jun Promotors dargestellt. Wie in den vorangegangenen Versuchen führt AML1-ETO allein (Säule 2) zu einer mehr als 5-fachen Transaktivierung des c-Jun Promotor-Konstrukts. Der Effekt von c-Jun allein (Säule 3) ist mit ca. 30-facher Transaktivierung noch deutlicher ausgeprägt und ist – wie oben beschrieben – aus der Literatur bekannt[4]. Werden AML1-ETO und c-Jun zusammen transfiziert (Säule 4), zeigt sich eine über 80-fache Aktivierung des c-Jun Promotorkonstrukts, das die proximale AP-1 Bindungsstelle enthält. AML1-ETO und c-Jun zusammen führen zusammen somit zu einer sehr deutlichen Transaktivierung des c-Jun Promotors. Dieser kooperative Effekt scheint ebenfalls

über die proximale AP-1 Bindungsstelle vermittelt zu sein. Die Auswirkungen auf den „leeren“ Reportervektor pGL2 (Säulen 5-8) sind nur gering.



	pc-Jun -79/+170				pGL2			
AML1-ETO		+		+		+		+
c-Jun			+	+			+	+

Abbildung 3-8:

Transiente Transfektion des pc-Jun -79/+170 Deletionskonstrukts (Säulen 1-4) im Reportervektor pGL2 mittels Effectene® in U937 Zellen. AML1-ETO und c-Jun wurden getrennt und zusammen im Expressionsvektor pCMV5 kotransfiziert. Von den Reporterkonstrukten wurden jeweils 0,57µg transfiziert. Von AML1-ETO wurden 0,2µg, von c-Jun 0,1µg und von der internen Kontrolle pRL-null 0,03µg verwendet. Als Kontrolle dient der „leere“ Reportervektor pGL2 (Säulen 5-8). Die Zellen wurden nach der Transfektion für 24h inkubiert und die Promotor-Aktivität mittels des Dual-Luciferase® Reporter Assays wie in 2.2.2.4 beschrieben bestimmt. Die Aktivität des pc-Jun -79/+170-Konstruktes und des „leeren“ Reportervektors pGL2 ohne Kotransfektion wurden jeweils auf 1 gesetzt und die Aktivierung in x-fach angegeben.

3.6 AML1-ETO und c-Jun kooperieren am AML1 Promotor, der die Expression von AML1-ETO reguliert

Die Genexpression des Transkriptionsfaktors AML1 wird von zwei Promotor-Regionen reguliert[25]. Diese Regionen bleiben bei der Entstehung des Fusionsgens AML1-ETO intakt und sind somit auch für die Regulation der Expression des Fusionsproteins verantwortlich. Ein Fusionsprotein ETO-AML1 konnte bisher noch nicht identifiziert werden

Im vorhergehenden Versuch konnte gezeigt werden, dass AML1-ETO und c-Jun über die proximale AP-1 Bindungsstelle des c-Jun Promotors kooperieren und zu einer deutlichen Steigerung der transkriptionellen Aktivität führen. Im nächsten Experiment wurden die Effekte von AML1-ETO und c-Jun auf den AML1 Promotor untersucht. Dazu wurden erneut transiente Transfektionen in U937 Zellen mittels Effectene® durchgeführt. Es wurden jeweils 0,57µg des distalen (pAML1dist) und des proximalen (pAML1prox) AML1-Promotor-Konstruktes verwendet. Kotransfiziert wurden jeweils 0,2µg AML1-ETO, AML1 und CBFβ sowie 0,1µg c-Jun im Expressionsvektor pCMV5. Von der internen Kontrolle pRL-null wurden 0,03µg verwendet. Die Gesamt-DNA/Ansatz wurde mit pCMV5 auf 1,0µg angeglichen. Die Aktivität nach 24-stündiger Inkubation der Zellen wurde im Dual-Luciferase® Reporter Assay ermittelt. Die Aktvität der pAML1 Konstrukte und des „leeren“ Reportervektors pGL2 ohne Kotransfektion wurden jeweils auf 1 gesetzt und die Aktivierung in x-fach angegeben.

Wie aus Abbildung 3-9 deutlich wird, werden sowohl der distale (ca. 3-fach) als auch der proximal gelegene (ca. 4-fach) AML1 Promotor durch AML1-ETO transaktiviert (Säulen 3 und 8). AML1 und CBFβ haben zusammen keinen aktivierenden Effekt auf die beiden Promtor-Konstrukte (Säulen 5 und 10). AML1 oder CBFβ allein haben ebenfalls keinen Einfluss auf den proximalen oder distalen AML1 Promotor (Daten nicht gezeigt).

c-Jun führt am distalen Promotor-Konstrukt zu einer 3,7-fachen Transaktivierung (Säule 2), die etwas höher ist als die durch AML1-ETO. Am proximalen Promotor-Konstrukt zeigt sich fast kein Effekt (Säule 7).

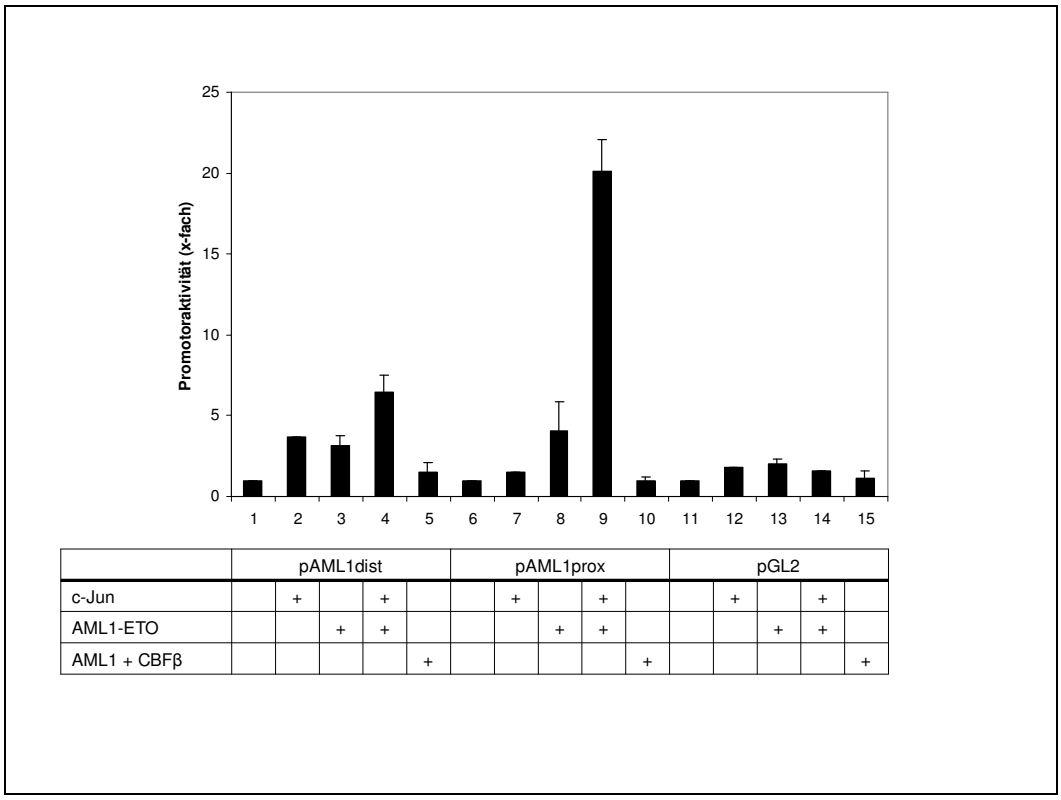


Abbildung 3-9:

Transiente Transfektion des distalen (pAML1dist, Säulen 1-5) und proximalen (pAML1prox, Säulen 6-10) AML1 Promotors in U937 Zellen mittels Effectene® im Reportervektor pGL2 zusammen mit c-Jun, AML1-ETO oder AML1 und CBFβ, jeweils im Expressionsvektor pCMV5. Von den Reporterkonstrukten wurden jeweils 0,57µg transfiziert. Von AML1-ETO, AML1 bzw. CBFβ wurden jeweils 0,2µg, von c-Jun 0,1µg und von der internen Kontrolle pRL-null 0,03µg verwendet. Als Kontrolle diente der „leere" Reportervektor pGL2 (Säulen 11-15). Die Zellen wurden nach der Transfektion für 24h inkubiert und die Promotor-Aktivität mittels des Dual-Luciferase® Reporter Assays wie in 2.2.2.4 beschrieben bestimmt. Die Aktivität der pAML1 Konstrukte und des „leeren" Reportervektors pGL2 ohne Kotransfektion wurden jeweils auf 1 gesetzt und die Aktivierung in x-fach angegeben.

Interessant ist, dass die Kotransfektion von AML1-ETO und c-Jun am distalen Promotor-Konstrukt zu einer ca. 6,5-fachen Transaktivierung führt, die in etwa

der Summe der Einzeleffekte entspricht (Säule 4). Am proximalen AML1 Promotor-Konstrukt kommt es dagegen zu einer mehr als 20-fachen Transaktivierung (Säule 9), was die Summe der Einzeleffekte von AML1-ETO und c-Jun deutlich übersteigt. Die Auswirkungen auf den „leeren“ Reportervektor sind wiederum nur gering ausgeprägt.

Somit bewirken AML1-ETO und c-Jun zusammen eine deutliche Steigerung der transkriptionellen Aktivität an ihren jeweiligen Promotoren, was im Sinne einer positiven Feedback-Schleife zu einer vermehrten Expression sowohl von c-Jun als auch von AML1-ETO führt.

3.7 Die Expression von AML1-ETO in einer Tetracyclin-induzierbaren Zelllinie erhöht die c-Jun mRNA-Expression

In den bisherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Promotoraktivität des c-Jun Promotors durch die Überexpression von AML1-ETO gesteigert werden kann. Diese mit dem Dual-Luciferase® Reporter Assay gemessenen Ergebnisse beziehen sich auf künstlich erzeugte Reporterkonstrukte. Im nächsten Versuch wurde daher die Frage untersucht, ob die Transaktivierung des c-Jun Promotors auch wirklich zu einer vermehrten c-Jun mRNA-Synthese führt.

Für diese Experimente wurden U937 Zellen verwendet, die mit einem Tetracyclin-regulierten (Tet-off-System) AML1-ETO-Expressionsvektor stabil transfiziert worden waren (U937 TET/A-E). Als Kontrolle wurden U937 Zellen verwendet, die mit dem gleichen Expressionsvektor, jedoch ohne das AML1-ETO-Gen stabil transfiziert worden waren (U937 TET). Die Zelllinien wurden freundlicherweise von Dong-Er Zhang zur Verfügung gestellt[8].

Zu Beginn des Experiments wurden 3 x 10^6 Zellen mehrfach in PBS gewaschen, anschließend wurden sie in Tetracyclin-freiem Nährmedium ausgesetzt (Zeitpunkt 0h). Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurden die Zellen entnommen und die RNA mit Hilfe des RNeasy® Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers wie in 2.2.4.1 beschrieben extrahiert. Mittels des Omniscript® RT cDNA Synthese Kit der gleichen Firma wurde die in den Proben enthaltene mRNA entsprechend der Angaben des Herstellers wie in 2.2.4.2 beschrieben in cDNA umgeschrieben.

Um Schwankungen in der cDNA-Synthese auszugleichen wurde in der anschließenden Realtime PCR neben c-Jun auch das „Housekeeping-Gen“ G6PD gemessen. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe des G6PD Expressionsplasmids. Das verwendete PCR-Protokoll ist in 2.2.4.3 ausführlich beschrieben. Es wurde der Quotient aus der Signalintensität von c-Jun und G6PD

gebildet und der Wert der 0h-Probe zur Vereinfachung der Darstellung auf 1 gesetzt. Die PCR-Produkte wurden abschließend auf einem Agarosegel mit Ethidiumbromid elektrophoretisch aufgetrennt und die Größe der PCR-Produkte kontrolliert.

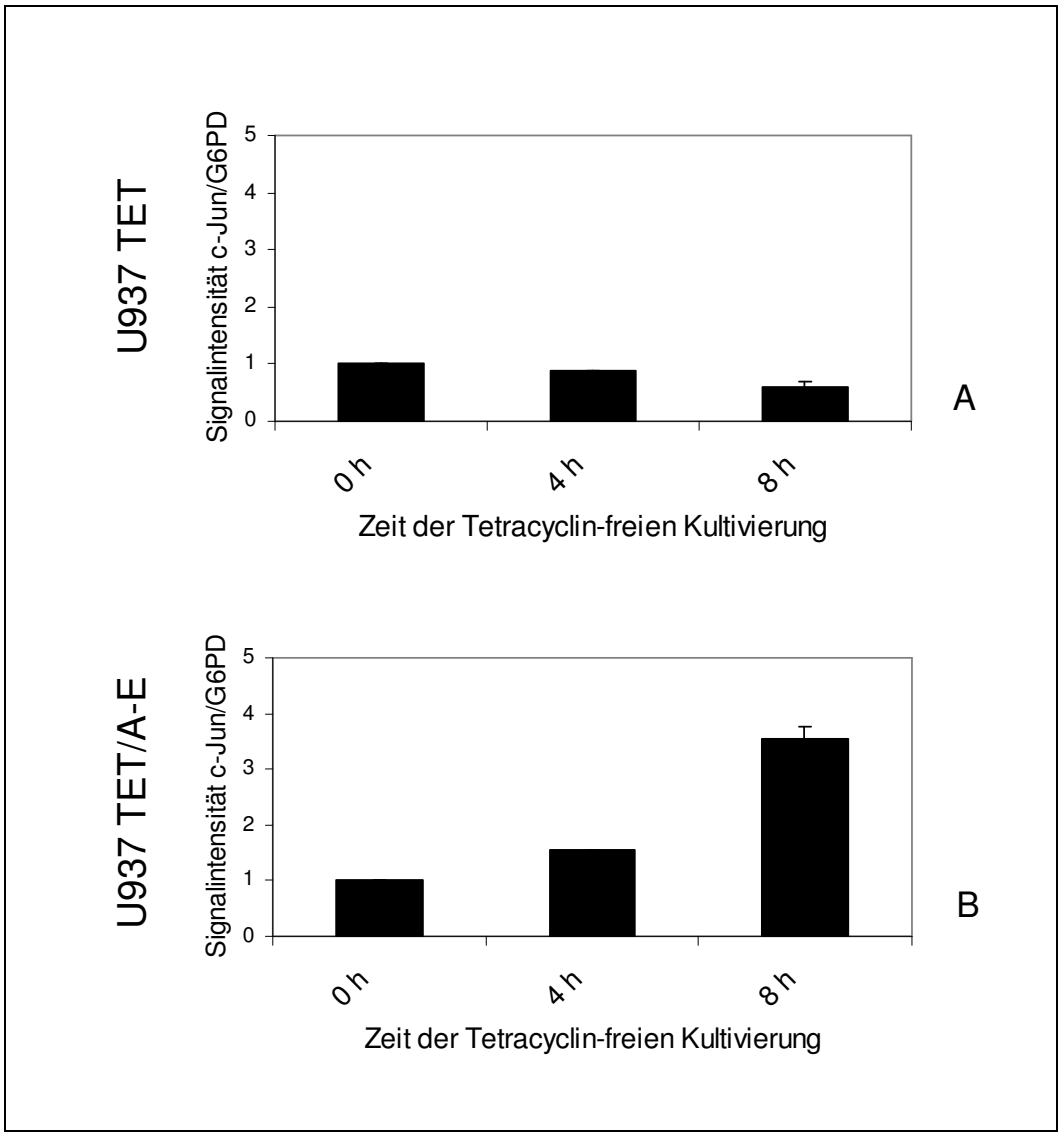


Abbildung 3-10:

Realtime-PCR für c-Jun in U937 TET (A) und U937 TET/A-E (B) Zellen.

3 x 10^6 Zellen wurden zum Zeitpunkt 0h in Tetracyclin-freies Medium eingesetzt und für die entsprechende Zeit inkubiert. Anschließend wurde die mRNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Mittels Realtime-PCR wurden die DNA-Konzentrationen des „Houskeeping-Gens" G6PD und von c-Jun bestimmt und als Quotient angegeben.

Während die c-Jun mRNA-Expression in U937 Zellen, die stabil mit einem Tetracyclin-induzierbaren (Tet-off) Expressionsvektor ohne AML1-ETO transfiziert worden waren, 4 und 8 Stunden nach Induktion des Expressionsvektors durch Tetracyclin-Entzug nahezu konstant bleibt (Abbildung 3-10 A), nimmt die c-Jun mRNA-Expression in der gleichen Zelllinie, die das Gen für AML1-ETO im Expressionsvektor enthält, mehr als 3,5-fach zu (Abbildung 3-10 B).

Damit ist gezeigt, dass AML1-ETO in U937 Zellen nicht nur zu einer Aktivierung des c-Jun Promotors, sondern auch zu einer vermehrten Transkription von c-Jun mRNA führt.

3.8 AML1-ETO erhöht die c-Jun Protein Expression in U937 Zellen

AML1-ETO erhöht die Aktivität des c-Jun Promotors, wobei für diese transkriptionelle Transaktivierung die proximale AP-1 Bindungsstelle des c-Jun Promotors notwendig ist. Die Aktivierung des Promotors führt wie in 3.7 gezeigt zu einer vermehrten Transkription von c-Jun mRNA.

Als nächstes war zu klären, ob die in den vorausgegangenen Versuchen gezeigten Effekte auch zu einer vermehrten Translation der c-Jun mRNA und damit zu einer erhöhten Proteinexpression führen.

Dazu wurden U937 Zn/A-E Zellen verwendet, die stabil mit einem Zink-induzierbaren AML1-ETO-Expresionsvektor transfiziert und freundlicherweise von Pier Giuseppe Pelicci zur Verfügung gestellt worden waren[19]. Diese Zellen wurden für 0, 2 und 4 Stunden mit Zink inkubiert, um eine Aktivierung des stabil transfizierten AML1-ETO Expressionsvektors zu bewirken. Anschließend wurden aus den Zellen wie in 2.2.3.1 beschrieben Lysate gewonnen. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration der einzelnen Lysate wurden von jedem Ansatz 100µg in ein Acrylamidgel geladen und die Proteine bei einer Spannung von 125V für 90min elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die Membran wurde dann zunächst mit einem primären Antikörper gegen ETO bzw. gegen c-Jun und anschließend mit dem entsprechenden sekundären Antikörper inkubiert und die Banden mittels Chemolumineszenz auf ECL-Hyperfilm sichtbar gemacht. Die Antikörper wurden danach im Stripping-Verfahren gelöst und dieselben Membranen zur Ladungskontrolle mit β-Tubulin- und den entsprechenden sekundären Antikörpern inkubiert. Zur Quantifizierung der Banden wurden die Blots eingescannt und mit der Software ImageJ densitometrische Messungen durchgeführt. Die genaue Methodik ist in 2.2.3 dargestellt.

In Abbildung 3-11 ist gezeigt, dass es durch die Zugabe von Zink zum Nährmedium nach 2 und 4 Stunden – wie erwartet – zu einer vermehrten Expression von AML1-ETO kommt (Spalten 6 und 7, oberer Blot). Ohne die Zugabe von Zink findet keine Expression von AML1-ETO statt (Spalte 5, oberer Blot) und auch in U937 Zellen, die als Kontrolle verwendet wurden, kann AML1-ETO – wie erwartet – nicht nachgewiesen werden (Spalten 2-4, oberer Blot). Zum Nachweis, dass es sich bei den durch den Anti-ETO-Antikörper detektierten Banden tatsächlich um AML1-ETO handelt, wurde in vitro translatiertes AML1-ETO (i.v.t. AML1-ETO)geladen (Spalte 1, oberer Blot), das – wie die Banden aus den Zell-Lysaten – im Vergleich zum ebenfalls geladenen Rainbow Ladder auf der erwarteten Höhe von 94 kDa gelegen ist.

Dieselbe Membran wurde im Anschluss für β-Tubulin als Ladekontrolle geblottet. Die β-Tubulin-Banden für U937 (Abbildung 3-11, Spalten 2-4, unterer Blot) und für U937 Zn/A-E (Abbildung 3-11, Spalten 5-7, unterer Blot) zeigen jeweils gleiche Intensität und laufen auf der erwarteten Höhe von 55kDa. Um die Banden zu quantifizieren wurden die Blots eingescannt und mit der Software ImageJ eine densitometrische Messung der einzelnen Banden durchgeführt. Zum Ausgleich von Ladefehlern wurde der Quotient aus der Intensität der AML1-ETO-Bande und der zugehörigen β-Tubulin-Bande gebildet. Der Quotient bei 0h (Abbildung 3-11, Spalte 5) wurde zur besseren Darstellung auf 1 gesetzt. Die Proteinexpression von AML1-ETO nimmt unter Zink-Stimulation auf das 2,7-fache zu.

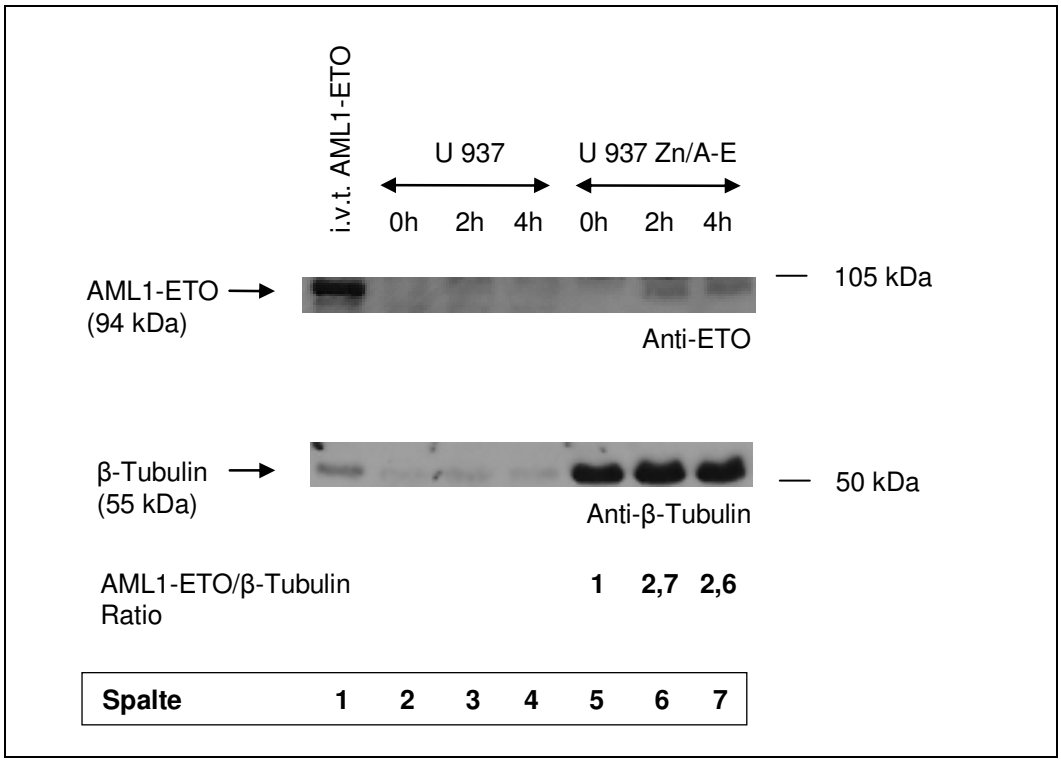


Abbildung 3-11:

Western Blot für AML1-ETO unter Verwendung eines ETO-Antikörpers (oberer Blot) in U937 Zn/A-E Zellen nach Stimulation mit Zink für 2 und 4 Stunden (Spalten 5-7). Als Kontrolle wurden unveränderte U937 Zellen verwendet (Spalten 2-4). In vitro translatiertes AML1-ETO (i.v.t. AML1-ETO) wird detektiert (Spalte 1, oberer Blot). Als Ladekontrolle diente der Nachweis von β-Tubulin (unterer Blot). Zur Quantifizierung wurden die Blots eingescannt und mit der Software ImageJ densitometrisch gemessen. Der AML1-ETO/β-Tubulin Quotient wurde angegeben.

In Abbildung 3-12 wurde die Membran für c-Jun geblottet. Nach zwei Stunden ist eine Zunahme der Bande, die auf Höhe der Bande für in vitro translatiertes c-Jun bei 39kDa liegt, für c-Jun nachweisbar (Abbildung 3-13, Spalten 6 und 7, oberer Blot), während die Banden für c-Jun in U937 Zellen ohne und mit Zink-Exposition für 2 und 4 Stunden ähnliche Intensität aufweisen (Abbildung 3-12, Spalten 2-4).

Auch diese Membran wurde für β-Tubulin geblottet, um die Gleichmäßigkeit der Lademengen zu überprüfen (Abbildung 3-12, Spalten 2-4 für U937 und Spalten 5-7 für U937 Zn/A-E, unterer Blot). β-Tubulin liegt auf der erwarteten Höhe von 55kDa.

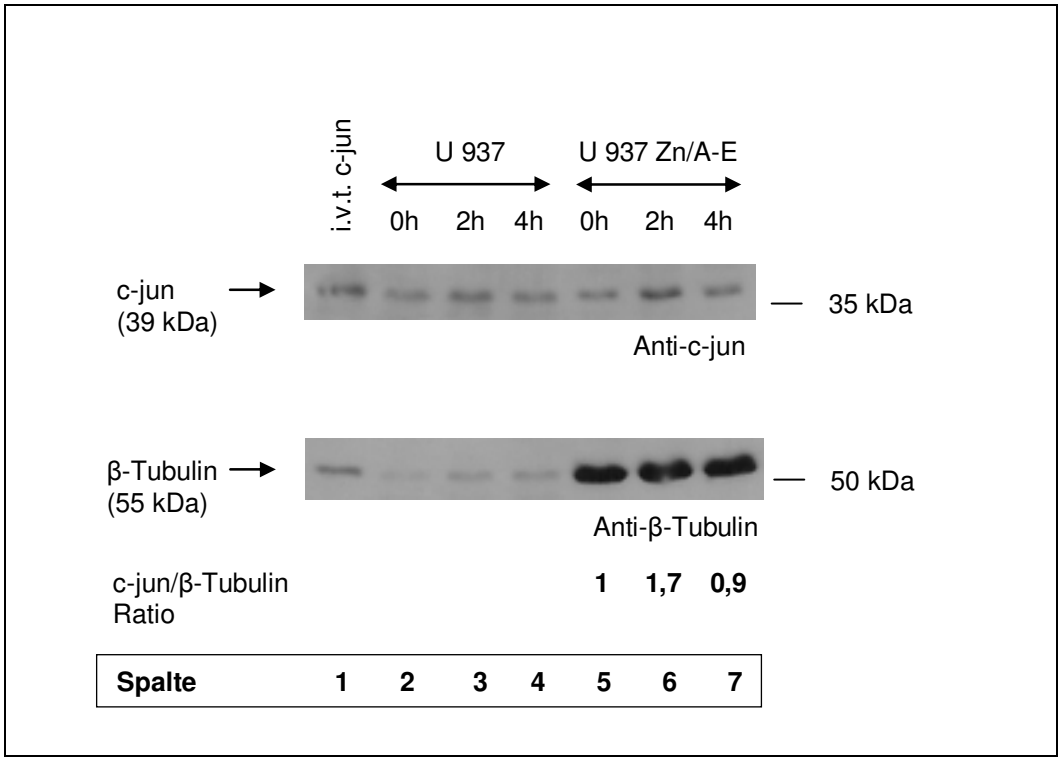


Abbildung 3-12:

Western Blot für c-Jun (oberer Blot) in U937 Zn/A-E Zellen (Spalten 5-7) nach Stimulation mit Zink für 2 und 4 Stunden. In vitro translatiertes c-Jun (i.v.t. c-Jun) wird detektiert (Spalte 1, oberer Blot). Als Kontrolle wurden wie in Abbildung 3-11 unveränderte U937 Zellen verwendet (Spalten 2-4). Als Ladekontrolle diente der Nachweis von β-Tubulin (unterer Blot). Zur Quantifizierung wurde der Blot eingescannt und die Banden densitometrisch gemessen. Der c-Jun/β-Tubulin Quotient wurde angegeben.

Es erfolgte wiederum die densitometrische Messung der Banden mit der Software ImageJ. Zum Ausgleich von Ladefehlern wurde der Quotient aus der Intensität der c-Jun-Bande und der zugehörigen β-Tubulin-Bande gebildet. Der Quotient bei 0h (Abbildung 3-12, Spalte 5) wurde zur besseren Darstellung auf 1 gesetzt. Die Proteinexpression von c-Jun nimmt unter Zink-Stimulation nach 2h auf das 1,7-fache zu, fällt jedoch bereits nach 4h auf das Ausgangsniveau zurück (Abbildung 3-12, Spalte 7).

3.9 Überexpression von AML1-ETO vermindert die Proliferation von U937 Zellen

Wie bereits in der Einleitung erläutert ist ein wesentlicher Bestandteil der Leukämogenese die unkontrollierte Proliferation des maligne entarteten Zellklons. Es wurde deshalb untersucht, ob die Überexpression von AML1-ETO in U937 Zellen zu einer Veränderung des Proliferationsverhaltens führt.

Dazu wurde die U937 Zelllinie verwendet, bei der ein Zink-induzierbarer AML1-ETO Expressionsvektor stabil transfiziert worden war. Als Kontrolle wurden unveränderte U937 Zellen verwendet. Die Zellen wurden gewaschen und jeweils $1x10^3$ Zellen in 100µl frisches Kulturmedium mit oder ohne Zink in 96-well-Platten resuspendiert. Nach 96h wurden die Zellen entsprechend den Angaben des Herstellers behandelt und die Extinktion bei 570nm gemessen. Das Ausmaß der Extinktion verhält sich dabei proportional zur Zahl der vitalen Zellen im jeweiligen Ansatz.

In Abbildung 3-13 ist der Effekt der Zugabe von Zink zum Kulturmedium auf U937 Zn/A-E Zellen gezeigt. Während U937 Zn/A-E ohne Zink-Induktion, d.h. ohne Expression von AML1-ETO eine ca. 3-fach höhere Proliferationsrate zeigen als U937 Zellen, ist diese verstärkte Proliferation unter Zink-Induktion, d.h. unter AML1-ETO-Expression nicht mehr nachweisbar. AML1-ETO bewirkt also eine verminderte Proliferation von U937 Zellen.

Ein toxischer Effekt von Zink kann ausgeschlossen werden, da unveränderte U937 Zellen mit und ohne Zink die gleiche Proliferationsrate zeigen.

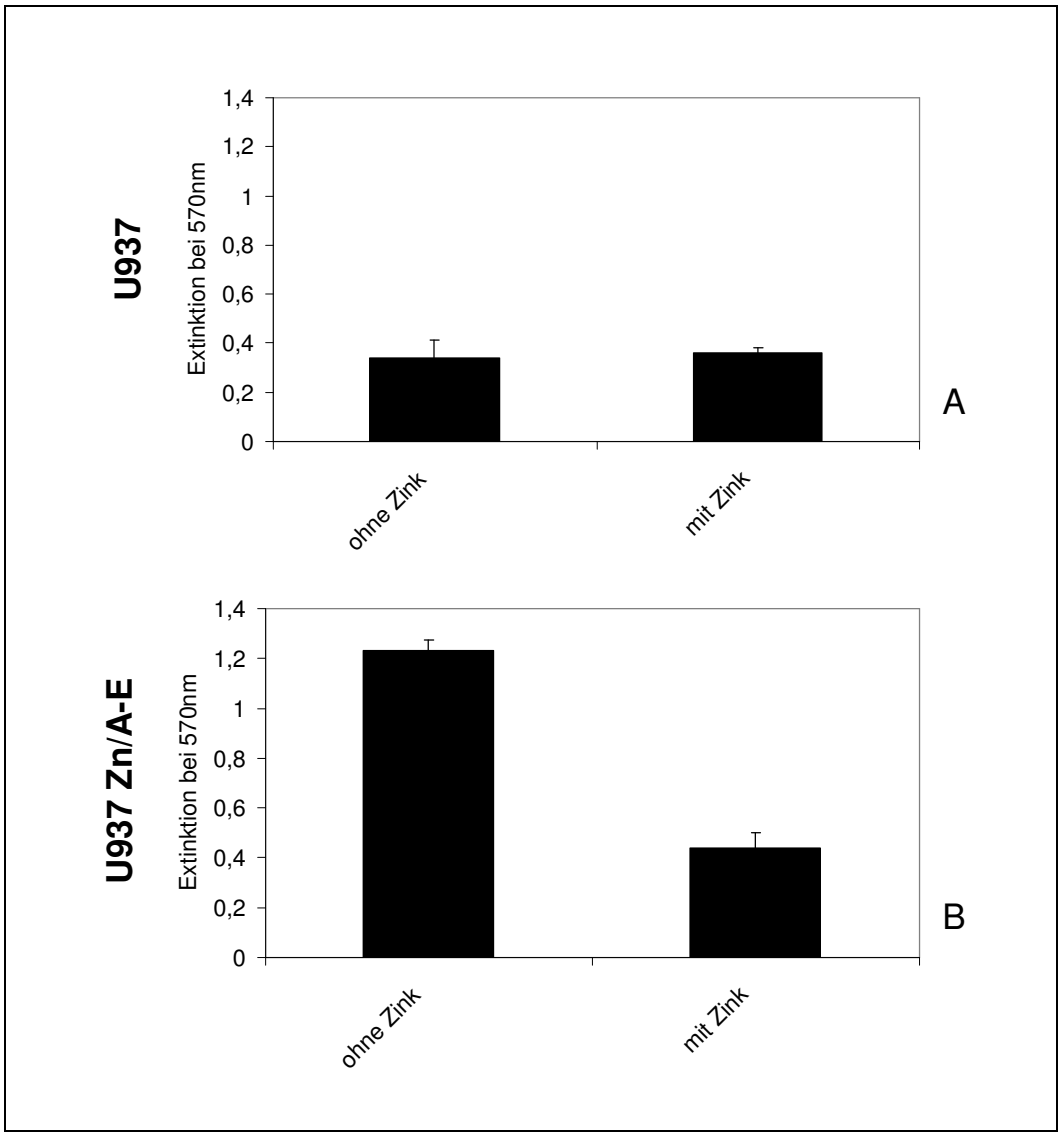


Abbildung 3-13

MTT-Assay für U937 Zn/A-E Zellen nach 96 Stunden Inkubation mit und ohne Zink (B). Zu Beginn wurde jeweils die gleiche Zellzahl (1 x 10^3 Zellen) in 100µl Nährmedium eingesetzt. Nach 96h Stunden wurde mittels des MTT-Assays, der eine Aussage über die Zahl der vitalen Zellen macht, die Extinktion bei 570nm gemessen. Um einen toxischen Effekt von Zink auszuschließen, wurden U937 Zellen als Kontrolle verwendet (A).

4 DISKUSSION

4.1 AML1-ETO und c-Jun

Die Hämatopoese des Menschen ist ein komplexer Vorgang der durch viele Faktoren, von denen bis heute nur ein kleiner Teil bekannt ist, stringent reguliert ist. Das ausgewogene Zusammenspiel von intrazellulären Transkriptionsfaktoren und extrazellulären Wachstums- und Botenstoffen ist nötig, um die Differenzierung aus einer pluripotenten Stammzelle hin zu den Leukozyten des peripheren Blutes zu regulieren.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Fusionsprotein AML1-ETO zu einer erhöhten Aktivität des c-Jun Promotors führt. Durch den Einsatz von verschiedenen Deletionskonstrukten des c-Jun Promotors konnte die Region, über die dieser Effekt vermittelt wird, auf die Region zwischen bp-79 und bp-63 eingegrenzt werden. In diesem Bereich liegt die proximale AP-1 Bindungsstelle des c-Jun Promotors, die zusammen mit der weiter distal liegenden AP-1 Bindungsstelle bei bp-190/-183 für die basale Promotoraktivität wichtig ist. Interessant ist dabei, dass sich die beiden AP-1 Bindungsstellen in zwei Basenpaaren unterscheiden: Die proximale AP-1 Bindungsstelle hat die Sequenz 5'-TGACATCA-3', die distale hat die Sequenz 5'-TTACCTCA-3'[89]. An beiden AP-1 Bindungsstellen bindet c-Jun vornehmlich als Heterodimer mit ATF-2[77,84,91], wobei die positive Autoregulation vor allem über die proximale AP-1 Bindungsstelle vermittelt ist[4,39].

Weitergehende Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe[15] konnten zeigen, dass eine Punktmutation der proximalen AP-1 Bindungsstelle des c-Jun Promotors ebenfalls die Transaktivierung durch AML1-ETO aufhebt. Die Transaktivierung des c-Jun Promotors durch AML1-ETO ist dabei jedoch nicht durch eine direkte Bindung an den c-Jun Promotor vermittelt, sondern durch einen indirekten Mechanismus. Erste Hinweise ergaben sich daraus, dass DNA-Bindung und Protein-Protein-Interaktionen von AML-ETO nur über die Runt homology

domain (RHD) beschrieben sind[40]. Die entsprechende DNA-Konsensus Bindungsstelle ist TGT/cGGT[49], die im menschlichen c-Jun Promotor – insbesondere in der für den Effekt von AML1-ETO wichtigen Region – nicht vorhanden ist.

Weitere Ergebnisse zeigen, dass AML1-ETO zur Phosphorylierung von JNK führt, wodurch die DNA-Bindung von AP-1-Transkriptionsfaktoren, insbesondere ATF-2 und c-Jun durch Phosphorylierung gesteigert wird. Es konnte auch gezeigt werden, dass JIP-1, ein Hemmstoff der JNK-Signalkaskade die transaktivierende Wirkung von AML1-ETO auf den c-Jun Promotor aufheben kann.

In 16 AML-Patientenproben mit der Translokation t(8;21) wurde die mRNA-Expression von c-Jun und AML1-ETO bestimmt. Als Bestätigung für die Ergebnisse aus unseren experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass die Höhe der c-Jun-mRNA-Expression und der AML1-ETO-mRNA-Expression in diesen Patientenproben positiv miteinander korrelierte.

In der Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit und weiterführender Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe gehen wir von folgendem Mechanismus aus: Durch die Translokation t(8;21) kommt es zur Fusion des größten Teils des Gens für den Transkriptionsfaktor AML1, der in der Hämatopoese eine zentrale Rolle spielt, mit nahezu dem gesamten ETO-Gen. Der AML1 Promotor, der aus zwei Promotoruntereinheiten – einer proximalen und einer distalen – besteht bleibt dabei im Gegensatz zum ETO Promotor erhalten und reguliert die Expression des entstandenen Fusions-Gens AML1-ETO.

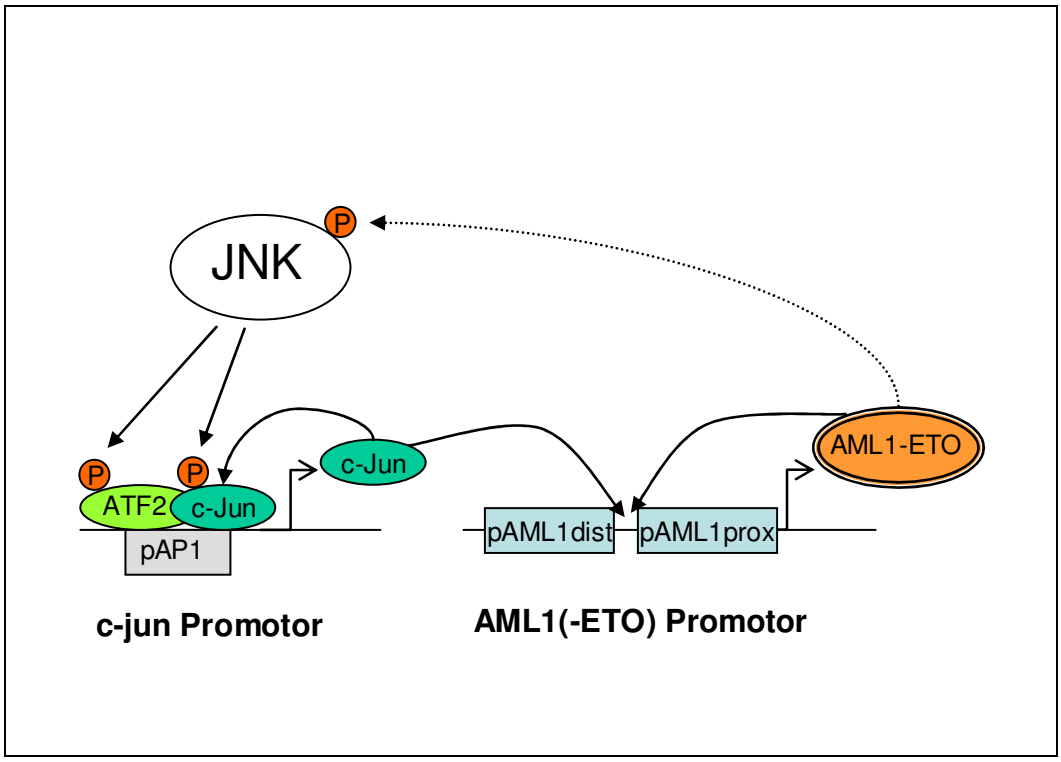


Abbildung 4-1:

Modell der Regulation der c-Jun-Expression durch AML1-ETO:

AML1-ETO führt z.B. über einen humoralen Faktor zu einer Aktivierung der JNK Signalkaskade. JNK führt über eine Phosphorylierung von AP-1-Transkriptionsfaktoren, die an der proximalen AP-1 Bindungsstelle (pAP1) des c-Jun Promotors ein Heterodimer gebildet haben, zu einer Transaktivierung des c-Jun Promotors. Die vermehrte Expression von c-Jun führt einerseits zu einer weiteren Aktivierung des c-Jun Promotors, zum anderen zusammen mit AML1-ETO zu einer Transaktivierung des AML1(-ETO) Promotors, der sich aus einem distalen (pAML1dist) und einem proximalen (pAML1prox) zusammensetzt. Das wiederum führt zu einer verstärkten Expression von AML1-ETO, wodurch eine positive Feedback-Schleife entsteht.

AML1-ETO führt über Mechanismen, die noch weiter untersucht werden müssen, zur Phosphorylierung und damit Aktivierung von JNK, die wiederum eine Phosphorylierung der AP-1-Mitglieder ATF2 und c-Jun bewirkt. c-Jun bildet zusammen mit ATF2 Heterodimere, die an der proximalen AP-1 Bindungsstelle des c-Jun Promotors binden und die transkriptionelle Aktivität des c-Jun Promotors erhöhen, wodurch es – wie in dieser Arbeit gezeigt zu einer vermehrten Expression von c-Jun kommt. c-Jun erhöht zum einen durch eine

autoregulatorische Schleife seine eigene Expression, zum anderen erhöht es die Aktivität des AML1 Promotors und führt so wiederum zu einer vermehrten Expression von AML1-ETO.

Es gibt Anzeichen dafür, dass dieser Mechanismus auch bei der Transaktivierung anderer Gene durch AML1-ETO eine wichtige Rolle spielt. *Li et al.* konnten kürzlich zeigen, dass AML1-ETO zu einer vermehrten Expression von connexin-43 führt, was zur Wachstumsinhibition führt[42]. In weiterführenden Untersuchungen der gleichen Arbeitsgruppe konnten *Gao et al.* belegen, dass der Mechanismus – wie in unseren Untersuchungen am c-Jun Promotor – JNK-abhängig ist und über zwei AP1-Bindungsstellen im connexin-43 Promotor vermittelt wird[23].

4.2 Leukämie-Entstehung – Blockierung der Differenzierung durch AML1-ETO

Bereits in der Einleitung ist diskutiert worden, dass für die Leukämie-Entstehung zwei Faktoren wichtig sind: Eine Blockierung der Zelldifferenzierung und eine vermehrte Proliferation. Welche Rolle spielt AML1-ETO nach dem heutigen Wissen für diese zwei Faktoren und inwieweit ist es in der Lage zur Leukämie-Entstehung beizutragen?

Ausgehend von CD34-positiven Vorläuferzellen kommt es im ersten Differenzierungsschritt der Hämatopoese zur Trennung in die lymphoide, myeloische und die erythrozytäre Zelllinie, wobei PU.1 für die myeloische und Gata-1 für die erythrozytäre Differenzierung eine entscheidende Funktion haben. AML1-ETO hat an dieser Stelle hemmenden Einfluss auf Gata-1, dessen Acetylierung durch seinen transkriptionellen Koaktivator p300/CBP durch AML1-ETO eingeschränkt wird und damit die Differenzierung zu Erythrozyten inhibiert[12].

Im nächsten Differenzierungsschritt wird C/EBPα für die Entwicklung unreifer Granulozyten/Monozyten-Vorläuferzellen benötigt [21]. Die nächste Schlüsselstelle in der Differenzierung der myeloischen Zellreihe ist die Trennung der monozytären Linie von den neutrophilen Granulozyten.
An dieser Stelle ist c-Jun als JNK-unabhängiger Koaktivator des Transkriptionsfaktors PU.1 entscheidend an der Differenzierung myeloischer Vorläuferzellen zu Monozyten beteiligt[5]. Der zentrale Transkriptionsfaktor für die Differenzierung zu neutrophilen Granulozyten ist C/EBPα. C/EBPα-Mutationen wurden in AML-Patientenproben gefunden[59]. Überexpression von C/EBPα führt sowohl in U937[63] als auch in Kasumi-Zellen[58] zur Differenzierung in Granulozyten.
Gleichzeitig behindert C/EBPα die Differenzierung zu Monozyten durch die Reduktion der c-Jun-Expression[64]. Umgekehrt behindert c-Jun die Funktion von C/EBPα durch Interaktion am Leucin Zipper.

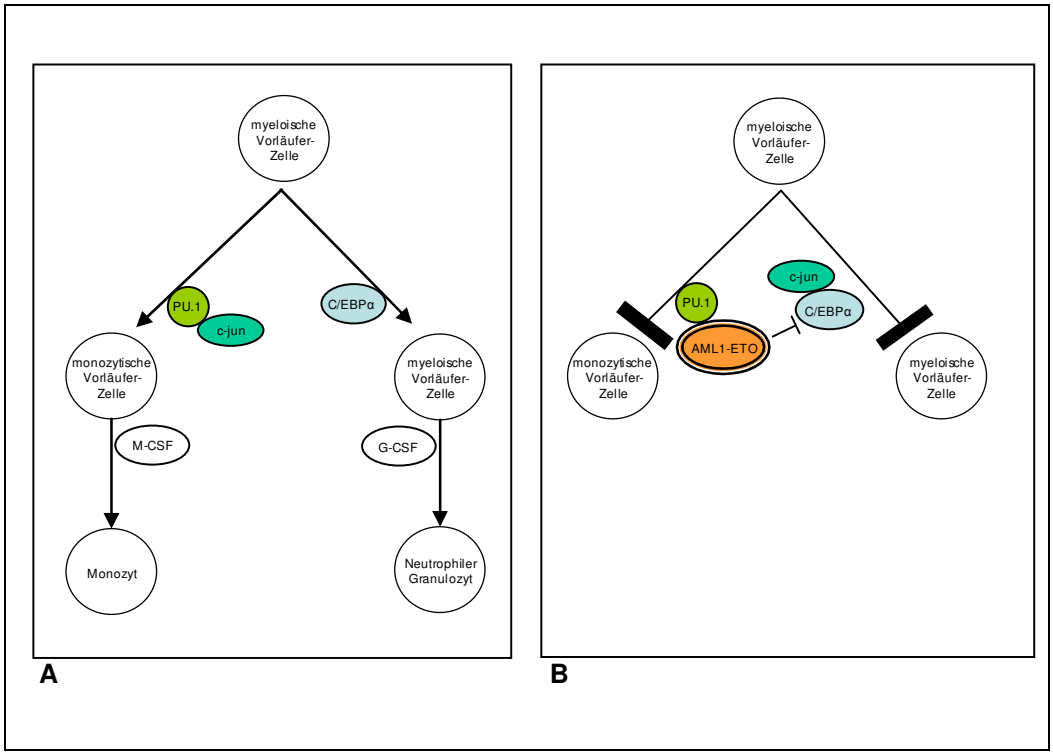


Abbildung 4-2:

Modell der Blockierung der Differenzierung durch AML1-ETO. In der normalen Hämatopoese (A) kommt es zu einer Differenzierung in Monozyten oder neutrophile Granulozyten. In welche Richtung sich die Vorläuferzelle differenziert, scheint von der Höhe der PU.1 bzw. C/EBPα-Expression abhängig zu sein. AML1-ETO bindet an PU.1 und verdrängt den Koaktivator c-Jun, der wiederum an C/EBPα bindet. Durch diese Mechanismen werden beide Differenzierungswege blockiert (B).

Westendorf et al. konnten zeigen, dass AML1-ETO an C/EBPα bindet und seine transkriptionelle Aktivität hemmt[90]. *Pabst et al.* zeigten, dass AML1-ETO die Expression von C/EBPα vermindert. Durch diese Eigenschaften blockiert AML1-ETO die C/EBPα-abhängige Differenzierung in Granulozyten. Diese Blockade kann durch C/EBPα-Überexpression in AML1-ETO-tragenden Kasumi-Zellen überwunden werden[58].

Für die Differenzierung zu Monozyten ist PU.1 von entscheidender Bedeutung. PU.1-Mutationen werden bei AML-Patienten häufig gefunden[52]. Aber auch die Differenzierung zu Monozyten ist durch AML1-ETO gestört. AML1-ETO ist in

der Lage, an PU.1 zu binden und dessen transkriptionelle Aktivität zu vermindern, ohne die DNA-Bindung zu beeinträchtigen. Die Expression von PU.1 wird durch AML1-ETO ebenfalls vermindert. Interessanterweise kann man in Kasumi-Zellen – analog zur Überexpression von C/EBPα – durch Überexpression von PU.1 den Differenzierungs-Block überwinden. Die Zellen differenzieren in Richtung Monozyten[85].

AML1-ETO scheint an dieser Schlüsselstelle der myeloischen Differenzierung beide Wege – zu Monozyten und neutrophilen Granulozyten – zu blockieren und erfüllt so als leukämisches Fusionsprotein seine Funktion als Differenzierungsblockierer.

4.3 Leukämie-Entstehung – Proliferation und AML1-ETO

Überraschend erscheint zunächst das Ergebnis aus 3.9, dass AML1-ETO die Proliferation von U937 Zellen hemmt. Diese Ergebnisse stehen jedoch im Einklang mit den Daten verschiedener anderer Arbeitsgruppen. *Shikami et al.* [73] konnten 1999 zeigen, dass die Expression des anti-apoptotischen Faktors Bcl-2 in t(8;21)-positiven de novo-AML-Patientenproben vermindert ist. *Burel et al.* [8] verwendeten U937/TET/A-E Zellen, die in dieser Arbeit für die real time PCR eingesetzt wurden. Auch sie beschreiben eine Reduktion der Proliferationsfähigkeit der Zellen bei Expression von AML1-ETO. Die Zellen verharren in der G0/G1 Phase des Zellzyklus, wahrscheinlich durch eine Reduktion von c-myc, was eine Verminderung von CDK4 zur Folge hat. Gleichzeitig ist die Expression von Bcl-2 vermindert und die Zellen werden apoptotisch.

Neueste Untersuchungen konnten diese Ergebnisse auch in Microarray-Analysen bestätigen[46]. Neben einer verminderten Bcl-2-Expression wurde eine erhöhte Expression des proapoptotischen Faktors bak gefunden.
Ein weiterer Faktor der für die Hemmung der Proliferation durch AML1-ETO verantwortlich zu sein scheint, ist Connexin 43 (CX43), das bei AML1-ETO-Expression in einer induzierbaren Zelllinie vermehrt synthetisiert wird und zur Wachstumsinhibition führt. Durch small interfering RNA (siRNA) konnten die Autoren diesen Effekt überwinden[42].

AML1-ETO scheint also das Zellwachstum zu hemmen und zu Apoptose zu führen. Gibt es Hinweise, dass die in dieser Arbeit beschriebene Erhöhung der c-Jun-Expression in diesem Kontext eine Rolle spielt? In der Literatur gibt es zahlreiche Berichte über die Proliferations-steigernden Effekte von c-Jun. Wachstumsfaktoren oder Onkogene stimulieren die JNK-Signalkaskade, was zu einer Phosphorylierung und Aktivierung von c-Jun mit verstärkter Proliferation oder maligner Transformation führt. Über den gleichen Mechanismus kann c-Jun jedoch auch zu Apoptose oder Wachstumshemmung führen[31].

In der Tat konnten *Bossy-Wetzel et al.* in NIH 3T3 Zellen zeigen, dass erhöhte c-Jun-Aktivität zur Apoptose führt[6].

p73, ein Faktor, der zusammen mit p53 wesentlich daran beteiligt ist, dass es in Tumorzellen zur Apoptose kommt, wird durch c-Jun stabilisiert und aktiviert[81].
Auch in weiteren Experimenten in unserer Arbeitsgruppe konnten *Elsässer et al.* [15] ebenfalls in einer induzierbaren Zelllinie zeigen, dass AML1-ETO zu vermehrter Apoptose führt. Dieser Effekt scheint von AML1-ETO über die JNK-Signalkaskade und eventuell auch über c-Jun vermittelt zu sein, da die Apoptose durch Hemmung von JNK aufgehoben werden kann.

Interessanterweise kann die Entfernung der C-terminalen NCor/SMRT-Domäne von AML1-ETO das Fusionsprotein in einen wesentlich potenteren leukämogenischen Faktor verwandeln, der das Zellwachstum nicht wie das vollständige Fusionsprotein inhibiert[92]. Da über diese Domäne – wie in der Einleitung bereits erwähnt – ein Corepressor-Komplex an AML1-ETO gebunden wird, scheint dieser der proliferativen Wirkung von AML1-ETO entgegen zu wirken.

Diese Ergebnisse befinden sich im Einklang mit einem Modell, in dem AML1-ETO allein nicht für die Leukämie-Entstehung ausreichend ist. Es scheint mindestens ein zusätzlicher „second hit“ nötig zu sein, um die Proliferationshemmung zu überwinden und damit beide Faktoren, die für die Leukämie-Entstehung nach heutigem Wissen essentiell sind, zu erfüllen. „Second hits“, die besonders häufig in Patientenproben gefunden werden und mit AML1-ETO kooperieren, scheinen dabei Rezeptor-Tyrosinkinasen wie FLT3 oder c-KIT zu sein. Diese Beobachtungen zeigen auch einen potentiellen therapeutischen Ansatz durch Tyrosinkinase-Inhibitoren[71].

5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Fusionsprotein AML1-ETO die Aktivität des vollständigen humanen c-Jun Promotors in der humanen Zelllinie U937 steigert. Diese Aktivitätssteigerung ist dosisabhängig und wird über die proximale AP-1 Bindungsstelle des c-Jun Promotors vermittelt. In weiteren Transfektionsexperimenten konnte nachgewiesen werden, dass c-Jun über die proximale AP-1 Bindungsstelle mit AML1-ETO kooperiert und es so zu einer ausgeprägten Transaktivierung des c-Jun Promotors kommt.

An den zwei Promotoren, die die Expression von AML1-ETO regulieren, zeigt sich in Bezug auf die Transaktivierung ein positiver synergistischer Effekt von c-Jun und AML1-ETO. Beide Faktoren erhöhen die Transaktivierung ihrer Promotoren und damit ihre eigene Expression in einer positiven Verstärkungsschleife.

Als Ergebnis dieser Transaktivierung des c-Jun Promotors ist die Transkription von c-Jun-mRNA gesteigert. Erhöhte Werte von c-Jun-mRNA konnten in einer induzierbaren U937-Zelllinie in der Realtime PCR nachgewiesen werden, was schließlich in einer vermehrten c-Jun Protein-Expression resultiert, die im Western Blot nachgewiesen werden konnte.

Im MTT-Assay konnte nachgewiesen werden, dass die Überexpression von AML1-ETO Einfluss auf das Proliferationsverhalten von U937-Zellen hat. Als Resultat der AML1-ETO-Expression in Zink-induzierbaren U937 Zellen ist ihre Proliferationsfähigkeit herabgesetzt, was im Einklang mit Resultaten anderer Arbeitsgruppen in ähnlichen induzierbaren Systemen steht.

Es wird ein Modell vorgeschlagen, in dem es durch die gegenseitige transkriptionelle Aktivierung in einer positiven Feedback-Schleife von AML1-ETO und c-Jun zu einer Überexpression und einer vermehrten

Phosphorylierung von c-Jun kommt. Das führt zum einen zu einer Blockierung der Zelldifferenzierung, die ein wichtiger Bestandteil der Leukämogenese ist. Zum anderen führt es zu einer Proliferationshemmung, die evtl. durch weitere genetische Mutationen überwunden werden muss, damit es zur Leukämie-Entstehung kommt. Wenn es gelänge, den Differenzierungsblock zu überwinden, wäre das ein möglicher therapeutischer Ansatz für Patienten mit AML1-ETO-positiver AML.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Alcalay, M., Meani, N., Gelmetti, V., Fantozzi, A., Fagioli, M., Orleth, A., Riganelli, D., Sebastiani, C., Cappelli, E., Casciari, C., Sciurpi, M. T., Mariano, A. R., Minardi, S. P., Luzi, L., Muller, H., Di Fiore, P. P., Frosina, G., and Pelicci, P. G.
Acute myeloid leukemia fusion proteins deregulate genes involved in stem cell maintenance and DNA repair. J.Clin.Invest 2003; 112:1751-1761

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

3. Andersson, M., Philip, P., and Pedersen-Bjergaard, J.
High risk of therapy-related leukemia and preleukemia after therapy with prednimustine, methotrexate, 5-fluorouracil, mitoxantrone, and tamoxifen for advanced breast cancer. Cancer 1990; 65:2460-2464

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

5. Behre, G., Whitmarsh, A. J., Coghlan, M. P., Hoang, T., Carpenter, C. L., Zhang, D. E., Davis, R. J., and Tenen, D. G.
c-Jun is a JNK-independent coactivator of the PU.1 transcription factor. J.Biol.Chem. 1999; 274:4939-4946

6. Bossy-Wetzel, E., Bakiri, L., and Yaniv, M.
Induction of apoptosis by the transcription factor c-Jun. EMBO J. 1997; 16:1695-1709

7. Buchner, T., Hiddemann, W., Wormann, B., Loffler, H., Gassmann, W., Haferlach, T., Fonatsch, C., Haase, D., Schoch, C., Hossfeld, D., Lengfelder, E., Aul, C., Heyll, A., Maschmeyer, G., Ludwig, W. D., Sauerland, M. C., and Heinecke, A.
Double induction strategy for acute myeloid leukemia: the effect of high-dose cytarabine with mitoxantrone instead of standard-dose cytarabine with daunorubicin and 6-thioguanine: a randomized trial by the German AML Cooperative Group. Blood 1999; 93:4116-4124

8. 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. Mol.Cell Biol. 2001; 21:5577-5590

9. Cheson, B. D., Bennett, J. M., Kopecky, K. J., Buchner, T., Willman, C. L., Estey, E. H., Schiffer, C. A., Doehner, H., Tallman, M. S., Lister, T. A., Lo-Coco, F., Willemze, R., Biondi, A., Hiddemann, W., Larson, R. A., Lowenberg, B., Sanz, M. A., Head, D. R., Ohno, R., and Bloomfield, C. D.
Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. J.Clin.Oncol. 2003; 21:4642-4649

10. Chinenov, Y. and Kerppola, T. K.
Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. Oncogene 2001; 20:2438-2452

11. Cho, E. K., Bang, S. M., Ahn, J. Y., Yoo, S. M., Park, P. W., Seo, Y. H., Shin, D. B., and Lee, J. H.
Prognostic value of AML 1/ETO fusion transcripts in patients with acute myelogenous leukemia. Korean J.Intern.Med. 2003; 18:13-20

12. Choi, Y., Elagib, K. E., Delehanty, L. L., and Goldfarb, A. N.
Erythroid inhibition by the leukemic fusion AML1-ETO is associated with impaired acetylation of the major erythroid transcription factor GATA-1. Cancer Res. 2006; 66:2990-2996

13. Curtis, R. E., Boice, J. D., Jr., Stovall, M., Flannery, J. T., and Moloney, W. C.
Leukemia risk following radiotherapy for breast cancer. J.Clin.Oncol. 1989; 7:21-29

14. Davis, J. N., McGhee, L., and Meyers, S.
The ETO (MTG8) gene family. Gene 2003; 303:1-10

15. 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. Oncogene 2003; 22:5646-5657

16. 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. Leukemia 1999; 13:1825-1832

17. Erickson, P., Gao, J., Chang, K. S., Look, T., Whisenant, E., Raimondi, S., Lasher, R., Trujillo, J., Rowley, J., and Drabkin, H.
Identification of breakpoints in t(8;21) acute myelogenous leukemia and isolation of a fusion transcript, AML1/ETO, with similarity to Drosophila segmentation gene, runt. Blood 1992; 80:1825-1831

18. Feinstein, P. G., Kornfeld, K., Hogness, D. S., and Mann, R. S.
Identification of homeotic target genes in Drosophila melanogaster including nervy, a proto-oncogene homologue. Genetics 1995; 140:573-586

19. Ferrara, F. F., Fazi, F., Bianchini, A., Padula, F., Gelmetti, V., Minucci, S., Mancini, M., Pelicci, P. G., Lo, Coco F., and Nervi, C.
Histone deacetylase-targeted treatment restores retinoic acid signaling and differentiation in acute myeloid leukemia. Cancer Res. 2001; 61:2-7

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

21. Friedman, A. D., Keefer, J. R., Kummalue, T., Liu, H., Wang, Q. F., and Cleaves, R.
Regulation of granulocyte and monocyte differentiation by CCAAT/enhancer binding protein alpha. Blood Cells Mol.Dis. 2003; 31:338-341

22. Gamou, T., Kitamura, E., Hosoda, F., Shimizu, K., Shinohara, K., Hayashi, Y., Nagase, T., Yokoyama, Y., and Ohki, M.
The partner gene of AML1 in t(16;21) myeloid malignancies is a novel member of the MTG8(ETO) family. Blood 1998; 91:4028-4037

23. Gao, F. H., Wang, Q., Wu, Y. L., Li, X., Zhao, K. W., and Chen, G. Q.
c-Jun N-terminal kinase mediates AML1-ETO protein-induced connexin-43 expression. Biochem.Biophys.Res.Commun. 2007; 356:505-511

24. Gelmetti, V., Zhang, J., Fanelli, M., Minucci, S., Pelicci, P. G., and Lazar, M. A.
Aberrant recruitment of the nuclear receptor corepressor-histone deacetylase complex by the acute myeloid leukemia fusion partner ETO. Mol.Cell Biol. 1998; 18:7185-7191

25. Ghozi, M. C., Bernstein, Y., Negreanu, V., Levanon, D., and Groner, Y.
Expression of the human acute myeloid leukemia gene AML1 is regulated by two promoter regions. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1996; 93:1935-1940

26. Gilliland, D. G. and Griffin, J. D.
The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. Blood 2002; 100:1532-1542

27. Golub, T. R., Barker, G. F., Bohlander, S. K., Hiebert, S. W., Ward, D. C., Bray-Ward, P., Morgan, E., Raimondi, S. C., Rowley, J. D., and Gilliland, D. G.
Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1995; 92:4917-4921

28. Groskreutz, D. J., Sherf, B. A., Wood, K. V., and Schenborn, E. T.
Increased Expression and Convenience with the New pGL3 Luciferase Reporter Vectors. Promega Notes Magazine 1995;

29. Gupta, S., Campbell, D., Derijard, B., and Davis, R. J.
Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. Science 1995; 267:389-393

30. Harris, N. L., Jaffe, E. S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H. K., Vardiman, J., Lister, T. A., and Bloomfield, C. D.
World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. J.Clin.Oncol. 1999; 17:3835-3849

31. Heasley, L. E. and Han, S. Y.
JNK regulation of oncogenesis. Mol.Cells 2006; 21:167-173

32. Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A., and Karin, M.
Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. Genes Dev. 1993; 7:2135-2148

33. Higuchi, M., O'Brien, D., Kumaravelu, P., Lenny, N., Yeoh, E. J., and Downing, J. R.
Expression of a conditional AML1-ETO oncogene bypasses embryonic lethality and establishes a murine model of human t(8;21) acute myeloid leukemia. Cancer Cell 2002; 1:63-74

34. Huang, M. E., Ye, Y. C., Chen, S. R., Chai, J. R., Lu, J. X., Zhoa, L., Gu, L. J., and Wang, Z. Y.
Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. Blood 1988; 72:567-572

35. Hug, B. A. and Lazar, M. A.
ETO interacting proteins. Oncogene 2004; 23:4270-4274

36. Jemal, A., Thomas, A., Murray, T., and Thun, M.
Cancer statistics, 2002. CA Cancer J.Clin. 2002; 52:23-47

37. Kakizuka, A., Miller, W. H., Jr., Umesono, K., Warrell, R. P., Jr., Frankel, S. R., Murty, V. V., Dmitrovsky, E., and Evans, R. M.
Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. Cell 1991; 66:663-674

38. 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. Oncogene 1999; 18:7168-7173

39. Lamph, W. W., Wamsley, P., Sassone-Corsi, P., and Verma, I. M.
Induction of proto-oncogene JUN/AP-1 by serum and TPA. Nature 1988; 334:629-631

40. Lenny, N., Meyers, S., and Hiebert, S. W.
Functional domains of the t(8;21) fusion protein, AML-1/ETO. Oncogene 1995; 11:1761-1769

41. Leone, G., Mele, L., Pulsoni, A., Equitani, F., and Pagano, L.
The incidence of secondary leukemias. Haematologica 1999; 84:937-945

42. Li, X., Xu, Y. B., Wang, Q., Lu, Y., Zheng, Y., Wang, Y. C., Lubbert, M., Zhao, K. W., and Chen, G. Q.
Leukemogenic AML1-ETO fusion protein upregulates expression of connexin 43: the role in AML 1-ETO-induced growth arrest in leukemic cells. J.Cell Physiol 2006; 208:594-601

43. Liu, P., Tarle, S. A., Hajra, A., Claxton, D. F., Marlton, P., Freedman, M., Siciliano, M. J., and Collins, F. S.
Fusion between transcription factor CBF beta/PEBP2 beta and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia. Science 1993; 261:1041-1044

44. Look, A. T.
Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. Science 1997; 278:1059-1064

45. Lowenberg, B., Downing, J. R., and Burnett, A.
Acute myeloid leukemia. N.Engl.J.Med. 1999; 341:1051-1062

46. Lu, Y., Xu, Y. B., Yuan, T. T., Song, M. G., Lubbert, M., Fliegauf, M., and Chen, G. Q.
Inducible expression of AML1-ETO fusion protein endows leukemic cells with susceptibility to extrinsic and intrinsic apoptosis. Leukemia 2006; 20:987-993

47. Lutterbach, B., Westendorf, J. J., Linggi, B., Patten, A., Moniwa, M., Davie, J. R., Huynh, K. D., Bardwell, V. J., Lavinsky, R. M., Rosenfeld, M. G., Glass, C., Seto, E., and Hiebert, S. W.
ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, interacts with the N-CoR and mSin3 corepressors. Mol.Cell Biol. 1998; 18:7176-7184

48. Maki, Y., Bos, T. J., Davis, C., Starbuck, M., and Vogt, P. K.
Avian sarcoma virus 17 carries the jun oncogene. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1987; 84:2848-2852

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

50. Miyoshi, H., Kozu, T., Shimizu, K., Enomoto, K., Maseki, N., Kaneko, Y., Kamada, N., and Ohki, M.
The t(8;21) translocation in acute myeloid leukemia results in production of an AML1-MTG8 fusion transcript. EMBO J. 1993; 12:2715-2721

51. Mosmann, T.
Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J.Immunol.Methods 1983; 65:55-63

52. Mueller, B. U., Pabst, T., Osato, M., Asou, N., Johansen, L. M., Minden, M. D., Behre, G., Hiddemann, W., Ito, Y., and Tenen, D. G.
Heterozygous PU.1 mutations are associated with acute myeloid leukemia. Blood 2002; 100:998-1007

53. Nucifora, G., Birn, D. J., Erickson, P., Gao, J., LeBeau, M. M., Drabkin, H. A., and Rowley, J. D.
Detection of DNA rearrangements in the AML1 and ETO loci and of an AML1/ETO fusion mRNA in patients with t(8;21) acute myeloid leukemia. Blood 1993; 81:883-888

54. Nucifora, G., Birn, D. J., Espinosa, R., III, Erickson, P., LeBeau, M. M., Roulston, D., McKeithan, T. W., Drabkin, H., and Rowley, J. D.
Involvement of the AML1 gene in the t(3;21) in therapy-related leukemia and in chronic myeloid leukemia in blast crisis. Blood 1993; 81:2728-2734

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

56. Ogawa, E., Inuzuka, M., Maruyama, M., Satake, M., Naito-Fujimoto, M., Ito, Y., and Shigesada, K.
Molecular cloning and characterization of PEBP2 beta, the heterodimeric partner of a novel Drosophila runt-related DNA binding protein PEBP2 alpha. Virology 1993; 194:314-331

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

58. 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. Nat.Med. 2001; 7:444-451

59. Pabst, T., Mueller, B. U., Zhang, P., Radomska, H. S., 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. Nat.Genet. 2001; 27:263-270

60. Peterson, L. F. and Zhang, D. E.
The 8;21 translocation in leukemogenesis. Oncogene 2004; 23:4255-4262

61. Pulverer, B. J., Kyriakis, J. M., Avruch, J., Nikolakaki, E., and Woodgett, J. R.
Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. Nature 1991; 353:670-674

62. Putz, G., Rosner, A., Nuesslein, I., Schmitz, N., and Buchholz, F.
AML1 deletion in adult mice causes splenomegaly and lymphomas. Oncogene 2006; 25:929-939

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

64. 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. Mol.Cell Biol. 2002; 22:8681-8694

65. Rhoades, K. L., Hetherington, C. J., Harakawa, N., Yergeau, D. A., Zhou, L., Liu, L. Q., Little, M. T., Tenen, D. G., and Zhang, D. E.
Analysis of the role of AML1-ETO in leukemogenesis, using an inducible transgenic mouse model. Blood 2000; 96:2108-2115

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

67. Rowley, J. D.
Identificaton of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia. Ann.Genet. 1973; 16:109-112

68. Rozek, D. and Pfeifer, G. P.
In vivo protein-DNA interactions at the c-jun promoter: preformed complexes mediate the UV response. Mol.Cell Biol. 1993; 13:5490-5499

69. Ryseck, R. P. and Bravo, R.
c-JUN, JUN B, and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins. Oncogene 1991; 6:533-542

70. Sasaki, K., Yagi, H., Bronson, R. T., Tominaga, K., Matsunashi, T., Deguchi, K., Tani, Y., Kishimoto, T., and Komori, T.
Absence of fetal liver hematopoiesis in mice deficient in transcriptional coactivator core binding factor beta. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1996; 93:12359-12363

71. Schessl, C., Rawat, V. P., Cusan, M., Deshpande, A., Kohl, T. M., Rosten, P. M., Spiekermann, K., Humphries, R. K., Schnittger, S., Kern, W., Hiddemann, W., Quintanilla-Martinez, L., Bohlander, S. K., Feuring-Buske, M., and Buske, C.
The AML1-ETO fusion gene and the FLT3 length mutation collaborate in inducing acute leukemia in mice. J.Clin.Invest 2005; 115:2159-2168

72. Schön, D., Bertz, J., Görsch, B., Haberland, J., Ziegler, H., Stegmaier, C., Eisinger, B., and Stabenow, R.
Entwicklung der Überlebensraten von Krebspatienten in Deutschland.1999;

73. Shikami, M., Miwa, H., Nishii, K., Takahashi, T., Sekine, T., Mahmud, N., Nishikawa, M., Shiku, H., Kamada, N., and Kita, K.
Low BCL-2 expression in acute leukemia with t(8;21) chromosomal abnormality. Leukemia 1999; 13:358-368

74. Shivdasani, R. A. and Orkin, S. H.
The transcriptional control of hematopoiesis. Blood 1996; 87:4025-4039

75. Smeal, T., Binetruy, B., Mercola, D. A., Birrer, M., and Karin, M.
Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. Nature 1991; 354:494-496

76. Solomon, E., Borrow, J., and Goddard, A. D.
Chromosome aberrations and cancer. Science 1991; 254:1153-1160

77. Stein, B., Angel, P., van Dam, H., Ponta, H., Herrlich, P., van der, Eb A., and Rahmsdorf, H. J.
Ultraviolet-radiation induced c-jun gene transcription: two AP-1 like binding sites mediate the response. Photochem.Photobiol. 1992; 55:409-415

78. Su, B., Jacinto, E., Hibi, M., Kallunki, T., Karin, M., and Ben Neriah, Y.
JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes. Cell 1994; 77:727-736

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

80. Takahashi, A., Satake, M., Yamaguchi-Iwai, Y., Bae, S. C., Lu, J., Maruyama, M., Zhang, Y. W., Oka, H., Arai, N., Arai, K., and .
Positive and negative regulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promoter activity by AML1-related transcription factor, PEBP2. Blood 1995; 86:607-616

81. Toh, W. H., Siddique, M. M., Boominathan, L., Lin, K. W., and Sabapathy, K.
c-Jun regulates the stability and activity of the p53 homologue, p73. J.Biol.Chem. 2004; 279:44713-44722

82. Uchida, H., Zhang, J., and Nimer, S. D.
AML1A and AML1B can transactivate the human IL-3 promoter. J.Immunol. 1997; 158:2251-2258

83. 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. Nucleic Acids Res. 1992; 20:897-902

84. van Dam, H., Duyndam, M., Rottier, R., Bosch, A., Vries-Smits, L., Herrlich, P., Zantema, A., Angel, P., and van der Eb, A. J.
Heterodimer formation of cJun and ATF-2 is responsible for induction of c-jun by the 243 amino acid adenovirus E1A protein. EMBO J. 1993; 12:479-487

85. Vangala, R. K., Heiss-Neumann, M. S., Rangatia, J. S., Singh, S. M., Schoch, C., Tenen, D. G., Hiddemann, W., and Behre, G.
The myeloid master regulator transcription factor PU.1 is inactivated by AML1-ETO in t(8;21) myeloid leukemia. Blood 2002;

86. Virchow, R.
Weisses Blut.1845;

87. Wang, J., Hoshino, T., Redner, R. L., Kajigaya, S., and Liu, J. M.
ETO, fusion partner in t(8;21) acute myeloid leukemia, represses transcription by interaction with the human N-CoR/mSin3/HDAC1 complex. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1998; 95:10860-10865

88. Wang, Q., Stacy, T., Binder, M., Marin-Padilla, M., Sharpe, A. H., and Speck, N. A.
Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1996; 93:3444-3449

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

90. Westendorf, J. J., Yamamoto, C. M., Lenny, N., Downing, J. R., Selsted, M. E., and Hiebert, S. W.
The t(8;21) fusion product, AML-1-ETO, associates with C/EBP-alpha, inhibits C/EBP-alpha-dependent transcription, and blocks granulocytic differentiation. Mol.Cell Biol. 1998; 18:322-333

91. Wong, C., Rougier-Chapman, E. M., Frederick, J. P., Datto, M. B., Liberati, N. T., Li, J. M., and Wang, X. F.
Smad3-Smad4 and AP-1 complexes synergize in transcriptional activation of the c-Jun promoter by transforming growth factor beta. Mol.Cell Biol. 1999; 19:1821-1830

92. Yan, M., Burel, S. A., Peterson, L. F., Kanbe, E., Iwasaki, H., Boyapati, A., Hines, R., Akashi, K., and Zhang, D. E.
Deletion of an AML1-ETO C-terminal NcoR/SMRT-interacting region strongly induces leukemia development. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 2004; 101:17186-17191

93. Yuan, Y., Zhou, L., Miyamoto, T., Iwasaki, H., Harakawa, N., Hetherington, C. J., Burel, S. A., Lagasse, E., Weissman, I. L., Akashi, K., and Zhang, D. E.
AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 2001; 98:10398-10403

94. Zhang, D. E., Fujioka, K., Hetherington, C. J., Shapiro, L. H., Chen, H. M., Look, A. T., and Tenen, D. G.
Identification of a region which directs the monocytic activity of the colony-stimulating factor 1 (macrophage colony-stimulating factor) receptor promoter and binds PEBP2/CBF (AML1). Mol.Cell Biol. 1994; 14:8085-8095

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AML	Akute myeloische Leukämie
AP-1	Aktivator Protein-1
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
bZIP	basic region leucine zipper
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CDK	cyclin dependant kinase
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
C/EBPα	CCAAT Enhancer bindendes Protein alpha
CFU	colony forming unit
CTP	Cytidintriphosphat
CSF	colony stimulating factor
d	Tag
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtrisphosphat
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
h	Stunde
Inv	Inversion
JNK	Jun N-terminal kinase
LAR	Luciferase-Assay-Reagent

µ	mikro
M	Molar
M-CSF	Makrophage-Colony-Stimulating Factor
min	Minute
mRNA	messenger RNA
n	nano
NaOH	Natriumhydroxid
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PML	Promyelozyten-Leukämie-Gen
RARα	Retinsäurerezeptor α
Rpm	rounds per minute
RPMI	Rockland Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkription
RNA	Ribonukleinsäure
RNAasin	Ribonuklease Inhibitor
R.R.R	Rabbit Reticulocyte Lysate
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
t	time
TAE	Tris Aceat EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TB	Trisborat
TBS	Tris gebufferte Salzlösung
TRE	TPA response element
TTP	Thymidintriphosphat
TPA	Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat
U	Units
V	Volt

8 DANKSAGUNGEN

Sehr herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Hiddemann für die Überlassung des interessanten Themas und die umfassende Unterstützung bei der Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Gehrhard Behre, der mich in sein Labor freundlich aufgenommen und die experimentellen Untersuchungen stets kompetent und mit Engagement betreut hat.

Bei den Mitgliedern des Behre-Labors möchte ich mich ebenfalls für die freundliche Aufnahme und die hilfreichen Anregungen bedanken. Besonderer Dank gilt dabei Frau Dr. human. biol. Annika Elsässer, die mich in allen experimentellen Verfahren unterwiesen und unterstützt und durch ihre Anregungen wesentlich an der Entstehung dieser Arbeit mitgewirkt hat.

Marion Heiss-Neumann danke ich besonders für die vielen Anregungen und Korrekturen während der Fertigstellung des Manuskripts.

Eva Maria und Axel Richter danke ich für die rege Anteilnahme an der Entstehung dieser Arbeit.

Meiner Frau danke ich für ihre unendliche Geduld, ihre Unterstützung und für ihr Verständnis während aller Phasen dieser Promotion.

Nicht zuletzt gilt meine größte Dankbarkeit meinen Eltern und Großeltern, die mich immer unterstützt und gefördert haben und ohne die weder mein Studium noch meine Promotion möglich gewesen wären.

9 LEBENSLAUF

30.08.1975	**Michael Franzen**, geboren in München als Sohn von Dipl.-Ing. Uwe und Renate Franzen

Schulausbildung

1982 – 1986	Grundschule an der Feldmochinger Straße, München
1986 – 1995	Wittelsbacher Gymnasium in München
1995	Abitur

Wehrdienst

7/1995 – 4/1996	Grundausbildung beim 8. Sanitäts-Lehr-Bataillon 851, danach Zentralinstitut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr in München

Studium

11/1996 – 04/2003	Studiums der Humanmedizin an der Ludwigs-Maximilians-Universität in München
11/1999	Beginn der Doktorarbeit bei Prof. Dr. Wolfgang Hiddemann, Chefarzt der III. Medizinischen Abteilung des Universitätsklinikums München Großhadern

Beruf

10/2003 – 12/2007	Assistenzarzt in der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik des Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität München
Seit 01/2008	Assistenzarzt in der Universitätsklinik für Innere Medizin I am Landeskrankenhaus Salzburg, Österreich

10 ERKLÄRUNG NACH § 2

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

Das leukämische Fusionsprotein AML1-ETO erhöht die Expression des Transkriptionsfaktors und Protoonkogens c-Jun

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:

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 Bindungsstelle of the c-Jun promoter in an indirect, JNK-dependent manner. Oncogene 2003; 22:5646-5657

München, Juni 2008