

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin A
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. W. E. Berdel -

**Die Rolle von Zyklin D1 in der Pathogenese der
Akuten Myeloischen Leukämie**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster**

**vorgelegt von Anne Julia Kim
aus Münster**

2008

**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. V. Arolt

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. C. Müller-Tidow
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. J. Sindermann

Tag der mündlichen Prüfung: 07.08.2008

**Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin A
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. E. Berdel -**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. C. Müller-Tidow

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Rolle von Zyklin D1 in der Pathogenese der Akuten Myeloischen Leukämie

Anne Julia Kim

Zusammenfassung

Bei der akuten myeloischen Leukämie finden sich gehäuft balancierte Translokationen, die zur Entstehung von Fusionsproteinen führen. Meist sind Transkriptionsfaktoren betroffen, die die myeloische Differenzierung regulieren. Zyklin D1 spielt als Onkogen eine wichtige Rolle in der Pathogenese zahlreicher solider Tumoren, Leukämien und Lymphome. Zyklin D1-überexprimierende Zellen passieren schneller den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase und proliferieren schneller. Eine Induktion von Zyklin D1 durch AML-assoziierte Fusionsproteine über den Wnt-Signalweg konnte bereits gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Wnt-unabhängige Mechanismen der Zyklin D1 Induktion durch AML-assoziierte Fusionsproteine und die sich daraus ergebenden Einflüsse auf die Proliferation myeloischer Zellen untersucht. Zusammenfassend konnte neben einer Wnt-unabhängigen Regulation von Zyklin D1 durch AML1-ETO auch dessen wachstumsfördernde biologische Funktionen im myeloischen Zellsystem charakterisiert werden.

Für meinen Vater

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	4
Inhaltsverzeichnis	
Abkürzungsverzeichnis	
1. Einleitung	
1.1 Akute myeloische Leukämie	8
1.1.1 Einführung	8
1.1.2 Epidemiologie	9
1.1.3 Ätiologie	9
1.1.4 Molekulare Pathogenese	
1.1.5 Klinik	13
1.1.6 Diagnose und Klassifikation	14
1.1.7 Therapie	16
1.2 Zellzyklus und Tumorerkrankungen	16
1.2.1 Zellzyklus	14
1.2.2 Zykline im Zellzyklus	17
1.2.3 Funktion des Zellzyklus in Tumorerkrankungen	19
1.2.4 Die Rolle des Wnt-Signalweg und Zyklin D1	21
1.3 Aufgabenstellung	22
2. Material und Methoden	23
2.1 Zellkulturmedien und Zusätze	23
2.2 Stammlösungen und Puffer	23
2.3 Plasmide	24
2.4 Zelllinien und Transfektionen	25
2.5 Western Blot	27
2.6 RNA Isolation	28
2.7 Herstellung von cDNA	28
2.8 Quantitative Real-Time RT-PCR	29
2.9 Sequenzierung	30
2.10 Chromatin-Immunopräzipitation	31

2.11	Southern Blot	33
2.12	Luziferase Reporter Assays	35
2.13	Kolonie-Assays	37
2.14	³ [H]Thymidin Assays	38
2.15	Zellzyklusanalyse	38
3.	Ergebnisse	40
3.1	Induktion von Zyklin D1 durch die Fusionsproteine	40
3.2	Zyklin D1 Expression in primären AML Blasten	41
3.3	Die Rolle der Punktmutationen im AML1 Gen	42
3.4	Die Bindung von AML1-ETO an den Zyklin D1 Promotor	43
3.5	Aktivierung des Zyklin D1 Promotors durch AML1-ETO	44
3.6	Einfluss der AML1 Mutationen auf den Zyklin D1 Promotor	47
3.7	AML1-ETO aktiviert den Zyklin D1 Promotor unabhängig von der TCF-Bindungsstelle	48
3.8	Zyklin D1 fördert das Koloniewachstum und die Proliferation von 32D Zellen	49
3.9	Zyklin D1 fördert den Übergang von der G1 in die S-Phase	51
4.	Diskussion	53
4.1	Die Induktion von Zyklin D1 durch AML1-ETO	53
4.2	Transkriptionelle Regulation von Zyklin D1 durch AML1-ETO	54
4.3	AML1-ETO bindet und aktiviert den Zyklin D1 Promotor	54
4.4	Rolle der AML1 Mutationen auf die Expression von Zyklin D1	55
4.5	Wnt-unabhängige Expression von Zyklin D1 durch AML1-ETO	56
4.6	Biologische Relevanz von Zyklin D1 für myeloische Zellen	56
4.7	Zusammenfassung und Ausblick	58
5.	Literaturverzeichnis	
6.	Lebenslauf	
7.	Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis:

ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
AML1	acute myeloid leukemia 1
AML1-ETO	Fusionsprotein (AML1/Eight Twenty One)
APL	Akute Promyelozyten Leukämie
ATRA	All Trans Retinoic Acid
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CDK	Zyclin Dependent Kinase
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
CKI	Zyclin-dependent kinase inhibitor
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ERK	Extracellular Signal-Regulation Proteinkinase
F	Forward
FAB	French-American-British
FCS	Fötale Kälberserum
g	gravity
h	Stunde
HDAC	Histondeacetylasen
IU	International Unit
IL-3	Interleukin-3
IMDM Medium	Iscove Modified Dulbecco's Medium
IgG	Immunglobulin G
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MG	Molekulargewicht
MEK	Mitogen Activated Proteinkinase
M	Mol
Mut.	Mutation
NHL	Non Hodgkin Lymphom
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PML-RAR α	Fusionsprotein (Promyelozytenleukämie/Retinsäurerezeptor α)
PLZF-RAR α	Fusionsprotein (Promyelozyten Zinkfinger/ Retinsäurerezeptor α)
R	Reverse
RHD	RUNT Homology Domain
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI Medium	Roswell Park Memorial Institute Medium
RIPA	Radioimmunoprecipitation Puffer
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
μ l	Mikroliter
μ g	Mikrogramm
μ M	Mikromol
WEHI Medium	Überstand der WEHI 3B Zelllinie

1. Einleitung

1.1 Akute myeloische Leukämie

1.1.1 Einführung

Der Begriff Leukämie wurde 1845 von dem Pathologen Rudolf Virchow geprägt, bedeutet „Weißblütigkeit“ und bezieht sich auf die verbreiterte Leukozytenmanschette nach Zentrifugation des Blutes bei Patienten mit hohen Leukozytenzahlen.

Bei der physiologischen Blutbildung entwickeln sich die Vorläuferzellen im Knochenmark zunächst zu reifen Blutzellen und werden erst dann ins Blut ausgeschwemmt. Man unterscheidet bei der Hämatopoese die Erythropoese (Heranreifen der Erythrozyten), Megakaryopoese (Heranreifen der Thrombozyten), die Myelopoese (Heranreifen von Monozyten und Granulozyten) und die Lymphopoese (Heranreifen von Lymphozyten).

Der Anteil an blastären Zellen im normalen Knochenmark beträgt deshalb nicht mehr als 5%.

Bei der akuten myeloischen Leukämie handelt es sich um eine maligne Erkrankung des blutbildenden Systems: myeloische Vorläuferzellen vermehren sich ungehindert ohne auszureifen und verdrängen die normale Hämatopoese im Knochenmark. Die Folge sind Anämie, Thrombozytopenie und Granulozytopenie. Die leukämischen Zellen (auch Blasten genannt) zeichnen sich dadurch aus, dass sie die Fähigkeit zur Differenzierung verloren haben, jedoch stark proliferieren und vor Apoptose geschützt sind. Diese Merkmale sind auch für zahlreiche andere Tumorentitäten gezeigt [25]. Die Tumorzellen bleiben von den normalen Regulationsmechanismen unbeeinflusst.

1.1.2 Epidemiologie

Die akute myeloische Leukämie (AML) macht ca. 80% der akuten Leukämien im Erwachsenenalter und etwa 15-20% der akuten Leukämien im Kindesalter aus, wobei sie bei Männern etwas häufiger auftritt als bei Frauen [83].

Die Inzidenz der AML ist altersabhängig. Während sie ab der Adoleszenz nur langsam zunimmt, findet sich ab einem Alter von 45 Jahren ein steiler Anstieg des Auftretens der AML. Die altersspezifische Inzidenz beläuft sich jährlich auf 3,5 pro 100.000 bei Erwachsenen bis zu einem Alter von 45 Jahren und steigt auf 15 bei einem Alter von 70 Jahren und gar auf 35 bei einem Alter von 90 Jahren an. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung einer AML beträgt 63 Jahre, so dass die AML insgesamt eine Erkrankung des älteren Menschen ist.

1.1.3 Ätiologie

Bei der überwiegenden Zahl der Erkrankungen bleibt die Ätiologie ungeklärt. In den epidemiologischen Untersuchungen der letzten Jahre konnten aber einige Faktoren identifiziert werden, die als Auslöser der akuten myeloischen Leukämie gelten. So sind Benzole ein arbeitsmedizinisch relevanter Faktor [1]. Auch Zytostatika gelten als Risikofaktoren wie z.B. Alkylanzien (durchschnittlich 4-6 Jahre nach Exposition) und Topoisomerase II-Inhibitoren (durchschnittlich 1-3 Jahre nach Exposition).

Seit den Atombombenabwürfen auf Hiroshima und Nagasaki ist radioaktive Strahlenexposition als Risikofaktor bekannt [29]. Röntgenstrahlenexposition [46] und langjähriges Zigarettenrauchen [66] wurden ebenfalls als ätiologisch bedeutsame Faktoren identifiziert.

1.1.4 Molekulare Pathogenese der AML

Die normale Blutbildung ist ein dynamischer, streng regulierter Prozess. Durch das Zusammenspiel von Wachstums- und Transkriptionsfaktoren wird die Proliferation und Differenzierung der einzelnen Linien der Hämatopoese reguliert.

Für die Entstehung der AML sind nach dem derzeitigen Forschungsstand mindestens zwei genetische Veränderungen wichtig, die allerdings nicht strikt

voneinander getrennt zu sehen sind, sondern bei denen immer mehr Interaktionen nachgewiesen werden können. Zum einen finden sich chromosomale Translokationen von Transkriptionsfaktoren (wie z.B. AML1-ETO) [43, 73], zum anderen Mutationen in Signaltransduktionswegen (z.B. Flt3-ITD) [85]. Es wird postuliert, dass Erstere die Differenzierung der AML Blasten blockieren, während Letztere zu einer abnorm hohen Proliferationsrate und zu einer ausgeprägten Apoptoseresistenz der diese Mutation tragenden Zellen führen. Es ist gezeigt worden, dass die Translokation t(8;21) mit der Entstehung des Fusionsproteins AML1-ETO mit 12% der akuten myeloischen Leukämien assoziiert ist [57]. Die balancierten, chromosomalen Translokationen führen zur Expression von Fusionsproteinen an denen Transkriptionsfaktoren beteiligt sind (AML1-ETO und PML-RAR α) [52]. Dadurch wird in vielen Fällen die Funktion dieser Transkriptionsfaktoren verändert.

1.1.4.1 Leukämogene Fusionsproteine in der Pathogenese der AML

Wie beschrieben finden sich in AML-Blasten häufig balancierte Translokationen. Die Translokationen verändern in vielen Fällen die Funktion von Transkriptionsfaktoren. Häufig fusionieren die DNA-Bindungsdomänen von Faktoren, die physiologischerweise die Transkription aktivieren, unter Verlust ihrer aktivierenden Teile mit Proteindomänen anderer Proteine, die die Transkription reprimieren können.

Drei bekannte Fusionsproteine entstehen durch die Translokation t(8;21) mit dem Fusionsprotein AML1-ETO, die Translokation t(15;17) mit dem Fusionsprotein PML-RAR α und die Translokation t(11;17) mit dem Fusionsprotein PLZF-RAR α . Die Translokation t(8;21) wurde erstmals 1973 von Dr. Janet Rowley identifiziert. Die beiden beteiligten Gene AML1 und ETO wurden allerdings erst in den frühen 90-iger Jahren von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben [17,50,12,13,55,70].

Veränderungen im Bereich des Core Binding Transcription Factors (CBF)

AML1 ist ein Transkriptionsfaktor der zur RUNX Proteinfamilie gehört und dessen Genlokus auf Chromosom 21 liegt. Diese Proteine zeichnen sich durch eine „RUNT homology“ Bindungsdomäne (RHD) aus, die an eine spezifische „core Enhancer“ Sequenz (TGT/cGGT) bindet [34]. Aufgrund dieser DNA bindenden Domäne wird AML1 auch CBFA2 (core-binding-factor), CBF α , RUNX1 oder PEBP2 α B genannt. Mit einer zweiten Untereinheit, dem CBF β , für den ein Genlokus auf Chromosom 16 (16q22)CBF β kodiert, bildet AML1 das Heterodimer CBF α / β . Dadurch wird die Affinität zur Bindung an die DNA erhöht. In normalen hämatopoetischen Zellen reguliert CBF α / β die Transkription wichtiger Gene für die Hämatopoese, wie Interleukin-1 und -3, GM-CSF (granulocytes macrophage colony stimulating factor), Myeloperoxidase, BCL-2 (B cell/CLL/Lymphoma 2) oder auch das Multidrug Resistance Gen (mdr 1) [11]. AML1 wird in hämatopoetischen Zellen exprimiert. Es ist aber auch in Nervengewebe, Testis, Ovar oder Skelettmuskel vorhanden [77].

ETO (auch MTG8) ist ein transkriptioneller Regulator, der zur ETO Proteinfamilie gehört. Diese umfasst außerdem ETO2 (MTG16) und MTGR1 [36]. ETO wird von einem Gen auf Chromosom 8 kodiert und ist ein nukleäres Zink-Finger Protein, das selbst nicht direkt an die DNA binden kann [10]. Die Mitglieder der ETO Familie bilden Homo- und Heterodimere und treten in Wechselwirkung mit nukleären Ko-Repressoren wie N-CoR oder Sin3a. Diese können aktive Histondeacetylasen (HDACs) binden. Durch die Histondeacetylasen werden Acetylgruppen von Lysinresten der Histone im Nukleosom abgespalten. Dies bewirkt eine Konformationsänderung der Chromatinstruktur, durch die die DNA unzugänglich für die Transkription wird [24].

Aufgrund der Translokation t(8;21)(q22;q22)-AML1-ETO wird der N-terminale Anteil einschließlich der DNA-Bindungsdomäne von AML1 (auch bekannt als RUNX1, CBPa2) von Chromosom 21 mit dem C-terminalen Anteil

von ETO („eight twenty one“ oder MTG8) auf Chromosom 21, einem Zink bindenden Protein fusioniert [48,41]. Das so entstandene Fusionsprotein AML1-ETO bindet zwar an dieselbe Stelle wie der normale CBF α / β Komplex, kann aber die Transkription der Zielgene nicht aktivieren, sondern wirkt durch ETO als transkriptioneller Repressor. Somit agiert dieses Fusionsprotein als dominanter Repressor der Funktion von CBF α / β [15,16,3]. Dies führt zu einer fehlenden Expression von Genen für die normale myeloische Differenzierung. Der CBF Komplex wird durch die Translokation t(8;21), die Inversion inv(16) und die Translokation t(16;16) gespalten. Zusammengefasst findet man diese in 25% der AML Fälle [38,39].

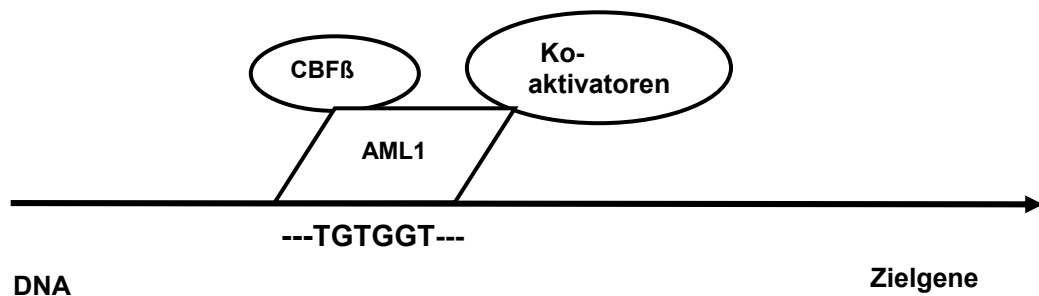


Abbildung 1: In normalen hämatopoetischen Zellen bindet das Heterodimer CBF α / β an die Promotor-DNA und die AML1 regulierten Zielgene können durch die Anlagerung von Ko-Aktivatoren abgelesen werden

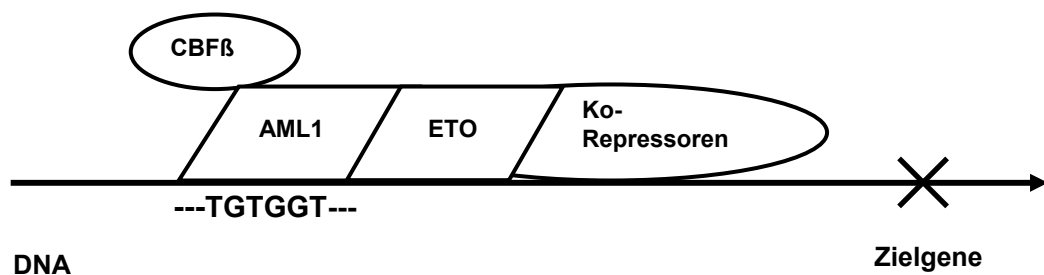


Abbildung 2: Das Fusionsprotein AML1-ETO aktiviert Korepressoren. Die DNA kann nicht mehr abgelesen werden, Zielgene werden nicht exprimiert.

Die Translokationen t(15;17) und t(11;17) betreffen Veränderungen des Retinolsäure- Rezeptors, der eine Schlüsselrolle in der myeloischen Differenzierung einnimmt [47].

Bei der Translokation t(15;17) verschmilzt das PML-Gen (Promyelozytenleukämie Gen) von Chromosom 15 mit dem RAR α Gen auf Chromosom 17. Dieses chimäre Fusionsprotein findet man bei über 90% der Patienten mit akuter Promyelozyten Leukämie (APL) (M3) [22].

Als sehr seltene chromosomale Anomalie ist die Translokation t(11;17) anzusehen, bei der das PLZF-Gen (promyelocytic leukemia zink finger) von Chromosom 11 mit dem RAR- α -Gen fusioniert. Auch dieses Fusionsprotein ist mit der akuten Promyelozytenleukämie assoziiert [71]. Phänotypisch unterscheiden sich die beiden Translokationen nicht bis auf ihr therapeutisch ausgenutztes Ansprechen auf Retinolsäure. Durch Gabe von ATRA (All-Trans-Retinoic-Acid) können die leukämischen Blasten, die PML- RAR α exprimieren, differenzieren und die Patienten in eine Remission gebracht werden [27,75]. Demgegenüber sprechen PLZF-RAR α positive Blasten nicht auf die Behandlung mit ATRA an.

1.1.4.2 AML1 Mutationen

Die Funktion von AML1 wird nicht nur durch chromosomale Translokationen beeinflusst, sondern es sind darüber hinaus weitere somatische Mutationen des AML1 Gens entdeckt worden. Eine dieser Mutationen betrifft die so genannte RUNT Domäne, die die Bindungsstelle für die DNA und für den CBF β bildet. Diese ist vor allem mit der AML FAB M0 assoziiert, einer sehr undifferenzierten AML Form [40]. Auch die familiär bedingte Thrombozytopenie, ein genetisches Syndrom, bei dem eines der beiden AML1 Gene defekt ist, ist mit einem erhöhten Auftreten der AML assoziiert [62].

1.1.5 Klinik

Die Symptomatik ist bestimmt von Abgeschlagenheit und Müdigkeit, wobei diese Symptome zum großen Teil als Folge der entstehenden Anämie zu deuten sind. Bei der körperlichen Untersuchung können Petechien und andere Blutungszeichen (z.B. Zahnfleischblutung, Nasenbluten, gastrointestinale Blutungen) als Ausdruck der Thrombozytopenie auftreten. Ein Teil der Patienten hat eine Splenomegalie und in einigen Fällen zeigt sich eine Vergrößerung von Lymphknoten. Selten findet sich eine Gingivahyperplasie und eine Facies leontina (durch Hautinfiltrationen im Gesicht).

Im Blutausstrich finden sich Blasten und eine erhebliche Verringerung der drei Blutbildungsreihen bis zur Panzytopenie. Im Knochenmark und im peripheren Blutbild zeigt sich charakteristisch zwischen den überwiegenden Blasten und der ausreifenden Granulopoese eine Reifungslücke, der „Hiatus leukaemicus“.

1.1.6 Diagnose und Klassifikation

Die Einteilung der AML erfolgt nach morphologischen und zytochemischen Merkmalen nach der FAB (French-American-British Group)-Klassifikation und unterscheidet insgesamt 9 Untergruppen.

FAB-Klassifikation der Akuten Myeloischen Leukämie							
FAB	Name	Häufigkeit	MPO	NBE	PAS	Assoziierte Translokationen	beteiligte Gene
M0	Akute myeloische Leukämie, minimal differenziert	3%	-	-	-	inv(3q26), t(3;3) (1%)	EVI1
M1	Akute Myeloblastenleukämie		+/-	-	-		
M2	Akute Myeloblastenleukämie mit Ausreifung	25-30%	++	-	-	t(8;21) (40%)	AML1/ETO
M3	Akute Promyelozytenleukämie	5-10%	+++	-	+/-	t(6;9) (1%) t(15;17) (98%)	DEK/CAN PML/RAR α
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie	20%	+++	++	-	t(11;17) (1%) t(5;17) (1%) 11q23 (20%)	PLZF/RAR α NPM/RAR α MLL
M4eo	Akute myelomonozytäre Leukämie mit abnormen Eosinophilen	5-10%	+++	++	-	inv(3q26), t(3;3) (3%) t(6;9) (1%) inv(16), t(16;16) (80%)	EVI1 DEK/CAN CBFB/MYH11
M5	Akute Monozytenleukämie	2-9%	+/-	+++	+/-	11q23 (20%)	MLL

M6	Erythroleukämie	3-5%	-	-	+++	t(8;16) (2%)	MOZ/CBP
M7	Akute Megakaryozytenleukämie	3-12%	-	-	++	t(1;22) (5%)	unbekannt

Tabelle 1: FAB-Klassifikation der AML; MPO=Myeloperoxidase; NBE=N-Butylazetat-Esterase (unspezifisch); PAS=Periodic-acid Schiff

WHO-Klassifikation der Akuten Myeloische Leukämie:	
AML mit rekurrenten Translokationen	
	AML mit t(8;21)(q22;q22), AML1/ETO
	Akute Promyelozytenleukämie (AML mit t(15;17)(q22;q11-22) und Varianten, PML/RAR α)
	AML mit abnormen Eosinophilen im Knochenmark (inv(16)(p13q22) oder t(16;16)(p13;q11), CBF β /MYH11)
	AML mit 11q23 (MLL)-Abnormalitäten
AML mit Dysplasie in mehreren Linien	
	mit vorangegangenem MDS
	ohne vorangegangenes MDS
Therapieassoziierte AML und myelodysplastische Syndrome	
	Alkylantien-induziert
	Epipodophyllotoxin-induziert
	Andere
AML uncharakterisiert	
	Minimal differenzierte AML
	AML ohne Reifungszeichen
	AML mit Ausreifung
	Akute myelomonozytäre Leukämie
	Akute monozytäre Leukämie
	Akute erythroide Leukämie
	Akute megakaryozytäre Leukämie
	Akute Basophilenleukämie
	Akute Panmyelose mit Myelofibrose
	Akute biphänotypische Leukämien

Tabelle 2: WHO-Klassifikation der AML

Mit den morphologischen Unterscheidungen der FAB-Klassifikation sind bestimmte zytogenetische Veränderungen assoziiert. Es finden sich häufig Aberrationen von Transkriptionsfaktoren in AML-Blasten [43]. Insbesondere kommen sogenannte balancierte Translokationen vor, die zur Expression von Fusionsproteinen führen an denen Transkriptionsfaktoren beteiligt sind [64].

1.1.7 Therapie

Die Behandlung der AML besteht im Wesentlichen aus zwei Säulen, zum einen aus einer antileukämischen Therapie und zum anderen aus einer supportiven Therapie. Um die malignen Zellen zu vernichten und die normale Hämatopoese wiederherzustellen wird eine myelosuppressive Chemotherapie durchgeführt, die sich an aktuellen Studienprotokollen orientieren sollte. Erstes Ziel einer AML Therapie ist die Induktion einer kompletten Remission. Diese ist nach Definition erreicht, wenn sich im Knochenmark weniger als 5% Blasten befinden und sich das periphere Blutbild wieder normalisiert hat. Außerdem dürfen keine extramedullären Herde mehr nachweisbar sein.

In einer sich anschließenden Postremissionstherapie sollen alle noch verbliebenen malignen Zellen eliminiert werden [6]. Diese Konsolidierungstherapie verringert die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs und kann entweder durch eine weitere Chemotherapie oder eine autologe Stammzelltransplantation erfolgen. Bei jungen Patienten im Rezidiv oder bei Patienten mit Familienspender wird eine allogene Knochenmark- oder Stammzelltransplantation durchgeführt. Die AML ist somit eine Erkrankung, die zumeist in spezialisierten Zentren behandelt wird.

1.2 Zellzyklus und Tumorerkrankungen

1.2.1 Zellzyklus

Um sich zu teilen durchlaufen Zellen den Zellzyklus, der sich aus vier aufeinander folgenden Phasen zusammensetzt: G1, S, G2 und M-Phase [68]. Das Fortschreiten einer Zelle aus der G0-Ruhephase in die G1-Phase (Gap-Phase 1) des Zellzyklus und aus der G1-Phase in die S-Phase wird durch den G1-Restriktionspunkt in der späten G1-Phase reguliert. Ist dieser Kontrollmechanismus durch physiologische Stimuli, wie z.B. Wachstumsfaktoren oder Deregulation von Kontrollgenen (in Tumorzellen) aufgehoben, dann geht die Zelle ungebremst in die S-Phase über und beginnt mit der DNA-Synthese [67]. Ist die S-Phase abgeschlossen, gelangt die Zelle nach Durchlaufen der G2-Phase, in der die Segregation der replizierten DNA vorbereitet wird, in die M-Phase, die Mitose. Die Zellteilung wird im Anschluss beendet und die aus der Mitose hervorgegangenen Tochterzellen befinden sich nun wieder in der G1-Phase. Neben dem G1-Restriktionspunkt gibt es im Verlauf des Zellzyklus zusätzliche Checkpunkte, die die Entwicklung der Zelle durch jede der Phasen des Zellzyklus kontrollieren. Einer dieser Punkte liegt in der späten G2-Phase (G2/M-Kontrollpunkt), weitere in der S- und in der M-Phase.

1.2.2 Zykline im Zellzyklus

Zykline sind Proteine, die phasenspezifisch im Zellzyklus synthetisiert werden [49]. Als regulatorische Einheit binden sie an Enzyme, die CDKs (Zykin dependent kinases) [31]. In der G1 Phase wird zuerst Zykin D gebildet. Es gibt drei Typen von D-Zyklinen: Zykin D1, D2 und D3. In der darauf folgenden S Phase sind die Zykline E und A vorherrschend und in der G2 Phase die Zykline A und B. Zykin D bildet Komplexe mit den CDK 4 und 6, Zykin E und A mit CDK2 und Zykin A und B mit CDK1. Dabei sind vor allem die Zykin D Komplexe durch Wachstumsfaktoren reguliert und integrieren so Signale, die von außen an die Zelle gelangen, in zellzyklusrelevante Aktivitäten. Werden ruhende Zellen durch proliferationsaktivierende Signale wie z.B. über die Ras-

Aktivierung und die MAP-Kinase Kaskade [44] stimuliert, erfolgt die Regulation der initialen Schritte der Zellvermehrung und der Eintritt in die S-Phase durch D-Typ Zykline (Zyclin D1, D2 und D3) und ihre katalytischen Partner CDK4 und CDK6.

CDKs sind Kinasen, die kontinuierlich exprimiert werden und ihre Substrate an Serin- und Threoninresten phosphorylieren [69]. Durch die Bindung von Zyklinen werden sie aktiviert. Zyclin-CDK Komplexe vermitteln dann die Phosphorylierung von Rb. Rb ist ein Tumorsuppressorprotein und nimmt im Zellzyklus eine wichtige Steuerungsfunktion ein. Die Zellzyklus-kontrollierende Funktion des hypophosphorylierten Rb Proteins beruht auf seiner Fähigkeit reversibel an Transkriptionsfaktoren wie z.B. E2F (s.u.) zu binden [32]. Diese Bindung verhindert, dass E2F die Induktion von Genen aktiviert, deren Proteinprodukte für die DNA-Replikation in der S-Phase essentiell sind.

Nach mitogener Stimulation wird Rb am Restriktionspunkt zuerst durch Zyclin D/CDK4 und CDK6 und in einem zweiten Schritt durch Zyclin E/CDK2 phosphoryliert [80,35]. Durch die mehrfachen Phosphorylierungen wird es von seiner hypophosphorylierten in eine hyperphosphorylierte Form überführt und somit inaktiviert. Die Bindung von pRb an E2F wird durch den Phosphorylierungsstatus von pRb reguliert (s.u.) [76,33]. Nach der Phosphorylierung von Rb wird E2F aus der Bindung mit Rb herausgelöst und kann jetzt Gene aktivieren, die die S-Phase Progression auslösen. Das Rb Protein wird synonym auch als „pocket protein“ bezeichnet, weil es eine Bindungstasche für Transkriptionsfaktoren trägt [8].

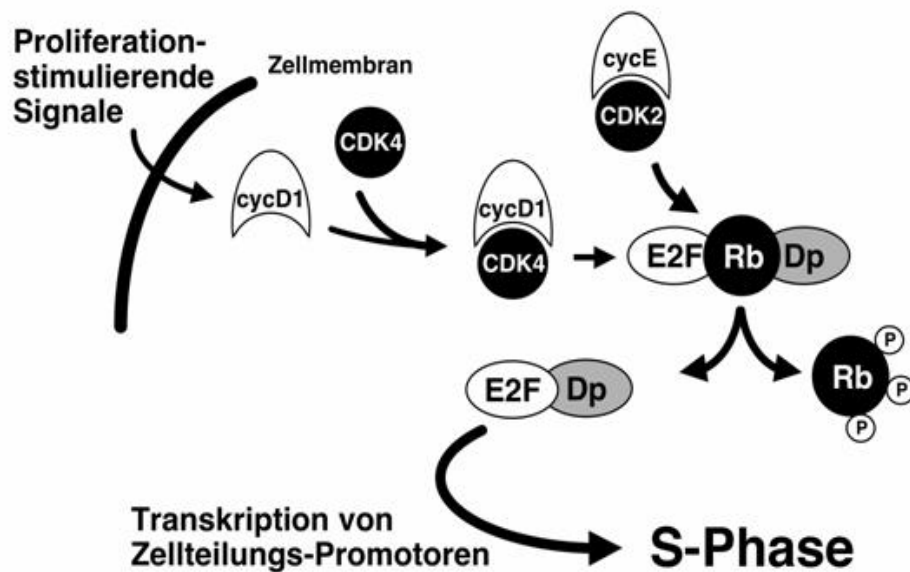


Abbildung 3: Regulation der Rb-E2F Interaktion am G1/S Checkpoint (Johnson, D. G. and Schneider-Broussard, R. (1998): Role of E2F in cell cycle control and cancer, Front Biosci, (vol. 3), d447-8.)

Dieser Vorgang ist die Voraussetzung, um den G1/S Übergang zu überschreiten [18]. Der basalen Kontrolle durch die Verfügbarkeit einzelner Zykline sind weitere Regulationsmechanismen übergeordnet. Dabei spielen außer den aktivierenden und inhibierenden Phosphorylierungen der CDK auch die Interaktion der Zyklin/CDK-Komplexe mit Zyklin/CDK Inhibitoren eine wichtige Rolle. Durch die Aktivität bestimmter Inhibitoren, den CKIs können die CDKs negativ reguliert werden. Dabei spielen zwei verschiedene Untergruppen von CKIs eine wesentliche Rolle: zur CIP/KIP Gruppe (CDK inhibiting protein/kinase inhibiting protein) gehören $p21^{Waf1/Cip1}$, $p27^{Kip1}$ und $p57^{Kip2}$. Diese Gruppe hemmt CDK2. Die INK4 Untergruppe (**Inhibiert CDK4**) hemmt speziell CDK4 und CDK6. Zu ihr gehören $p16^{INK4a}$, $p15^{INK4b}$, $p18^{INK4c}$ und $p14^{INK4d}$ [63].

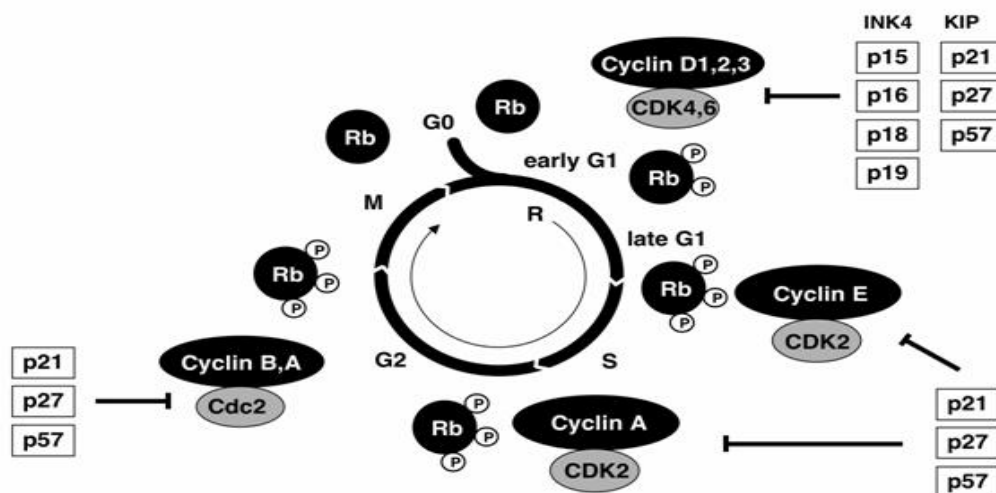


Abbildung 4: Zellzykluskontrolle durch Zykline, CDKs und Inhibitoren von CDKs.

Roussel, M. F. (1999): The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer, *Oncogene*, (vol. 18), No. 38, 5311-7.

1.2.3 Funktion des Zellzyklus in Tumorerkrankungen

Tumorerkrankungen liegen genetische Defekte zu Grunde, die zur malignen Transformation und letztlich zur Ausbildung eines malignen Tumors führen [25]. Wichtige Schritte in der malignen Transformation sind die gesteigerte Proliferation, der Schutz vor Apoptose und eine blockierte Differenzierung. Die Proliferation von Zellen wird maßgeblich durch den Zellzyklus kontrolliert. Er ist ein häufiges Ziel von Onkogenen und mutierten Tumorsuppressorgenen in der Pathogenese von Tumorerkrankungen [56]. Störungen der Zellzyklusregulation in Tumorzellen treten vor allem am G1/S-Phasenübergang auf. Neben dem Verlust von Tumorsuppressorgenen z.B. durch Deletion oder Methylierung der Promotorregion (Rb, p16^{ink4a}, etc.) werden Mutationen und Überexpression von Onkogenen beobachtet (CDK4, Zyklin D1, Zyklin E). Vermutlich benötigt jede maligne Erkrankung Alterationen im Zellzyklus für ihre Entstehung [69]. Zahlreiche Mechanismen der Zellzyklusregulation in eukaryonten Zellen wurden in den letzten Jahrzehnten entdeckt.

Zyclin D1 in Tumorzellen

Die Überexpression von Zyclin D1 führt zu einer vermehrten Inaktivierung von Rb und somit zu einem schnelleren Übertritt in die S-Phase und zu gesteigerter Proliferation.

Der Zellzyklus-Regulator Zyclin D1 ist ein bedeutendes Onkogen in der Pathogenese verschiedener Krebserkrankungen. So wurde eine Überexpression von Zyclin D1 für das Mantelzelllymphom, Kopf-und Hals-Tumoren, das Mamma-Karzinom, das Kolon-Karzinom, das Multiple Myelom und das Blasen-Karzinom beschrieben [9,54,4,19,79,42,84]. Seine Funktion als wichtiges Onkogen [37] in der malignen Transformation bei soliden Tumoren und Lymphomen ist bereits mehrfach gezeigt worden. Bei Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie (CLL), mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) und mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) ist eine erhöhte Zyclin D1 Expression in Patientenblasten beschrieben worden [30]. Insbesondere für das Mantelzelllymphom, ein spezielles Non-Hodgkin Lymphom, ist ein pathogenetischer Zusammenhang schon länger bekannt [65,82]. Charakteristisch für dieses Lymphom ist die Translokation $t(11;14)(q13;q32)$, die dazu führt, dass Zyclin D1 unter der Kontrolle des Promotors der Immunglobulin-Schwerkette exprimiert wird. Diese Umlagerung führt zu einer Überexpression von Zyclin D1 [60]. Allerdings wurden in der überwiegenden Mehrzahl aller Fälle sekundäre genetische Alterationen festgestellt. So wurde gezeigt, dass die p53- und p16-Gencluster (p15INK4B, p16INK4A, und p14ARF) häufig an der sekundären Transformation zu aggressiven Mantelzelllymphom-Varianten beteiligt sind [28].

Regulation von Zyclin D1

Zyclin D1 unterliegt einer strengen Kontrolle durch Wachstumsfaktoren. Dadurch werden Signale, die von außen an die Zelle getragen werden in zellzyklusrelevante Aktivität umgesetzt.

Ein Beispiel ist die Ras/Raf/MAPK-Signalkaskade, bei der über ein mitogen induziertes Ras Signal die Transkription des Zyclin D1 Gens über eine Kaskade unterschiedlicher Kinasen gefördert wird, die von der sequenziellen

Aktivität von Raf-1, MEK1 und MEK2 (mitogen activated protein kinase) und ERKs (extracellular signal-regulated protein kinases) abhängig ist [2,81].

Neben der transkriptionellen Regulation von Zyklin D1 ist auch eine translationelle Regulation der Höhe von Zyklin D1 über Effektoren des PI3-Kinase/Akt Signaltransduktionsweg bekannt [7]. Über diesen Signalweg wird mTOR reguliert, welches 4E-BP inhibiert und als Folge davon die Aktivität von eIF4E erhöht. Der genaue Regulationsmechanismus ist derzeit noch nicht geklärt. eIF4F ist ein trimerischer Komplex der „eukaryotic initiation factors“ (eIFs), der aus dem cap-binding protein eIF4E, dem scaffold Protein eIF4G und der Helikase eIF4A besteht. Dieser Komplex ist notwendig, um das Ribosom zur mRNA zu rekrutieren [21]. Aktiviertes eIF4F kann über den PI3-Kinase/Akt Signaltransduktionsweg die Höhe von Zyklin D1 auf translationeller Ebene regulieren [61]. Dabei kann die Inhibition von mTOR die Translation von Zyklin D1 hemmen.

1.2.4 Die Rolle des Wnt-Signalweg und Zyklin D1

Für die AML konnte eine Induktion von Zyklin D1 durch AML1-ETO über die Aktivierung des Wnt-Signalwegs nachgewiesen werden [53]. Dieser Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese verschiedener Tumoren. Am besten untersucht ist er in der Entstehung des Kolonkarzinoms [59, 78, 58, 26]. Über den Wnt-Signalweg induziert AML1-ETO über Plakoglobin (Gamma-Catenin) die Bildung von Zyklin D1 und c-myc. Plakoglobin ist ein Strukturprotein, das in der Organisation von Zellkontakten wichtig ist und auch im Wnt-Signalweg eine wichtige Funktion einnimmt [86].

1.2 Aufgabenstellung:

Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Bedeutung von Zyklin D1 für die Pathogenese der akuten myeloischen Leukämie (AML) auf transkriptioneller Ebene zu analysieren. Ein Einfluss von Zyklin D1 auf die Entstehung verschiedener anderer Tumoren ist bereits bekannt. Für myeloische Zellen und die AML ist die Regulation und der Einfluss von Zyklin D1 auf Proliferation und Transformation nicht detailliert untersucht. Daher sollten in dieser Arbeit folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- **Induziert AML1-ETO die Expression von Zyklin D1 außerhalb der bekannten Aktivierung über den Wnt-Signalweg?**
- **Wird der Zyklin D1 Promotor direkt durch AML1/ETO reguliert?**
- **Welche Promotorregion ist für diese Regulation verantwortlich?**
- **Welchen Einfluss haben identifizierte AML1 Mutationen auf die transkriptionelle Regulation von Zyklin D1?**
- **Wie reguliert Zyklin D1 Proliferation und Transformation von myeloischen Zellen?**
- **Wie reguliert Zyklin D1 den Zellzyklus von myeloischen Zellen?**

2. Material und Methoden

2.1 Zellkulturmedien und Zusätze:

Die einzelnen Zelllinien wurden in unterschiedlichen Kulturmedien mit verschiedenen Zusätzen kultiviert.

Zellkulturmedien:

RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institut) (GIBCO BRL)

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (GIBCO BRL)

IMDM (Iscove Modified Dulbecco's Medium) (GIBCO BRL)

Zellkulturzusätze:

Trypsin (Firma Bio Whittaker Europe, Belgien)

Penicillin/Streptomycin (Firma PAA Laboratories GmbH, Österreich)

Fötale Kälberserum: (Firma Bio Chrom AG, Berlin)

WEHI (Überstand der WEHI 3 B Zelllinie)

L-Glutamin (Firma Bio Whittaker Europe, Belgien)

G418 (Neomycin): (Firma: CalBioChem)

Puromycin

Doxyzyklin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

2.2 Stammlösungen und Puffer:

TRIZOL Reagent (GIBCO Life Technologies, Gaithersburg, USA)

Chloroform (Merck KGaA, Darmstadt)

Isopropanol (Apotheke des Universitätsklinikum Münster)

TaqMan PCR Mastermix 2x (PE Applied Biosystems, USA)

Taq Man Primer und Sonden (PE Applied Biosystems, USA)

MMLV-RT 5x Reaction Buffer (Promega, Madison, USA)

MMLV-RT 200 (Promega, Madison, USA)

Oligo-d(T)-Primer, GIBCO BRL, Gaithersburg, USA

RNAse OUT Ribonuklease Inhibitor (Invitrogen life technologies)

dNTP's (Invitrogen life technologies)

RIPA Lysepuffer: NaCl (150mM), NP 40 (1%), DOC (0.5%), SDS (0.1%), Tris (pH 8.0) (50mM)

PBS Puffer: NaCl (8g), KCl (0.2g), KH_2PO_4 (0.25g), Na_2HPO_4 (1.35g), Na_2HPO_4 (1.35g), ddH₂O ad 1l (pH 7.4)

Gel Running Buffer (10x): Tris Base (MG 121.1) 30.3g, Glycin (MG 75.07) 144.2g, SDS 100g, ddH₂O add 1l

Transfer Buffer (1x): Tris Base (MG 121.1) 3.03g, Glycin (MG 75.07) 14.41g, Methanol 200ml, ddH₂O 800ml

PBS-T: PBS Puffer 500ml, Tween20 500ul

Blocking Buffer: Trockenmilch 5g, PBS-T 100ml

TAE Puffer (50x): Tris (2M), Eisessig (0.91M), EDTA (100mM), pH 8.3

Ethidiumbromid Färbebad: 10µg/ml in TAE Puffer

2.3 Plasmide:

Der Leervektor pcDNA3.1+ (Invitrogen, Karlsruhe) ist ein 3.5 kb großes Plasmid mit einem CMV Promotor zur Expression rekombinanter DNA in eukaryontischen Zellen. Da er eine Neomycinresistenz-Resistenzkassette enthält, diente er als Resistenzfaktor gegen das Antibiotikum G418. Der Vektor pMAM (Clontech, Heidelberg) wurde als Resistenzfaktor gegen das Antibiotikum Blastocidin verwendet. Er ist 7.6 kb groß und enthält den MMTV-LTR Promotor.

Verschieden lange Fragmente des humanen Zyklin D1 Promotors (-1748/+134 BP, -962/+134 BP, -261/+55BP, -217/+55BP, -176/+55BP und -112/+55BP) wurden in den pGL3-Basic + Thymidinkinase Luciferase Reporter Vektor kloniert. Der PGL3basic Luciferase Reporter Vektor (Promega, Madison, USA) ist ca. 4.8kbp groß und enthält keinen eukaryotischen Promotor oder Enhancersequenzen. Seine Klonierungsstelle liegt oberhalb der cDNA-Sequenz der firefly Luciferase (Luc+). Durch Einbringen eines Promotors lässt sich dessen Aktivität über die Luciferase Aktivität bestimmen, da die Expression der firefly Luciferase unter seiner Kontrolle steht. Als Kontrollvektor zur Transfektionseffizienz diente ein Vektor (SV pRL; Promega), bei dem die Renilla- Luciferase (*renilla reniformis*) unter der Kontrolle eines SV-Promotors steht. AML1-ETO wurde in den Expressionsvektor pcDNA3.1+ subkloniert.

Ein Expressionskonstrukt für Zyklin D1 ohne G418-Resistenz sowie die für die Luziferase Assays benutzten Promoterfragmente des Zyklin D1 Promotors lagen in unserem Labor vor.

2.4 Zelllinien und Transfektionen:

Die humanen myeloischen Zelllinien U937, NB4, KCL 22 und Kasumi-1 wurden in RPMI 1640 Medium mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) mit 1% L-Glutamin und mit Antibiotika (Penicillin 100 IU/ml, Streptomycin 10µg/ml) kultiviert. Die Zink-induzierbaren stabil transfizierten Zelllinien U937 mit AML1-ETO, U937 mit PML RAR α , U937 mit PLZF-RAR α wurden in RPMI 1640 mit 10% fötalem Kälberserum, Penicillin (50 IU/ml) und Streptomycin (50µg/ml) in Kultur gehalten. Durch Zugabe von 0.1mM ZnSO₄ konnten die Fusionsproteine nach 12 h induziert werden.

Die Tetrazyklin-regulierte U937 Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. Dong-ER Zhang (University of California, San Diego) zur Verfügung gestellt.

Das Tet-Off System ist ein regulierbares Expressionssystem, das 1992 von Gossen und Bujard [23] entwickelt wurde. Das ursprüngliche System besteht aus einem Tetrazyklin regulierbaren Transaktivator und aus einem von diesem abhängigen Promotor. Dieser Promotor setzt sich zusammen aus Kopien des Tet-Repressor DNA Bindungsmotivs (TRE) aus E.coli und dem minimalen CMV Promotor. Der Transaktivator (tTA) ist ein chimäres Protein, das sich aus der viralen Transaktivierungsdomäne VP16 des Herpes simplex Virus und der Tetrazyklin-Repressor-Domäne (tetR) aus E.coli zusammensetzt. Er kann direkt über die Zugabe von Tetrazyklin reguliert werden: In Abwesenheit von Tetrazyklin (bzw. seines Analogons Doxycyclin) ist tTA in der Lage, spezifisch an den TRE zu binden und so die Transkription des benötigten Transgens zu aktivieren. In Gegenwart von Tet kommt es zu einer Konformationsänderung des Transaktivators (tTA). Dadurch wird das Anbinden von tTA an das TRE verhindert und der CMV Promotor besitzt nur eine niedrige Aktivität. Dies führt dazu, daß die Genexpression des Transgens zum Erliegen kommt. Der Übergang vom induzierten in den reprimierten Zustand durch Weglassen oder Zugabe durch Tetrazyklin ist reversibel.

In den von mir verwandten Zellen konnte durch das Weglassen von Tetrazyklin für 24 h AML1-ETO induziert werden.

Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit 10% fetalem Kälberserum mit 1% L-Glutamin und den Antibiotika Penicillin 100 IU/ml, Streptomycin 10 µg/ml, Geneticin 1mg/ml Medium, Puromycin 0.5 µg/ml Medium, Tetrazyklin 1 µg/ml Medium kultiviert.

Die murine 32Dcl3 Zelllinie wurde in RPMI1640 mit 10% FCS kultiviert. Zusätzlich wurde 10% WEHI-konditioniertes Medium als Quelle für IL-3 zum Zellkulturmedium hinzugefügt. Alle Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Die adhärenzte Zelllinie NIH3T3 wurde in DMEM Medium mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), 1% L-Glutamin und mit Antibiotika (Penicillin 100IU/ml und Streptomycin 10 µg/ml) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Die mit Zyklin D1 stabil transfizierte 32Dcl3 Zelllinie wurde durch Elektroporation hergestellt. Dazu wurden 1×10^7 Zellen zuerst in ihrem Medium und dann in PBS gewaschen und die Zellen in 300 µl ihres Mediums wieder aufgenommen. Die Zellsuspension wurde zusammen mit je 20 µg Plasmid DNA (15 µg Zyklin D1-Expressionsvektor + 5 µg pcDNA3) bei 375 V und 975 µF mit dem GenePulser II Electroporation System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) elektroporiert. Die Kontrollzelllinie wurde ebenfalls mit 20 µg DNA (15 µg pMAM + 5 µg pcDNA3) unter denselben Bedingungen elektroporiert und in Kultur genommen. Der Transfektionsvektor pcDNA3 trägt ein Gen, das eine Resistenz gegen das Antibiotikum Geneticin[®] (G418) vermittelt. Da dieses Aminoglykosid durch Angriff an den Ribosomen und Blockade der Translation toxisch auf eukaryonte Zellen wirkt, dient pcDNA3 als Selektionsfaktor. Daher wurden die Zellen in 15ml ihres Mediums überführt und mit G418 selektiert. Von den KCL22 Zellen wurden ebenfalls 1×10^7 durch Elektroporation mit 15 µg Plasmid DNA bei 300V und 975 µF transfiziert. Die adhärenzte Zelllinie NIH3T3 wurde mit 3µg Plasmid DNA in 436 µl ddH₂O und 62 µl Calcium-Chlorid (2M) und 500 µl Na₂HPO₄ (2x) transfiziert. Hierbei werden DNA, Calcium und Phosphatpuffer gemischt. Dabei bildet sich ein

feinkörniger Niederschlag aus Calciumphosphat und DNA, der auf die Zellen pipettiert und von diesen durch Endozytose aufgenommen wird.

Die für die Luziferase Assays benutzten Promoterfragmente des Zyklin D1 Promotors lagen in unserem Labor vor.

2.5 Western Blot

Die Proteinlysate aus den Tetrazyklin-regulierten AML1-ETO-U937 Zellen wurden nach 0 Stunden und nach 24 Stunden ohne TetraZykin gewonnen. Aus den Kasumi Zellen wurden ebenfalls Lysate hergestellt. Zur Herstellung der Lysate wurden die Zellen in Radioimmunoprecipitation (RIPA)-Puffer mit Proteinaseinhibitoren lysiert.

Für die Western Blot Analyse mit den Proben der Zink-induzierbaren Zelllinien U937 AML1-ETO, -PML-RAR α , -PLZF-RAR α wurden die Proteinlysate nach zwölf Stunden Zinkinduktion gewonnen. Durch Zugabe von 0.1mM ZnSO $_4$ wurden die Fusionsproteine induziert. Aus den Vergleichszelllinien U937, Kasumi und NB4 wurden ebenfalls Proteinproben extrahiert. Auch hier diente Radioimmunoprecipitation (RIPA)-Puffer mit Proteinaseinhibitoren zur Herstellung der Lysate.

Die Proteinlysate wurden mit „6x SDS sample buffer“ im Verhältnis 1:6 gemischt. Nach 5-minütigem Kochen wurden die Proben auf Eis abgekühlt. Ein Polyacrylamidgel (4-15% Tris-HCL) mit Gradienten wurde in eine Gelkammer eingesetzt und die Kammer mit Puffer gefüllt. Die Proben wurden zusammen mit einem Proteinmarker (Rainbow Marker, Bio Rad) in die Geltaschen pipettiert und die Elektrophorese mit

einem Vorlauf von 80-120 Volt gestartet. Die Voltzahl wurde nach 10 Minuten auf 120-150 Volt erhöht. Danach erfolgte das Blotting der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond ECL, RPN303D). Für den Westernblot mit den Zink-induzierbaren Zelllinien mit Nachweis der Expression von Zyklin D1 und c-myc verwendete ich einen anti-Zyklin D1 Antikörper (Pharmingen) in einer Konzentration von 1:100. Der zweite Antikörper war ein sekundärer IgG-Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Antikörper in einer Konzentration von 1:1000. Für den Westernblot mit den Zellen im Tet off System wurde ein

monoklonaler muriner anti Zyklin D1 Antikörper (BD Pharmingen) in einer Konzentration von 1:200 gefolgt von einem IgG-Meerrettich-Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper gegen Maus IgG in einer Konzentration von 1:2000 eingesetzt. Bei beiden Versuchen wurden die Proteinbanden im Anschluss auf einem Röntgenfilm detektiert und somit sichtbar gemacht.

2.6 RNA Isolierung

Die Isolation der RNA aus den primären Blasten erfolgte mittels TRIzol. Diese monophasische Lösung besteht aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat. Zunächst wurden $5-10 \times 10^6$ Zellen in 1ml TRIzol lysiert. Um eine vollständige Dissoziation der Kernproteine zu erreichen, wurden die Proben bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Danach wurden sie bei 4°C für 15 min bei 12000g zentrifugiert. Durch diesen Schritt wird die Probe in zwei Phasen aufgetrennt. Die obere Phase enthält die Nukleinsäuren und die untere die denaturierten Proteine. Aus der oberen Phase wird danach mit 0,5 ml Isopropanol die RNA gefällt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur und 10 Minuten Zentrifugation bei 12000g und 4°C präzipitierte die RNA. Die Proben wurden auf Eis gestellt und der Überstand der Proben entfernt. Das Präzipitat wurde in 1ml 75% Ethanol resuspendiert und durch Zentrifugieren bei 7500g und 4°C wiederum ausgefällt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt und die RNA danach luftgetrocknet.

Die gereinigte RNA wurde in RNase freiem ddH₂O gelöst und die Proben bei -80°C gelagert.

2.7 Herstellung von cDNA

Für das Umschreiben in cDNA wurden 1µg der isolierten RNA Probe mit 1µl Random Primer und 1 µl RNase out für 5 Minuten bei 70°C inkubiert. Der Random

Primer besteht aus einem Oligonukleotid aus Thymidinnukleotiden, das mit dem PolyA-Schwanz am 3' Ende der mRNA hybridisiert.

Danach wurden die Proben kurz auf Eis gelegt und anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 5 µl M-MLVV-5xReaction

Buffer (250mM Tris-HCL, 375mM KCL, 15mM MgCl₂, 50 mM DTT), 1,25 µl dNTP (10mM) und 1µl M-MLV-RT hinzugefügt. Der letzte Schritt besteht aus einer Inkubation der Probe für 60 Minuten bei 42°C und anschließendem Erhitzen für 15 Minuten auf 70°C. Die Reverse Transkriptase stammt aus dem Moloney murine leukemia Virus (MMLV). Die dNTPs setzen sich zusammen aus den Desoxynukleosidtriphosphaten dATP, dTTP, dGTP und dCTP.

2.8 Quantitative Real-Time RT-PCR:

Durch den Einsatz der RT-PCR wurde die relative Zyklin D1 mRNA Höhe in primären Blasten bestimmt.

Anhand der Expressionsanalyse des „housekeeping“-Gens GAPDH (welches in allen Zellen annähernd gleich exprimiert wird) wurden gleiche cDNA Konzentrationen eingestellt. Anschließend wurde die relative Zyklin D1 Konzentration analysiert, wobei GAPDH als interner Standard eingesetzt wurde.

Primer und Probe Sequenzen :

Zyklin D1 for: 5' ACT ACC GCC TCA CAC GCT TC 3'

Zyklin D1 rev: 5' CTT CGA TCT GCT CCT GGC AG 3'

Probe: 5' FAM-CCA GAG TGA TCA AGT GTG ACC CGG ACT- TAMRA 3'

Die Probe wurde über eine Exon-Exon-Grenze gelegt, um Fehler durch Kontamination mit DNA auszuschließen. Die Genexpression wurde anhand einer Standardkurve errechnet, die durch Verdünnung einer ML-1 cDNA hergestellt wurde. Die Reaktion wurde in MicroAmp Optical 96-well-Reaction-Plates (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) nach folgendem Standardprogramm über 40 Zyklen durchgeführt:

1. Aktivierung	2min	50°C
2. Aktivierung	10min	95°C
3. Denaturierung	15sec	95°C
4. Hybridisierung und Extension	1min	60°C

Die Reporterfluoreszenz während der PCR- Zyklen wurde mit dem ABI PRISM 7700 Sequence Detector (PE Biosystems, Foster City, CA, USA) analysiert und mit der Sequence Detector Software v. 1.6.3 quantitativ ausgewertet.

2.9 Sequenzierung

In der PCR werden einzelsträngige homologe DNA fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide hybridisiert. Dem Reaktionsansatz werden dNTP's (Desoxynukleosidtriphosphate) zur Kettenverlängerung und Fluorochrom markierte ddNTP's (Didesoxynukleosidtriphosphate) zugefügt. Außerdem verwendet man einen Primer, dessen 3'Ende den Ausgangspunkt für die Elongation bildet. Der Einbau der ddNTP's führt zu einem Abbruch des Stranges. So erhält man einsträngige Oligonukleotide, die an einem Ende gleich sind und sich am anderen Ende um das nachfolgende Oligonukleotid der Sequenz unterscheiden.

PCR Ansatz:		PCR Programm:
Reaktionsmix BD 3.1	1 µl	96°C 4 min
DNA	200-400 ng (1-3µl PCR-Produkt)	96°C 20 sec
Primer (µM)	1.5 µl	50°C 10 sec
5x Sequenzier Puffer	2µl	60°C 2 min

Add H₂O

10 µl Wiederholung der Schritte 2-4: 35 mal

Zur Aufreinigung der Proben wurde das MultiScreen- Aufreinigungskit von Millipore (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) verwendet. In eine 96-well Platte wurde nach dem Protokoll „Dye Terminator Removal and Sequencing Reaction Clean-up Using MultiScreen 96-well Filtration Plates“ eine vorgegebene Menge Sephadex TM G50 gegeben und mit 300µl ddH₂O aufgefüllt. Danach wurde die Platte für 3 h bei 4°C inkubiert und anschließend in einer Kühlzentrifuge bei 950 g für 5 Min zentrifugiert. Es wurden erneut 100 µl ddH₂O in die wells pipettiert und diese wieder zentrifugiert. Danach wurden

die PCR Proben auf die Säulen gegeben und die Platte erneut zentrifugiert. Das Eluat wurde mittels einer sterilen Platte aufgefangen. Die Sequenzierung wurde in einem Kapillar-Sequenzier (Applied Biosystems ABI 310) durchgeführt.

2.10 Chromatin-Immunopräzipitation: (ChIP)

Es wurde das Chromatin Immunoprecipitation Assay Kit (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) verwendet.

Die 12 h zuvor transfizierten Zellen, sowie die stabilen Zelllinien wurden durch 1% Formaldehyd (1%), das für 10 Minuten zum Zellmedium dazugegeben wurde, in vivo in ihrer Bindung an DNA fixiert. Durch Zugabe von 0,125 M Glycin wurde die Reaktion abgebrochen. Nach zweimaligem Waschen in eiskaltem PBS erfolgte die Lyse der Zellen in RIPA Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren, 200 μ M Natrium-Orthovanadate und 50 μ M NaF. Anschließend wurden die Lysate für 10 Minuten auf Eis inkubiert und danach das Chromatin durch UV Strahlung fragmentiert (9 Pulse von 5 Sekunden). Durch Zentrifugation wurden die Zelltrümmer abgetrennt und 50 μ l der Proben als Input-Kontrolle abgenommen. Die restliche Probe wurde in 40 μ l Protein A/G Agarose mit Kaninchen und Maus IgG (5 μ g) vorgereinigt. Für die Immunopräzipitation über Nacht wurden die Proben mit 40 μ l A/G Agarose und 3 μ g eines anti-FLAG Antikörpers versehen. Anschließend wurden die Immunkomplexe mit einem Puffer mit niedriger Salzkonzentration (0,1% SDS, 150 μ M NaCl, 1% Triton X-100, 2 μ M EDTA pH 8.0, 20 μ M Tris-HCl pH 8.1) mehrfach gewaschen. Die DNA/Protein-Bindungen in den Immunkomplexen sowie in der Input-Kontrolle wurden dann wieder gelöst und die DNA mittels Phenol-Chloroform extrahiert. Mittels PCR wurde die Zyklin D1 Promotorsequenz mithilfe spezifisch designer Primersequenzen in den Proben detektiert.

Zyklus D1 „Sense“ (F) Primer: 5'-TGC-AAA-GTC-CTG-GAG-CCT-CCA-GA-3'

Zyklus D1 „Antisense“ (R) Primer: 5'-ACA-GGA-GCT-GGT-GGT-CCA-TGG-CT-3'

PCR Ansatz:

DNA	3 µl
MgCl	3 µl
Taq-Polymerase 0.5 (Promega)	1 µl
Polymerase Puffer (10x)	5 µl
dNTP's	1 µl
F-Primer	2.5 µl
R-Primer	2.5 µl
<u>Add H₂O</u>	50 µl

PCR Programm:

1min	95°C
1min	95°C
1min	60°C
1min	72°C

Wiederholung der Schritte 2-4: 37 mal

Das PCR Produkt wurde auf ein 2% Agarosegel aufgetragen und somit aufgetrennt. Danach wurde das Gel mit Ethidium-Bromid gefärbt und mittels Southern blotting auf eine Nitrozellulosemembran übertragen.

2.11 Southern Blot

Die Methode des Southern Blotting wurde 1975 von Edwin Southern entwickelt, um die Identifizierung einzelner DNA Sequenzen aus einem komplexen DNA Gemisch möglich zu machen ohne sämtliche Sequenzen des Gemisches entschlüsseln zu müssen. Prinzip dieser Methode ist es, die vorher auf einem Elektrophorese-Gel aufgetrennte DNA auf eine Nylonmembran zu transferieren, um sie dann auf einem Photofilm sichtbar zu machen.

Folgende Lösungen/ Kits wurden verwendet:

Denaturierungslösung1:

NaOH (0,5 N) 10g

NaCl (1,5 M) 43.83g

Neutralisierungslösung 1:

Tris-HCl (pH 7.5) 39.4 g

NaCl (3M) 87.66 g

SSC Puffer (20x) (Sodium-Chlorid-Sodium Citrat- buffer):

SSC 132g

450 ml H₂O (pH 7.0)

Waschlösung (2x):

SSC (2x)

SDS (0.1%)

Waschpuffer:

Maleinsäure (100mM)

NaCl (150mM)

Tween 20 (0.3%)

„Maleic acid buffer“:

Maleinsäure (100mM)

NaCl (150mM)

„Blocking“ Lösung:

„Blocking reagent“ (Roche)

„Maleic acid buffer“ (pH 7.5)

„DIG Oligonucleotide 3'-end labeling Kit“ (Roche)

Um das Ethidium-Bromid zu entfernen, wurde das Gel zweimal für 15 min in TAE Puffer gewaschen und anschließend zweimal in der Neutralisierungslösung 1 für 15 min geschwenkt. Um die Membran (Roche) dafür vorzubereiten, musste diese kurz in SSC Puffer (5x) und dann für 15 min in SSC Puffer (10x) inkubiert werden. Für den Transfer mittels Kapillarmethode wurde ein Standblock in einen flachen Behälter mit 10x SSC buffer gestellt. Dieser Block war nicht vollständig in den Puffer eingetaucht. Darüber wurde eine Glasplatte und darauf Filterpapier gelegt. Dann folgte eine Lage Parafilm, auf die erst das gewaschene Gel und dann die Nylonmembran gelegt wurde. Luftblasen zwischen dem Gel und der Membran wurden sorgfältig entfernt, um einen lückenlosen DNA Transfer zu erreichen. Nach einer weiteren Lage Filterpapier folgte ein 15-20 cm dicker Stapel Papier-Handtücher. Dieser wurde mit einer zweiten Glasplatte bedeckt und mit 0.5 kg Gewicht beschwert. Der Transfer erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Die treibende Kraft bei dieser Methode ist ein Flüssigkeitsstrom, der von einem Flüssigkeitsreservoir durch das Gel und die Membran zu einem Stapel saugfähigen Materials fließt. So wird die DNA aus dem Gel gezogen und bleibt in den Maschen der Membran hängen.

Am zweiten Tag wurde die Nylon-Membran noch im feuchten Zustand für 1 min mit UV-Licht behandelt, um die DNA auf der Membran zu fixieren. Danach wurde sie kurz gespült und anschließend luftgetrocknet.

Der nächste Schritt bestand darin, das Oligonukleotid mittels eines Kits zu markieren. Ein wichtiges Prinzip hierbei ist das Erhitzen des doppelsträngigen DNA Stranges, um die beiden Stränge zu trennen. Dies ermöglicht die Basenpaarung mit der DNA auf der Membran.

Bei der Markierung wird dUTP anstatt dTTP in die DNA eingebaut. An das dUTP ist Digoxigenin gehängt. An dieses Protein wird in einem späteren Schritt ein Antikörper gekoppelt, an dem ein weiteres Enzym hängt. Dieses katalysiert eine Reaktion, bei der Licht emittiert wird. Durch Auflegen der Membran auf Photopapier kann man die DNA detektieren. Die Stellen, an denen die Sonde liegt, werden durch das entstehende Licht geschwärzt.

In Vorbereitung auf die Hybridisierung mit dem „Dig markierten“ Oligonukleotid wurde die Membran in ein Falcon Tube gerollt und 20 ml der „DIG easy Hyb solution“ aus dem Kit dazugegeben. Das Falcon Tube wurde dann für 2-3h bei 42°C im Ofen rotiert.

Für den Hybridisierungsschritt entfernten wir die „DIG easy Hyb solution“ wieder und gaben 5 ml neue Lösung dazu. Dann pipettierten wir 5 pmol/ml des „Dig markierten“ Oligonukleotids dazu und inkubierten den Ansatz über Nacht bei 42°C.

Am dritten Tag wurde die Membran zweimal für 5 min bei Raumtemperatur in Waschlösung (2x) und danach zweimal 15 min bei 42°C in Waschlösung (0.5x) geschwenkt. Danach musste sie in dem Waschpuffer 1min äquilibrieren. Anschließend wurde sie mit der „blocking“ Lösung in Folie eingeschweißt und 30 min inkubiert. Die Bindung des Antikörpers gegen das Digoxigenin fand in einer speziellen Lösung statt, für die 3 µl „DIG-AP“ aus dem Kit in 30 ml der „blocking“ Lösung pipettiert wurden. Dadurch ergab sich eine Antikörperkonzentration von 1:1000. Die Membran inkubierte für 30 min in der Lösung. Nach 2-maligem Waschen in Waschpuffer wurde die Membran in Folie gewickelt und mit 3 ml „CDP-Star Ready to use“ Entwicklerlösung für 5 min in eine Photokassette gelegt. Anschließend wurde die Membran auf Photopapier aufgelegt und der Film entwickelt.

2.12 Luziferase Reporter Assays:

Die Promotor Reporter Assays wurden mit Hilfe des Dual-Luciferase Reporter Assay Systems (Promega) durchgeführt. Die NIH3T3 Zellen wurden mit 3-5 µg Plasmid DNA transfiziert. Die Mischung bestand aus 1.8µg eines CD1Prom.-TK Luciferase

Konstruktes, 0.2µg eines PRLSV 40 Plasmids und 1µg der Expressionsvektoren für AML1, AML1-ETO, AML1-mut.1, AML1-mut.2, TCF-mt.0-4 und Plakoglobin in

verschiedenen Kombinationen. Der Leervektor pcDNA3 wurde zum Ausgleich der Gesamtmenge an DNA mit transfiziert. Diese Expressionsvektoren lagen bereits kloniert im Labor vor und wurden mir zur Verfügung gestellt. Ebenfalls

zur Verfügung gestellt wurden die Expressionsvektoren für die Deletionsmutanten des Zyklin D1 Promotors, die im analogen Verhältnis zu dem zuvor beschriebenen Versuch verwendet wurden.

Um die experimentellen Unterschiede durch unterschiedliche Zellzahlen oder Transfektionseffizienzen auszugleichen, wurde der pRLSV 40 Vektor als interne Kontrolle mitgeführt. Dieser Vektor exprimiert konstitutiv Luziferase. Die Zellen wurden in 6-well Platten für 18 h in DMEM mit 10% FCS bei 37°C und 5% CO₂ in Kultur gehalten. Danach wurden sie in PBS gewaschen und anschließend mittels „Passive Lysis Buffer“ (1x) für 30 min auf Eis lysiert. Nach dieser Inkubationszeit mussten die Zellen mittels eines Zellschabers vom Boden der Schalen geerntet werden. Zur Messung der Luziferaseaktivität wurde 20µl jeder Probe in eine Luminometerküvette pipettiert und zuerst 100µl LARII dazugegeben und die „firefly“ Aktivität in einem Luminometer (TD-20/20, Turner Designs, Sunnyvale, USA) gemessen. Die „firefly“ Luziferase ist die Luziferase, vor die der zu analysierende Promotor kloniert wurde. Sie wandelt nach Zusatz von LARII das darin enthaltene Luziferin enzymatisch um. Dabei wird Licht emittiert, welches im Luminometer gemessen wird. Danach wurden 100ul „Stop and Glo“ hinzugefügt, wodurch die erste Lichtreaktion gestoppt und die „renilla“ Lumineszenz bestimmt wurde. Diese zweite Luziferase befindet sich in einem pRL-Renilla Vektor, in dem vor der Luziferase eine SV Promotorsequenz liegt. Die Renilla-Luziferase Aktivität wurde zur internen Standardisierung der Transfektionseffizienz benutzt. Aus drei unabhängigen Experimenten wurden die Mittelwerte und Standardfehler berechnet. Zur Berechnung der einzelnen Promotoraktivitäten wurde der „firefly“ Wert auf die jeweilige „renilla“ Aktivität bezogen. Die Aktivität des Leervektors pcDNA3 als „background“ wurde zuvor abgezogen.

2.13 Kolonie-Assay

Die mit Zyklin D1 transfizierten Zellen und die Zellen der Kontrollzelllinie wurden für 24 h in RPMI 1640 mit 10% FCS und WEHI bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Danach wurden sie für 10 min bei 400 g zentrifugiert und im Anschluss in IMDM Medium gewaschen.

Nach erneuter Zentrifugation bei 400 g für 10 min wurden die Zellen in IMDM aufgenommen und in der Neubauer-Kammer gezählt. Daraufhin wurde die Zellkonzentration auf 300 lebende Zellen pro µl IMDM eingestellt. Für 3 Ansätze wurde ein Gesamtansatz mit einem Volumen von 4600µl hergestellt.

Ansatz des „Methylcellulose-Medium-Zell-Mixes“:

2000 µl Methylcellulose (1%)

920 µl FCS (Endkonzentration:20%) + 1% Glutamin

4.6 µl IL3 (1 ng/ml)

55.2 µl G418 (0.6 mg/ml)

IMDM Medium zum Einstellen eines Volumens auf 4140 µl

In diesen Methylcellulose Ansatz wurden dann 460 µl Zellsuspension aufgenommen und vorsichtig geschwenkt, um eine gleiche Verteilung der Zellen zu erreichen.

Der Ansatz wurde in 10ml Spritzen mit „SUPRA“-Einmalkanülen (2,0 x 80mm) (Firma Ehrhardt-Söhne GmbH) aufgezogen. Nach dem Wechsel der Kanüle auf kleinere Kanülen (20G) verteilte ich je 1000µl des Ansatzes auf Zellkulturschalen („2mm grid with lid and vent“, 35x10mm). Insgesamt 6 der kleineren Kulturschalen wurden in einer Petrischale zusammen mit einer Kulturschale mit PBS bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Das PBS diente zur Erhaltung der Luftfeuchtigkeit.

Für die Versuche mit 10% FCS und 5% FCS reduzierte ich das zum Ansatz gegebene Volumen und gab dementsprechend mehr IMDM dazu.

Nach 10 Tagen zählte ich die Kolonien unter dem Mikroskop aus und berechnete aus drei unabhängigen Experimenten die Mittelwerte und Standardfehler.

2.14 (³H)-Thymidin-Assay

Mittels dieser Methode lässt sich die Proliferationsrate von Zellen untersuchen. Das Prinzip besteht darin, die Zellen in radioaktiv markiertem Thymidin zu inkubieren, damit sie dieses während der S-Phase als Baustein für die DNA Synthese verwenden. Die Einbaurate der radioaktiv markierten Zellen wird am Szintillationszähler gemessen. Die Intensität der Radioaktivität ist ein Maß für das Erreichen der S-Phase.

Die Zellen wurden am Vortag 2x in PBS gewaschen und in 96-well Platten ausgesiedelt. Die Konzentration der Zellen betrug 3×10^4 Zellen pro Loch in 2000µl RPMI ohne FCS mit Penicillin/Streptomycin. Es wurden 3 fache Ansätze pipettiert

und pro Dreifachansatz wurden 1% FCS, 5% FCS, 10% FCS, oder 20% FCS zum Medium dazugegeben; außerdem 0.2µl murines IL3.

Nach 16h wurden die Zellen mit $1 \mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ³[H] Thymidin für weitere 6h inkubiert, danach auf eine Membran transferiert und der radioaktive Thymidingehalt mit Hilfe eines Szintillationsmessgerätes bestimmt.

2.15 Zellzyklus-Analyse mit Propidiumiodid

Mit dem fluoreszenzaktivierten Durchflußzytometer (FACScalibur, Becton Dickinson) kann der DNA-Gehalt einer Zellsuspension ermittelt werden. Dadurch lassen sich Rückschlüsse ziehen über die unterschiedlichen Zellzyklusphasen, in denen sich die Zellen befinden. Das „FACS“-Gerät dient zur Messung einzelner Zellen. Das Prinzip der Methode beruht darauf, dass die Zellen mit Propidiumiodid behandelt werden. Dies ist ein Farbstoff, der fluoresziert sobald er an DNA bindet. Durch die Stärke der Fluoreszenz, die der DNA Menge jeder einzelnen Zelle direkt proportional ist, kann man die Zellzyklus Phase bestimmen. Die Zellen in der G1-Phase enthalten unreplizierte DNA, während die DNA der Zellen in der G2- oder M-Phase vollständig repliziert vorliegt. Liegt der DNA Gehalt dazwischen, befinden sich die Zellen gerade in der S-Phase.

Von den stabil transfizierten 32D Zellen wurden zunächst 1×10^6 Zellen in PBS (0.1% BSA) gewaschen. Anschließend wurden sie durch Zugabe von 1ml 70%

Ethanol in PBS für 60 Minuten auf Eis fixiert. Das Ethanol wurde tropfenweise zugeführt, um eine Verklumpung der Zellen zu vermeiden. Anschließend wurden sie für 60 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut in PBS (0.1% BSA) gewaschen und der Überstand nach Zentrifugation für 5 min bei 400g verworfen. Zu den sich am Boden befindlichen Zellrasen wurden 50 µl einer RNase Lösung (5mg/ml) für 10 min bei Raumtemperatur dazugegeben. Der folgende Schritt bestand aus der Zugabe von 450µl Propidiumiodid (50µg/ml) und einer 30 minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur im Dunklen. Anschließend konnten die Zellzyklusanalysen mit dem FACS Cytometer durchgeführt werden.

3. Ergebnisse

3.1 Nachweis der Induktion von Zyklin D1 durch die Fusionsproteine

Zunächst wurden verschiedene Zellsysteme verwendet, um den Einfluss von AML1-ETO auf die Expression von Zyklin D1 zu untersuchen. Hierbei wurden die myeloischen Leukämiezelllinien U937, NB4 und Kasumi kultiviert. Zudem wurden Zink-induzierbare Sublinien eingesetzt, in denen durch Zugabe von Zinksulfat für zwölf Stunden die Fusionsproteine AML1-ETO, PML-RAR α und PLZF-RAR α induziert werden konnten. Mittels entsprechender Antikörper ließen sich die Proteine Zyklin D1 und Aktin nachweisen. Die humane Leukämiezelllinie Kasumi diente zum Vergleich, da sie endogenes AML1-ETO exprimiert ebenso wie die NB4 Zellen, die endogenes PML-RAR α bilden.

Wie die Abbildung zeigt kam es nach Expression der Fusionsproteine nach 12 h in den Zellen zu einer deutlichen Induktion von Zyklin D1. Die Expression von Zyklin D1 zeigte sich in den Lysaten, in denen entweder AML1-ETO, PML-RAR α oder PLZF-RAR α exprimiert wurden.

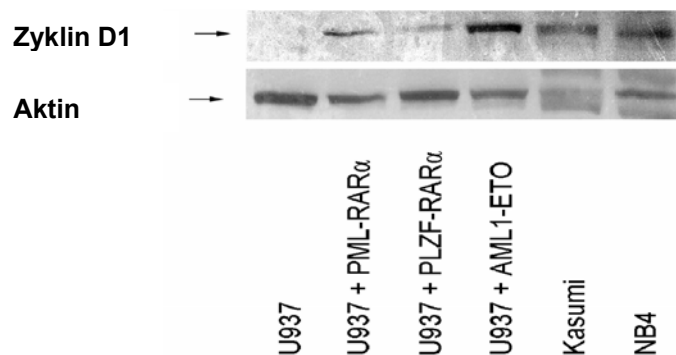


Abbildung 5: Westernblot: Proteinexpression von Zyklin D1 in Zelllinien nach Expression von AML1-ETO, PML-RAR α und PLZF-RAR α . Die Fusionsproteine AML1-ETO, PML-RAR α und PLZF-RAR α wurden für 12h in stabil transfizierten U937 Zellen mittels Zn⁺ induziert. Im Westernblot zeigt sich eine Induktion von Zyklin D1 in den Leukämiezelllinien die eines der Fusionsproteine exprimieren im Vergleich zu normalen U937 Zellen.

In diesem Versuch wurde analog zum Versuch in Abbildung 5 auch ein anderes Zellsystem verwandt. Es handelt sich ebenfalls um die menschliche Leukämiezelllinie U937, die hier mit Zyklin D1 in einem Tet off System stabil

transfiziert wurde. In diesem System lässt sich AML1-ETO induzieren, indem Tetrazyklin als Zusatz zum Zellkulturmedium weggelassen wird. Auch in dieser Abbildung erkennt man in der Spalte, in der AML1-ETO induziert worden ist eine deutliche Zyklin D1 Bande, die in der Spalte ohne AML1-ETO nicht zu erkennen ist. Die Kasumizellen, die AML1-ETO exprimieren, zeigen ebenfalls eine Zyklin D1 Expression.

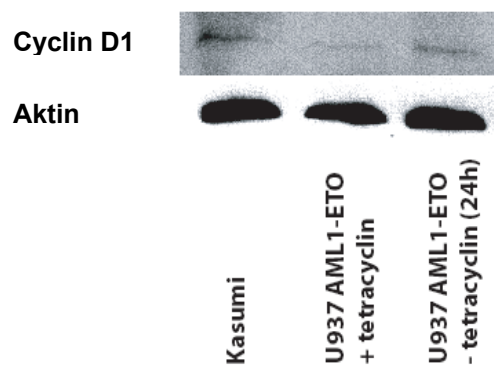


Abbildung 6: Westernblot: Expression von Zyklin D1

Durch Entzug von Tetrazyklin wurde in U937 Zellen, die mit AML1-ETO in einem „Tet off „ System transfiziert wurden nach 24h AML1-ETO induziert und der Zyklin D1 Level mittels eines Zyklin D1 Antikörpers detektiert. Zum Vergleich dienten auch hier Kasumizellen.

3.2 Zyklin D1 Expression in primären AML-Blasten

Interessant war nun die Frage, ob sich auch in primären Patientenblasten eine Assoziation von AML1-ETO und Expression von Zyklin D1 zeigt. Mit Hilfe der quantitativen real-time RT-PCR wurde in den Blasten von neu erkrankten AML Patienten die relative Expression von Zyklin D1 untersucht. Jeder einzelne Datenpunkt in Abbildung 7 steht für die Probe eines Patienten. Die Punktwolkengruppierung links unten zeigt die Patienten mit AML, bei denen keine Translokation t(8;21) vorliegt. Bis auf zwei Ausnahmen zeigten diese Patienten eine vergleichsweise niedrige Zyklin D1 Genexpression. Bei den vier Patienten, bei denen AML1-ETO gesichert wurde, lag die Zyklin D1 Expression signifikant höher.

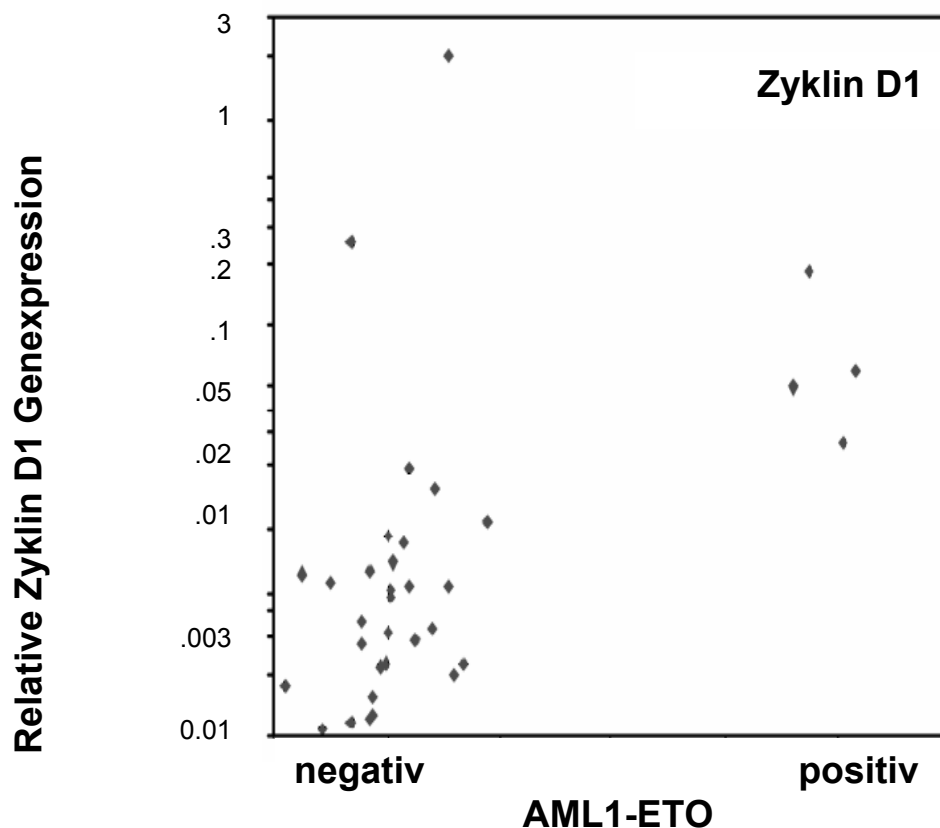


Abbildung 7: Quantitative real-time RT-PCR: Relative Genexpression von Zyklin D1 in AML1-ETO positiven Blasten

Gezeigt sind die unterschiedlichen Expressionslevel in Patienten mit und ohne das Fusionsprotein AML1-ETO ($p < 0,05$). Wie aus der Abbildung ersichtlich weisen die AML1-ETO positiven Blasten einen signifikant erhöhten mRNA Level im Vergleich zu den Blasten ohne die Translokation t(8;21) auf.

3.3 Punktmutationen im AML1-Gen

Bei den Expressionsanalysen fielen die hohen Zyklin D1 Expressionswerte in den primären Blasten von zwei Patienten auf, die auch ohne das Vorliegen eines bekannten Fusionsproteins deutlich erhöht waren. Diese Patienten hatten eine sehr undifferenzierte akute myeloische Leukämie (FAB M0). Durch Sequenzierung der AML1-Gene in den Proben dieser Patienten konnten bei einem Patienten auf beiden Allelen für das Gen Punktmutationen festgestellt werden. Wie in der Abbildung dargestellt, sind durch die Punktmutationen zwei Basenpaare innerhalb der DNA Sequenz ausgetauscht worden. Die erste Mutation verursacht einen Austausch der Base Thymin gegen Guanin was in

der Aminosäuresequenz Asparagin (N) durch Lysin (K) ersetzt. Die zweite Mutation mit einem Tausch der Base Cytosin gegen die Base Thymin verursachte eine Verschiebung des Leserasters und einen Abbruch der Kette durch Einfügen eines Stopcodons.

Wildtyp AML1b

Aminosäuren Sequenz:

MASDSIFESF PSYPQCFMRE CILGMNPSRD VHDASTSRRF TPPSTALSPG KMSEALPLGA
PDAGAALAGK LRSGDRSMVE VLADHPGELV RTDSPNFLCS VLPTHWRCNK TLPIAFKVVA
LGDVPDGLTV TVMAGNDENY SAELRNATAA MKNQVARFND LRFVGRSGRG KSFTLTITVF
TNPPQVATYH RAIKITVDGP REPRRHRQKL DDQTKPGSLS FSERLSELEQ LRRTAMRVSP
HHPAPTPNPR ASLNHSTAFN PQQSQMQDT RQIQSPPPWS YDQSYQYLGS IASPSVHPAT
PISPGRASGM TTLSAELSSR LSTAPDLTAF SDPRQFPALP SISDPRMHYP GAFTYSPTPV
TSGIGIGMSA MGSATRYHTY LPPYPGSSQ AQGGPFQASS PSYHLYYGAS AGSYQFSMVG
GERSPPRILP PCTNASTGSA LLNPSLPNQS DVVEAEGSHS NSPTNMAPSA RLEEAVWRPY

Mutation 1 von AML1b

MASDSIFESF PSYPQCFMRE CILGMNPSRD VHDASTSRRF TPPSTALSPG KMSEALPLGA
PDAGAALAGK LRSGDRSMVE VLADHPGELV RTDSPNFLCS VLPTHWRCNK TLPIAFKVVA
LGDVPDGLTV TVMAGKDENY SAELRNATAA MKNQVARFND LRFVGRSGRG KSFTLTITVF
TNPPQVATYH RAIKITVDGP REPRRHRQKL DDQTKPGSLS FSERLSELEQ LRRTAMRVSP
HHPAPTPNPR ASLNHSTAFN PQQSQMQDT RQIQSPPPWS YDQSYQYLGS IASPSVHPAT
PISPGRASGM TTLSAELSSR LSTAPDLTAF SDPRQFPALP SISDPRMHYP GAFTYSPTPV
TSGIGIGMSA MGSATRYHTY LPPYPGSSQ AQGGPFQASS PSYHLYYGAS AGSYQFSMVG
GERSPPRILP PCTNASTGSA LLNPSLPNQS DVVEAEGSHS NSPTNMAPSA RLEEAVWRPY

Mutation 2 von AML1b

MASDSIFESF PSYPQCFMRE CILGMNPSRD VHDASTSRRF TPPSTALSPG KMSEALPLGA
PDAGAALAGK LRSGDRSMVE VLADHPGELV RTDSPNFLCS VLPTHWRCNK TLPIAFKVVA
LGDVPDGLTV TVMAGNDENY SAELRNATAA MKNQVARFND LRFVGRSGRG **STOP**

Abbildung 8: Sequenzierung der AML1 Mutationen 1 und 2. Bei Mutation1 wird Asparagin durch Lysin ersetzt. Bei Mutation 2 bricht die Sequenz durch Einfügen eines Stopcodons ab.

3.4 Die Bindung von AML1-ETO an den Zyklin D1 Promotor

Da eine Regulation von Zyklin D1 über AML1-ETO auf Protein- und mRNA Ebene gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage nach einer direkten Bindung von AML1-ETO an den Zyklin D1 Promotor.

Die folgende Abbildung zeigt die Analyse des Zyklin D1 Promotors in AML1-ETO positiven Proben mittels der Methode der Chromatin-Immunopräzipitation.

Zellen einer Leukämie-Zelllinie (Kcl22) wurden mit einem FLAG markierten AML1-ETO transfiziert. Nach der Bindung der Proteine an die DNA *in vivo* wurde die DNA in ca. 400 bp große Fragmente zerteilt und mit einem Antikörper gegen FLAG wurden alle Fragmente immunopräzipitiert, an die ursprünglich AML1-ETO gebunden hatte. Anschließend wurde im Präzipitat das Vorhandensein des Zyklin D1 Promotors mittels PCR und Southernblot nachgewiesen. Die linke Bande zeigt das Ergebnis mit der DNA aus dem Zelllysate vor Immunopräzipitation. Die mittlere Bande ist eine Probe, in der die Immunopräzipitation mit einem unspezifischen IgG durchgeführt wurde. Diese beiden Proben dienten im Versuch als Kontrolle. Die Bande in der rechten Spur zeigt die PCR der Promotorsequenz von Zyklin D1 aus der Probe nach IP mit α -FLAG.

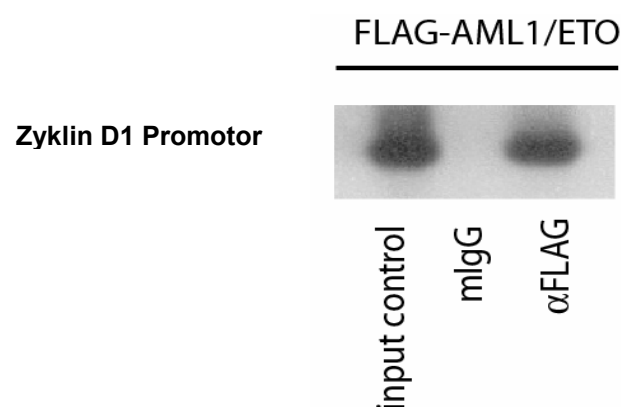


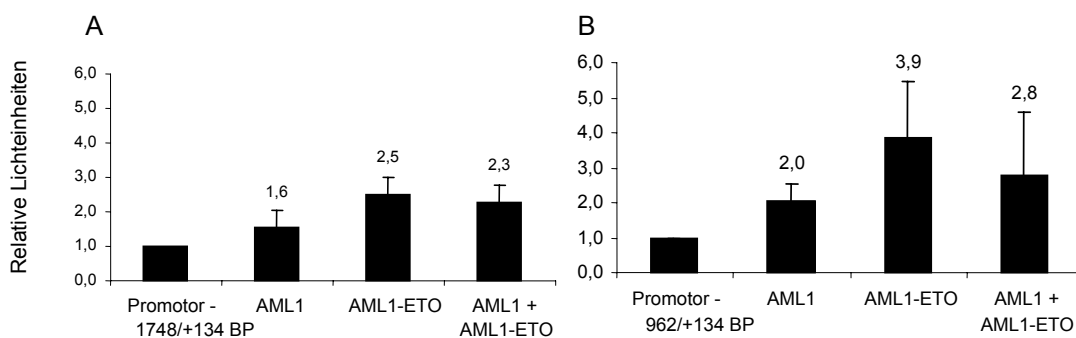
Abbildung 9: Chromatin-Immunopräzipitation mit dem Zyklin D1 Promotor und FLAG markiertem AML1-ETO. AML1-ETO bindet an den Zyklin D1 Promotor

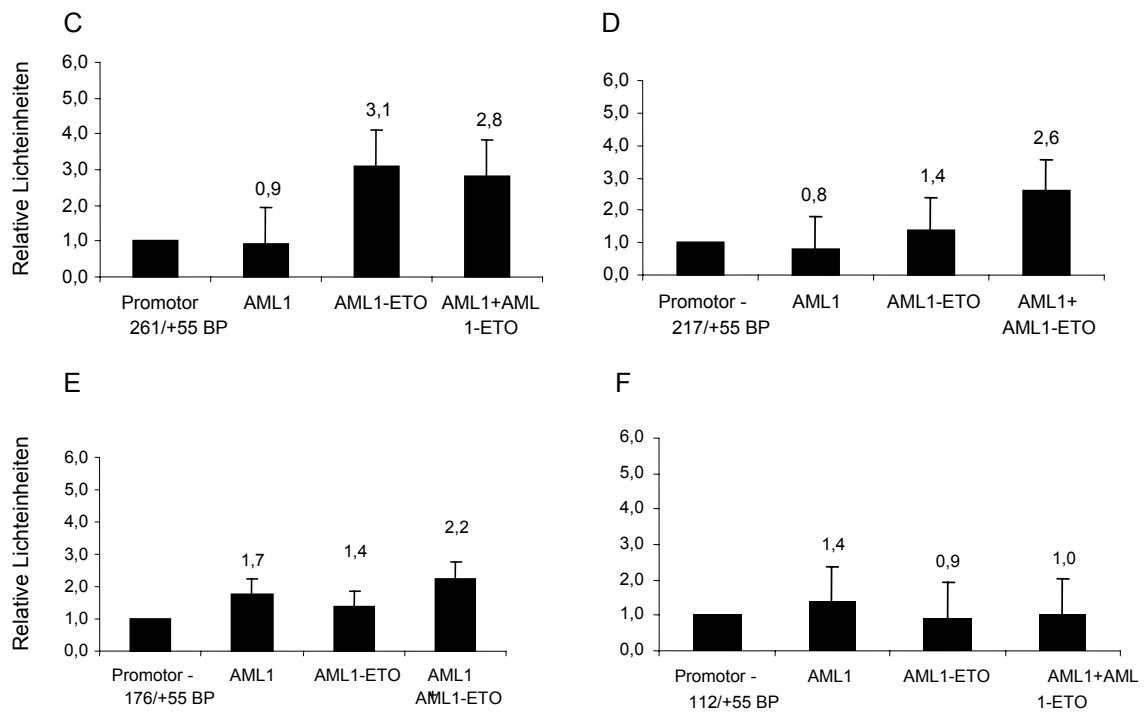
3.5 Aktivierung des Zyklin D1 Promotors durch AML1-ETO

Um zu untersuchen, ob eine Bindung von AML1-ETO an den Zyklin D1 Promotor eine Aktivierung des Promotors bewirkt, wurden Luziferase-Assays durchgeführt.

In den hier dargestellten Versuchsreihen mit der Zelllinie NIH3T3 wurden verschiedene Zyklin D1 Promotorfragmente verwendet, um die Sequenz des Zyklin D1 Promotors identifizieren zu können, die für eine Aktivierung relevant ist.

Das längste Promotorstück beinhaltet 1748/+134 Basenpaare und das kürzeste konstruierte Fragment 112/+55 Basenpaare. Die NIH3T3 Zellen wurden mit einem Luziferase-Konstrukt unter der Kontrolle eines der Zyklin D1 Promotorstücke transfiziert. Wie aus der Abbildung ersichtlich, wurde in jeder Analyse entweder AML1 oder AML1-ETO oder AML1 und AML1-ETO mittransfiziert. Über die Messung der Luziferaseaktivität erhielten wir eine Aussage über die jeweilige Zyklin D1 Promotoraktivität. Die interne Transfektionskontrolle erfolgte durch ein Renilla-Luziferase-Konstrukt. Das Ergebnis zeigt eine dreifache Aktivierung des Zyklin D1-Promotors durch AML1-ETO bei den Promotorfragmenten 1748/+134 bis einschließlich 261/+55 (Abbildung a-c). Wie in den Abbildungen d-f gezeigt, aktivierten die Promotorfragmente 217/+55, 176/+55 und 112/+55 den Promotor nicht mehr.





Abbildungen 10 A-F: Promotorfunktionsanalysen. Luziferase Assays mit verschiedenen Promotorkonstrukten des Zyklin D1 Promotors -1748/+134 bp bis -112/+55 bp

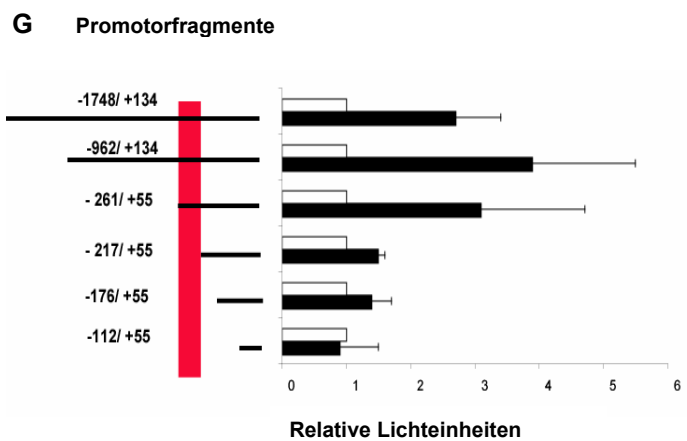


Abbildung 10 G: Überblick über die Promotoraktivierung der verschiedenen Promotorkonstrukte durch AML1-ETO. Weisse Balken: auf 1 normalisierte *renilla*-Aktivität; Schwarze Balken: *firefly* Aktivität entspricht der relativen Zyklin D1-Promotoraktivität.

Die Experimente zeigen, dass die Aktivierung des Promotors durch AML1-ETO nur bis zu dem Promotorfragment – 217/+55 bp gegeben ist. (siehe Abbildung a-g). Während der Promotor mit dem 316 bp langen Fragment noch dreifach von AML1-ETO hochreguliert wird, findet sich ab den 272 bp langen Promotorfragmenten keine Aktivierung durch AML1-ETO mehr.

3.6 Der Einfluss der AML1-Mutationen auf den Zyklin D1 Promotor

In weiteren Analysen durch Luziferase Assays sollte der Effekt der oben (s. auch Abbildung 4) identifizierten AML1 Mutationen der primären AML Blasten auf die Aktivierung des Zyklin D1 Promotors untersucht werden. Die NIH3T3 Zellen im folgenden Versuch wurden mit einem Konstrukt aus dem Luziferasevektor und dem Zyklin D1 Promotorfragment -962 bp, das sicher durch AML1-ETO aktiviert wird, transfiziert. Es wurden jeweils AML1-ETO, AML1 oder die AML1 Mutation 1 oder 2 mittransfiziert. Auch hier erfolgte die interne Transfektionskontrolle durch ein Renilla-Luziferase-Konstrukt. Während der Zyklin D1 Promotor 2,3-fach von AML1-ETO aktiviert wird ist keine Aktivierung durch die einzelnen AML1 Mutationen und keine Aktivierung durch die Kombination beider messbar.

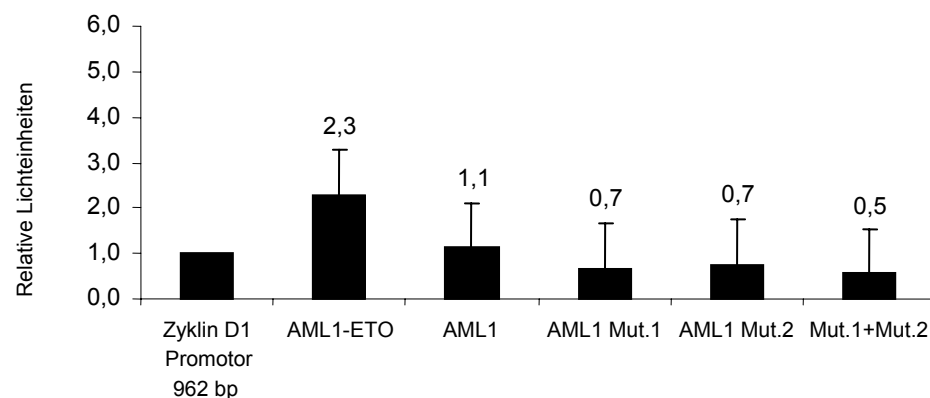


Abbildung 11: Zyklin D1 Promotor -962/+134 mit den AML-1 Mutationen 1/2

3.7 AML1-ETO aktiviert den Zyklin D1 Promotor unabhängig von der TCF-Bindungsstelle

Im nächsten Schritt sollte die Frage beantwortet werden, ob der Zyklin D1 Promotor mit einer mutierten TCF Bindungsstelle immer noch von AML1-ETO hochreguliert werden kann. Abbildung 9 zeigt Luziferase Assays mit einem Luziferasevektor unter der Kontrolle eines Zyklin D1 Promotor Konstrukts aus dem Promotorfragment -962 BP und der mutierten TCF Bindungsstelle. In dem Promotorfragment fehlten die TCF Bindungsstellen 0 bis 4. Die indirekte Induktion von Zyklin D1 über eine Aktivierung Wnt-Signalweges über Plakoglobin und TCF/LEF war so nicht möglich. Wie aus dem Versuch zu entnehmen, führt AML1-ETO zu einer starken Aktivierung des nicht mutierten Zyklin D1 Promotors. Die Promotoraktivität mit veränderter TCF Bindungsstelle wurde allerdings ebenfalls von AML1-ETO hochreguliert. In einem zweiten Experiment mit diesem mutierten Luciferasekonstrukt wurde entweder AML1-ETO oder Plakoglobin mittransfiziert. Der Versuch bestätigte die Aktivierung des Promotors durch AML1-ETO wie im vorherigen Versuch, während Plakoglobin alleine nicht in der Lage war den Promotor zu aktivieren.

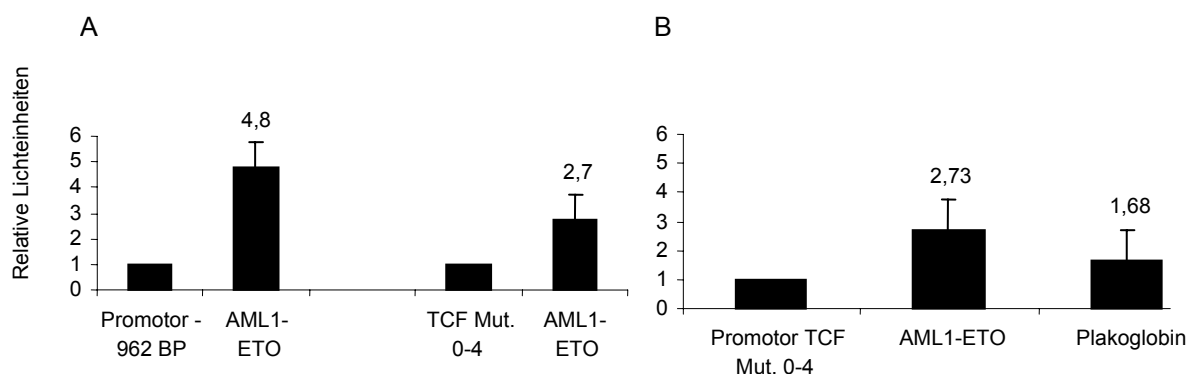


Abbildung 12: TCF-abhängige und -unabhängige Aktivierung des Zyklin D1 Promotors durch AML1-ETO. Vergleich der Zyklin D1 Promotoraktivität mit Promotorfragmenten mit Mutationen in den TCF-Bindungsstellen 0-4.

3.8 Zyklin D1 fördert das Koloniewachstum und die Proliferation von 32 D Zellen

Zur Analyse des Koloniewachstum von 32 D Zellen wurde eine stabile Zelllinie aus der murinen myeloischen Vorläuferzelllinie 32D und dem Vektor Zyklin D1 hergestellt. Dargestellt sind Kolonie-Assays mit diesen Zellen, um deren Wachstum und Proliferation zu beobachten. Die 32D Zellen, die Zyklin D1 überexprimierten, zeigten eine 5-fach höhere Koloniebildung als die Kontrollzelllinie (Abb. 13).

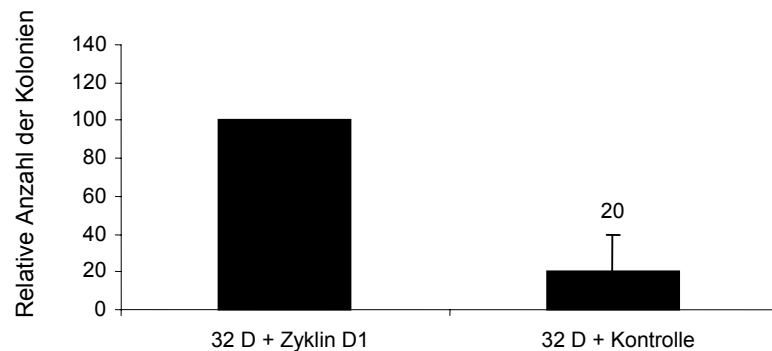


Abbildung 13: Kolonie-Assays: Erhöhtes Koloniewachstum durch Überexpression von Zyklin D1 in 32 D Zellen

Um den Einfluss verschiedener Serumkonzentrationen zu untersuchen, transfizierten wir 32D Zellen transient mit Zyklin D1 und führten nach 24h Kolonie-Assays mit unterschiedlichen Konzentrationen von Serum (5%, 10%, 20%) durch. Der Versuch in Abbildung 14 zeigt, dass auch hier die Zellen mit Zyklin D1 signifikant mehr Kolonien bildeten als die Kontrollzelllinie. Dies gilt für alle verwendeten FCS Konzentrationen.

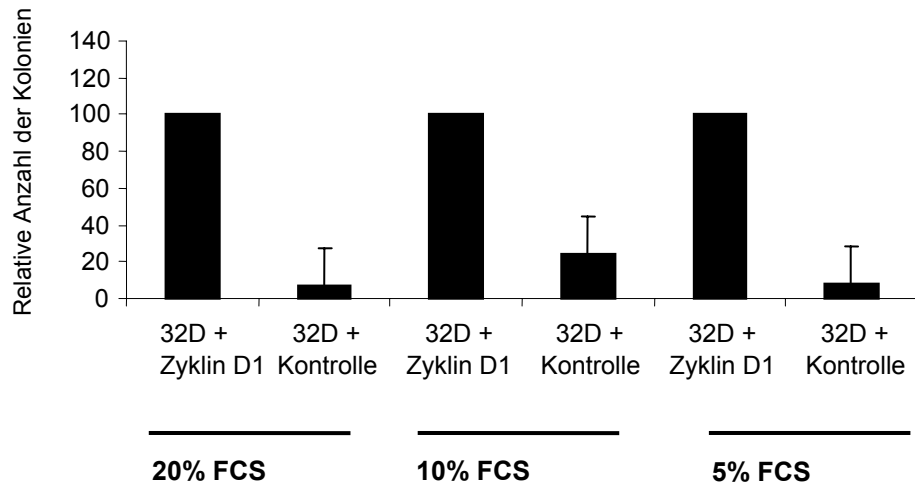


Abbildung 14: Kolonie-Assays: Kein Einfluss von FCS auf das Koloniewachstum in mit Zyklin D1 transient transfizierten 32 D Zellen

Die Zellen mit Zyklin D1 zeigen nicht nur eine quantitativ höhere Koloniebildung, sondern die einzelnen Kolonien waren auch deutlich größer. Dies ist in Abbildung 15 dargestellt.

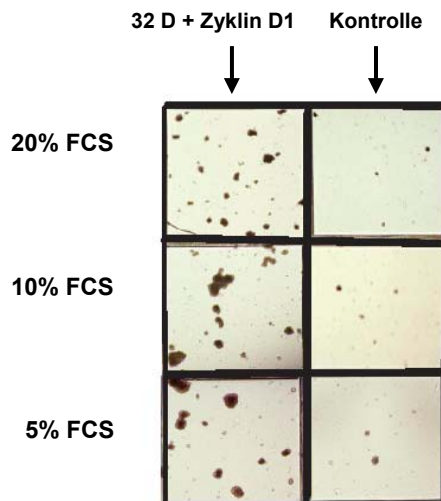


Abbildung 15: Kolonie-Assays 32D mit Zyklin D1 im Vergleich zur Kontrollzelllinie

In einem weiteren Versuch untersuchte ich das Proliferationsverhalten der stabilen Zelllinie 32D mit Zyklin D1 (Abb. 16). Abgebildet ist hier die Analyse mittels eines Proliferationsassays. Durch den Einbau von radioaktiv markiertem $^3\text{[H]Thymidin}$ ließen sich Rückschlüsse über das Proliferationsverhalten der Zyklin D1 positiven Leukämiezellen ziehen. Die 32D Zellen mit Zyklin D1 zeigen einen deutlich höheren Einbau von radioaktiv markiertem $^3\text{[H]Thymidin}$. Hier ist die relative Thymidininkorporation dargestellt im Vergleich zu den 32D Zellen der Kontrollzelllinie mit dem Leervektor pcDNA3.

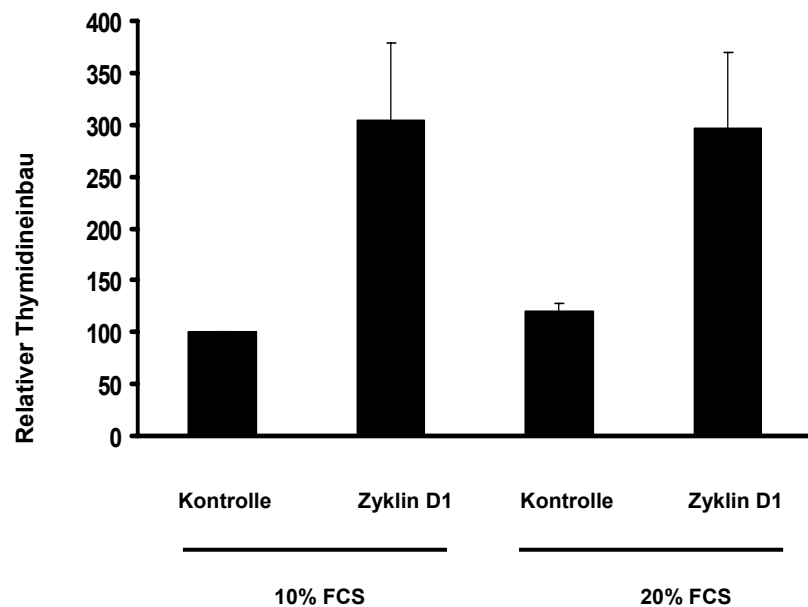


Abbildung 16: $^3\text{(H)}$ Thymidinassays mit den stabilen Zelllinien. Zellen mit erhöhtem Zyklin D1 zeigen eine erhöhte Proliferationsrate

3.9 Zyklin D1 fördert den Übergang von der G1 zur S-Phase

Zyklin D1 ist als Zellzyklusregulator ein wichtiges Onkogen in der Pathogenese verschiedener Krebserkrankungen. Es regelt den Übergang der Zellen von der G1 in die S Phase innerhalb des Zellzyklus. Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob Zyklin D1 diesen Effekt auch in der myeloischen Mauszelllinie aufweist.

Die Abbildung 17 zeigt die stabile Zelllinie 32D mit Zyklin D1 im Vergleich zur Kontrollzelllinie 32D mit dem Leervektor. Bei den Zyklin D1 positiven Zellen befanden sich etwa 40% in der G1 Phase, während die Kontrollzelllinie einen Populationsanteil von ca. 46% in G1 aufwies. In der S Phase fanden wir von den 32D Zellen mit Zyklin D1 ca. 43%. In der Kontrolle waren es 33%. Die G2 Phase oder die Mitose durchliefen etwa 15% der Zyklin D1 überexprimierenden Zellen. In dieser Phase befanden sich ca. 13% der Kontrollzellen. Zusammenfassend kann man sagen, dass sich bei den Zellen 32D mit Zyklin D1 mehr Zellen in der S Phase befanden als in den Kontrollzellen.

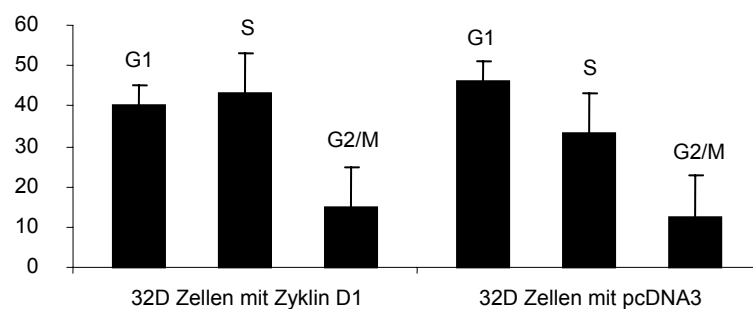


Abbildung 17: Zellzyklusanalyse: Zellen mit Überexpression von Zyklin D1 befinden sich mehr in der S-Phase des Zellzyklus

4. Diskussion

Bei der AML finden sich gehäuft chromosomale Translokationen myeloischer Transkriptionsfaktoren wie z.B. die Translokation t(8;21), welche zur Bildung von Fusionsproteinen wie AML1-ETO führen. Dadurch werden Zielgene reprimiert, die für die Differenzierung myeloischer Zellen erforderlich sind. Vorausgegangene Untersuchungen haben gezeigt, daß AML1-ETO den Wnt-Signalweg über Expression von Plakoglobin (γ -Catenin) aktiviert und darüber die Expression von Zyklin D1 induziert [53]. Die vorliegende Arbeit wurde mit dem Ziel durchgeführt, eine direkte (Wnt-unabhängige) Regulation des Zellzyklusregulators Zyklin D1 durch AML1-ETO zu untersuchen. Es konnte die DNA-Bindung von AML1-ETO an den Zyklin D1-Promotor und die transkriptionelle Induktion von Zyklin D1 in Zelllinien und in Patientenmaterial gezeigt werden.

4.1 Die Induktion von Zyklin D1 durch AML1-ETO

Die Induktion von Zyklin D1 durch AML1-ETO wurde in mehreren Experimenten näher untersucht. In menschlichen Leukämiezelllinien konnte mittels Westernblot gezeigt werden, dass die Expression von AML1-ETO zu einer erhöhten Expression von Zyklin D1 führt, während ohne AML-ETO-Expression die gesteigerte Zyklin D1-Expression ausbleibt (Abb. 5). Dies gilt auch für zwei andere Leukämie-typische Translokationsprodukte, PML-RAR α und PLZF-RAR α (Abb.5). Auch in einem induzierbaren Zelllinienmodell konnte die erhöhte Expression von Zyklin D1 als Folge der Tetrazyklin-induzierten AML1-ETO Expression gezeigt werden (Abb. 6). Diese Ergebnisse bestätigen vorherige Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe [53]. Aus diesen Ergebnissen (Abb. 5 und 6) kann keine Aussage getroffen werden, ob die erhöhte Zyklin D1-Expression Wnt-Signalweg-abhängig [53] oder -unabhängig erfolgt. Ob die erhöhte Zyklin D1 Expression transkriptionell, translational oder posttranslational (z.B. durch Proteinstabilisierung) reguliert ist können die Ergebnisse aus Abb. 5 und 6 nicht unterscheiden und wurde im Folgenden untersucht.

4.2 Transkriptionelle Regulation von Zyklin D1 durch AML1-ETO

Da sowohl AML1 als auch AML1-ETO Transkriptionsfaktoren sind, haben sich die nachfolgenden Experimente zunächst auf die transkriptionelle Regulation von Zyklin D1 beschränkt. Während AML1 die Transkription vieler Zielgene durch Rekrutierung von Histonazetyltransferasen aktiviert, werden durch AML1-ETO Co-Repressoren und Histondeazetylasen an die DNA rekrutiert [45] und somit die Transkription von zahlreichen Zielgenen verhindert. Allerdings ist für Zyklin D2 und D3, zwei Familienmitglieder der D-Zykline, eine Induktion durch AML1-ETO auf transkriptioneller Ebene bereits beschrieben [5].

Zunächst wurden primäre Blasten von Patienten mit neu diagnostizierter AML untersucht. Aus den Blasten wurde RNA isoliert und die mRNA in cDNA umgeschrieben. Aus der cDNA wurde die Expression mittels quantitativer PCR (Taqman) bestimmt. Für die Patientenproben war der zytogenetische Befund vorhanden. In diesen Untersuchungen konnte eine stark erhöhte Zyklin D1 Expressionen bei den vier Patienten mit einer Translokation t(8;21) gezeigt werden (Abb. 7). Dies war ein wichtiger Hinweis, dass bei der AML1-ETO-positiven AML die Regulation der Zyklin D1- Expression auf transkriptioneller Ebene erfolgt.

Interessanterweise fand sich bei zwei weiteren Patienten eine hohe Zyklin D1 Expression (Abb. 7). Einer dieser Patienten wies zwei AML1-Mutationen auf (Abb. 8), was ein Hinweis auf einen ähnlichen transkriptionellen Effekt wie durch AML1-ETO sein könnte.

4.3 AML1-ETO bindet und aktiviert den Zyklin D1 Promotor

Die Expressionsdaten aus Abb. 7 legten die Vermutung einer Bindung von AML1-ETO an den Zyklin D1 Promotor nahe. Deshalb wurden Chromatin-Immunopräzipitationen (ChIP) durchgeführt. Hier konnten wir eine Bindung von AML1-ETO an den Zyklin D1 Promotor *in vivo* bestätigen (Abb. 9). Ob die Bindung allerdings direkt (d.h. direkte DNA-Bindung von AML1-ETO an den Zyklin D1 Promotor) oder indirekt (AML1-ETO als Teil eines großen Komplexes, welcher den Zyklin D1 Promoter bindet) erfolgt, kann anhand der

ChIP aus Abb. 9 nicht unterschieden werden. Es wurden deshalb weiterführende Promotoranalysen angeschlossen.

Um zu untersuchen, ob die DNA-Bindung eine funktionelle Relevanz für die Aktivierung des Zyklin D1 Promotors hat wurden deshalb Promotoranalysen mittels Luciferase Assays durchgeführt (Abb. 10). Innerhalb dieser systematischen Versuchsreihe (Übersicht Abb. 10g) wurden unterschiedlich lange Promotorfragmente verwendet um den gesamten Zyklin D1 Promotor auf das DNA-Fragment einzugrenzen, über welches AML1-ETO den Zyklin D1 Promotor tatsächlich aktiviert. Diese Untersuchungen zeigten, dass das relevante Promotorfragment aus 44 Basenpaaren zwischen -217 und -261 5' zum transkriptionellen Startcodon des Promotors besteht (Abb. 10 c und d). Den Promotorexperimenten ist weiterhin zu entnehmen, dass der Zyklin D1 Promotor zwar von AML1-ETO aktiviert wird, nicht aber von Wildtyp-AML1.

4.4 Die Rolle der AML1 Mutationen auf die Expression von Zyklin D1

Bei einem von zwei Patienten mit hoher Zyklin D1-Expression aber ohne die Translokation t(8;21) fanden wir zwei Mutationen im AML1-Gen. Dieser Patient hatte eine AML FAB-Typ M0. Zum einen fand sich eine Punktmutation in der RUNT-Domäne des AML1 Gens, die zu einem Austausch von Asparagin durch Lysin führt (AML1-Mutation 1). Ähnliche Mutationen sind bei der AML FAB-Typ M0 bereits beschrieben worden [74]. Durch die zweite Punktmutation wird ein Stopkodon eingeführt, wodurch die Proteinsequenz vorzeitig abbricht und die transaktivierende Domäne fehlt (AML1-Mutation 2). Es kann postuliert werden dass die AML1-Mutationen die transkriptionelle Wirkung beeinflussen. Allerdings zeigten unsere Promotoranalysen, dass der Zyklin D1 Promotor zwar von AML1-ETO nicht jedoch von Wildtyp-AML1 und AML1-Mutationen 1 und 2 aktiviert wurde (Abb. 11). Dies belegt einen grundsätzlich anderen Mechanismus der Zyklin D1-Induktion zwischen AML1-ETO und AML1-Mutationen. Die Bedeutung der Mutationen im AML1-Gen für die hohe beobachtete Zyklin D1-Expression in primären Blasten (Abb. 7) blieb damit ungeklärt.

4.5 Wnt-unabhängige Expression von Zyklin D1 durch AML1-ETO

Anhand der ChIP-Analysen aus Abb. 9 sowie den Promotorstudien aus Abb. 10 kann ein Beitrag von TCF-LEF auf den Zyklin D1-Promotor nicht beurteilt werden. Dies ist insofern von Relevanz, als dass vorausgegangene Untersuchungen der Arbeitsgruppe gezeigt haben, daß AML1-ETO den Wnt-Signalweg über Expression von Plakoglobin (γ -Catenin) aktiviert und darüber die Expression von Zyklin D1 induziert [53]. Es wurden deshalb in der vorliegenden Arbeit Promotorstudien mit und ohne Bindungsmutationen in der TCF/LEF-Bindungsstelle des Zyklin D1 Promotors durchgeführt (Abb.12). Trotz Mutation der TCF/LEF-Bindungsstelle fand eine Zyklin D1 Promotoraktivierung durch AML1-ETO statt, so dass diese demzufolge auch Wnt-unabhängig erfolgt.

Plakoglobin alleine konnte, wie erwartet, den TCF/LEF-bindungsdefekten Promotor nicht aktivieren, da hierzu TCF/LEF Bindungsstellen notwendig sind (Abb. 12). Zusammenfassend belegt Abb.12 eine Wnt-unabhängige transkriptionale Regulation von AML1-ETO auf Zyklin D1.

4.6 Biologische Relevanz von Zyklin D1 für myeloische Zellen

Nachdem der Einfluß von AML1-ETO auf Zyklin D1 untersucht und dokumentiert wurde, stellte sich die Frage nach der biologischen Relevanz. Daher wurde im Folgenden der Einfluss von Zyklin D1 auf die Proliferation, das Koloniewachstum und den Zellzyklus zellbiologisch untersucht.

4.6.1 Proliferation und Transformation

Da für Zyklin D1 ein Einfluss auf die Proliferation bekannt ist und dieser auch für myeloischen Zellen postuliert werden kann, wurde ein Zellsystem zur näheren zellbiologischen Charakterisierung etabliert. Zunächst wurde eine stabil exprimierende murine myeloische Vorläuferzelllinie (32D) mit einem Zyklin D1-Expressionsplasmid hergestellt und deren Wachstumsverhalten untersucht. Die Koloniebildung in semi-solider Methylcellulose ist ein anerkanntes Maß für die *in vitro* Transformation. Die Zyklin D1 überexprimierende 32D-Zelllinie zeigte eine 5-fach höhere Koloniebildung im Vergleich zu einer Kontrollzelllinie (Abb. 13). Die gesteigerte Proliferation

zeigte sich nicht nur in der höheren Anzahl der Kolonien sondern auch in einer signifikant gesteigerten Größe der einzelnen Kolonien. Da bei stabil transfizierten Zelllinien zusätzliche genetische Abberationen auftreten können wurden diese Versuche auch im transient transfizierten 32D-Zellsystem wiederholt (Abb. 14a). Diese Versuche bestätigten die Ergebnisse mit stabil exprimierenden Zellen. Insbesondere die gesteigerte Größe der einzelnen Kolonien (Abb. 14b) legt eine deutliche Zunahme der Proliferation bei Überexpression von Zyklin D1 nahe.

Die Untersuchungen zum Proliferationsverhalten mittels $^3\text{[H]Thymidin}$ Assays ergaben einen 3-fach höheren Einbau des radioaktiv markierten Thymidins in den Zyklin D1 überexprimierenden Zelllinien (Abb. 15). Diese gesteigerte Proliferation bestätigte die Beobachtung, die sich aus den Kolonie-Assays ergab. Damit zeigte sich auch in myeloischen Zellen ein Wachstumsvorteil durch die Überexpression von Zyklin D1 gegenüber der Kontrollzelllinie. Dieser Proliferations- und Transformationsvorteil wurde zuvor in zahlreichen epithelialen und mesenchymalen Zellsystemen gezeigt [69] und konnten in der vorliegenden Arbeit auf die myeloische Zellreihe übertragen werden.

4.6.2 Zellzyklus

Um die Proliferationssteigerung genauer zu analysieren wurde der Zellzyklus der 32D Zelllinie mit und ohne Zyklin D1-Überexpression untersucht. Wie im Einleitungsabschnitt ausgeführt, führt Zyklin D1 zu einer vermehrten Phosphorylierung des Tumorsupressorproteins Rb und damit zur Freisetzung von E2F (Abb. 3 und 4). Dadurch wird der Restriktionspunkt des Zellzyklus leichter überschritten und die Zelle kann in die S-Phase des Zellzyklus eintreten.

Die Ergebnisse der Zellzyklusanalysen bestätigten diesen Effekt im myeloischen Zellsystem (Abb 16). Es zeigte sich, dass die Zyklin D1-überexprimierende Zelllinie schneller als die Kontrollzelllinie den Restriktionspunkt nach der G1-Phase überschreitet und in die S-Phase eintritt (Abb. 16).

4.7 Bedeutung von Zyklin D1 bei der AML im Vergleich zu soliden Tumoren

Bei einer Vielzahl solider Tumore (Mammakarzinom, Ovarialkarzinom) sowie auch beim Mantelzelllymphom ist die pathogenetische Bedeutung von Zyklin D1 bereits hinreichend erforscht und bekannt [9,54,4,19,79,42,84]. Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Daten legen jedoch nahe, daß auch bei der AML dieses sehr potente Onkogen eine größere Rolle in der Leukämogenese spielt als bisher angenommen.

4.8 Zusammenfassung und Ausblick

Somit lässt sich zusammenfassend sagen dass Zyklin D1 wesentlich in myeloischen Vorläuferzellen den Zellzyklus beeinflusst und dies einen entscheidenden Proliferations- und Transformationsvorteil bietet. AML1-ETO führt somit nicht nur zu dem gut dokumentierten Differenzierungsblock sondern bestimmt entscheidend das replikative Potenzial myeloischer Vorläuferzellen. Dies lässt Zweifel an der „zwei Hit“-Hypothese, nach der sich onkogene Translokationsprodukte wie AML1-ETO ausschließlich auf den Differenzierungsblock auswirken, aufkommen [72].

Obwohl in den letzten Jahren große Fortschritte zum Verständnis der Pathogenese der AML gemacht wurden, die die Entwicklung wirksamer Therapieverfahren ermöglichen bleibt die Prognose der Erkrankung ungünstig. Die hohe Toxizität der eingesetzten Chemotherapeutika und ihre unselektive Wirkweise sind oft dosislimitierend. Die Entwicklung komplementärer Medikamente, die auf molekularer Ebene und damit selektiver auf die Tumorzellen wirken wird daher in den nächsten Jahren weiterhin Gegenstand der Forschung sein [72].

Die genaueren Kenntnisse über die Zusammenhänge von AML1-ETO und Zyklin D1 in Leukämiezellen könnten die Basis zur Entwicklung weiterer Therapiestrategien bilden. Wäre es möglich auf die Induktion von Zyklin D1 in AML Blasten mit der Translokation t(8;21) einen hemmenden Einfluss zu nehmen könnte die gesteigerte Proliferation der Zellen gebremst und dadurch das Fortschreiten der Erkrankung Einhalt geboten werden. Denkbar wäre z.B.

der Einsatz von Inhibitoren der Zyklin-abhängigen Kinasen wie CDK4 und CDK6. So ließe sich die gesteigerte Zyklin D1 abhängige Proliferation in myeloischen Blasten hemmen und spezifisch das Wachstum maligner Zellen bremsen.

Literaturverzeichnis

1. Adamson, R.H. and S.M. Seiber, *Chemically induced leukemia in humans*. Environ Health Perspect, 1981. **39**: p. 93-103.
2. Albanese, C., et al., *Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the Zyklin D1 promoter through distinguishable regions*. J Biol Chem, 1995. **270**(40): p. 23589-97.
3. Amann, J.M., et al., *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**(19): p. 6470-83.
4. Barnes, D.M. and C.E. Gillett, *Zyklin D1 in breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 1998. **52**(1-3): p. 1-15.
5. Bernardin-Fried, F., et al., *AML1/RUNX1 increases during G1 to S cell cycle progression independent of cytokine-dependent phosphorylation and induces Zyklin D3 gene expression*. J Biol Chem, 2004. **279**(15): p. 15678-87.
6. Buchner, T., et al., *Intensified induction and consolidation with or without maintenance chemotherapy for acute myeloid leukemia (AML): two multicenter studies of the German AML Cooperative Group*. J Clin Oncol, 1985. **3**(12): p. 1583-9.
7. Cappellini, A., et al., *The phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway regulates cell cycle progression of HL60 human leukemia cells through cytoplasmic relocalization of the Zyklin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) and control of Zyklin D1 expression*. Leukemia, 2003. **17**(11): p. 2157-67.
8. Classon, M. and N. Dyson, *p107 and p130: versatile proteins with interesting pockets*. Exp Cell Res, 2001. **264**(1): p. 135-47.
9. de Boer, C.J., et al., *Zyklin D1 protein analysis in the diagnosis of mantle cell lymphoma*. Blood, 1995. **86**(7): p. 2715-23.
10. Downing, J.R., *The AML1-ETO chimaeric transcription factor in acute myeloid leukaemia: biology and clinical significance*. Br J Haematol, 1999. **106**(2): p. 296-308.
11. Downing, J.R., *AML1/CBFbeta transcription complex: its role in normal hematopoiesis and leukemia*. Leukemia, 2001. **15**(4): p. 664-5.
12. Erickson, P., et al., *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**(7): p. 1825-31.
13. Erickson, P.F., et al., *The ETO portion of acute myeloid leukemia t(8;21) fusion transcript encodes a highly evolutionarily conserved, putative transcription factor*. Cancer Res, 1994. **54**(7): p. 1782-6.
14. Fenski, R., et al., *Constitutive activation of FLT3 in acute myeloid leukaemia and its consequences for growth of 32D cells*. Br J Haematol, 2000. **108**(2): p. 322-30.
15. Frank, R., et al., *The AML1/ETO fusion protein blocks transactivation of the GM-CSF promoter by AML1B*. Oncogene, 1995. **11**(12): p. 2667-74.

16. Frank, R.C., et al., *The t(8;21) fusion protein, AML1/ETO, transforms NIH3T3 cells and activates AP-1*. *Oncogene*, 1999. **18**(9): p. 1701-10.
17. Gao, J., et al., *Isolation of a yeast artificial chromosome spanning the 8;21 translocation breakpoint t(8;21)(q22;q22.3) in acute myelogenous leukemia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(11): p. 4882-6.
18. Gillett, C.E. and D.M. Barnes, *Demystified ... cell cycle*. *Mol Pathol*, 1998. **51**(6): p. 310-6.
19. Gillett, C.E., et al., *Zyklin D1 and associated proteins in mammary ductal carcinoma in situ and atypical ductal hyperplasia*. *J Pathol*, 1998. **184**(4): p. 396-400.
20. Gilliland, D.G., *Molecular genetics of human leukemias: new insights into therapy*. *Semin Hematol*, 2002. **39**(4 Suppl 3): p. 6-11.
21. Gingras, A.C., et al., *4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway*. *Genes Dev*, 1998. **12**(4): p. 502-13.
22. Goddard, A.D., et al., *Characterization of a zinc finger gene disrupted by the t(15;17) in acute promyelocytic leukemia*. *Science*, 1991. **254**(5036): p. 1371-4.
23. Gossen, M. and H. Bujard, *Tight control of gene expression in mammalian cells by tetraZyklone-responsive promoters*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(12): p. 5547-51.
24. Grunstein, M., *Histone acetylation in chromatin structure and transcription*. *Nature*, 1997. **389**(6649): p. 349-52.
25. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. *Cell*, 2000. **100**(1): p. 57-70.
26. Holcombe, R.F., et al., *Expression of Wnt ligands and Frizzled receptors in colonic mucosa and in colon carcinoma*. *Mol Pathol*, 2002. **55**(4): p. 220-6.
27. Huang, M.E., et al., *Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia*. *Blood*, 1988. **72**(2): p. 567-72.
28. Hutter, G., et al., *Differential effect of epigenetic alterations and genomic deletions of CDK inhibitors [p16(INK4a), p15(INK4b), p14(ARF)] in mantle cell lymphoma*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2006. **45**(2): p. 203-10.
29. Ichimaru, M., T. Ishimaru, and J.L. Belsky, *Incidence of leukemia in atomic bomb survivors belonging to a fixed cohort in Hiroshima and Nagasaki, 1950--71. Radiation dose, years after exposure, age at exposure, and type of leukemia*. *J Radiat Res (Tokyo)*, 1978. **19**(3): p. 262-82.
30. Jaroslav, P., et al., *Expression of Zyklins D1, D2, and D3 and Ki-67 in Leukemia*. *Leuk Lymphoma*, 2005. **46**(11): p. 1605-1612.
31. John, P.C., M. Mews, and R. Moore, *Zyklin/Cdk complexes: their involvement in cell cycle progression and mitotic division*. *Protoplasma*, 2001. **216**(3-4): p. 119-42.
32. Johnson, D.G. and R. Schneider-Broussard, *Role of E2F in cell cycle control and cancer*. *Front Biosci*, 1998. **3**: p. d447-8.
33. Kaelin, W.G., Jr., *Functions of the retinoblastoma protein*. *Bioessays*, 1999. **21**(11): p. 950-8.

34. Kania, M.A., et al., *The Drosophila segmentation gene runt encodes a novel nuclear regulatory protein that is also expressed in the developing nervous system*. *Genes Dev*, 1990. **4**(10): p. 1701-13.
35. Keyomarsi, K. and T.W. Herliczek, *The role of Zyklin E in cell proliferation, development and cancer*. *Prog Cell Cycle Res*, 1997. **3**: p. 171-91.
36. Kitabayashi, I., et al., *The AML1-MTG8 leukemic fusion protein forms a complex with a novel member of the MTG8(ETO/CDR) family, MTGR1*. *Mol Cell Biol*, 1998. **18**(2): p. 846-58.
37. Knudsen, K.E., et al., *Zyklin D1: polymorphism, aberrant splicing and cancer risk*. *Oncogene*, 2006. **25**(11): p. 1620-8.
38. Langabeer, S.E., et al., *Incidence of AML1/ETO fusion transcripts in patients entered into the MRC AML trials*. *MRC Adult Leukaemia Working Party*. *Br J Haematol*, 1997. **99**(4): p. 925-8.
39. Langabeer, S.E., et al., *Frequency of CBF beta/MYH11 fusion transcripts in patients entered into the U.K. MRC AML trials*. *The MRC Adult Leukaemia Working Party*. *Br J Haematol*, 1997. **96**(4): p. 736-9.
40. Langabeer, S.E., et al., *Mutations of the AML1 gene in acute myeloid leukemia of FAB types M0 and M7*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2002. **34**(1): p. 24-32.
41. Lenny, N., S. Meyers, and S.W. Hiebert, *Functional domains of the t(8;21) fusion protein, AML-1/ETO*. *Oncogene*, 1995. **11**(9): p. 1761-9.
42. Loden, M., et al., *The Zyklin D1 high and Zyklin E high subgroups of breast cancer: separate pathways in tumorigenesis based on pattern of genetic aberrations and inactivation of the pRb node*. *Oncogene*, 2002. **21**(30): p. 4680-90.
43. Look, A.T., *Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias*. *Science*, 1997. **278**(5340): p. 1059-64.
44. Malumbres, M. and A. Pellicer, *RAS pathways to cell cycle control and cell transformation*. *Front Biosci*, 1998. **3**: p. d887-912.
45. Mao, S., et al., *Functional and physical interactions between AML1 proteins and an ETS protein, MEF: implications for the pathogenesis of t(8;21)-positive leukemias*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(5): p. 3635-44.
46. Matanoski, G.M., et al., *The current mortality rates of radiologists and other physician specialists: specific causes of death*. *Am J Epidemiol*, 1975. **101**(3): p. 199-210.
47. Melnick, A., et al., *Identification of novel chromosomal rearrangements in acute myelogenous leukemia involving loci on chromosome 2p23, 15q22 and 17q21*. *Leukemia*, 1999. **13**(10): p. 1534-8.
48. Meyers, S., N. Lenny, and S.W. Hiebert, *The t(8;21) fusion protein interferes with AML-1B-dependent transcriptional activation*. *Mol Cell Biol*, 1995. **15**(4): p. 1974-82.
49. Miller, M.E. and F.R. Cross, *Zyklin specificity: how many wheels do you need on a unicycle?* *J Cell Sci*, 2001. **114**(Pt 10): p. 1811-20.

50. Miyoshi, H., et al., *t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(23): p. 10431-4.
51. Mizuki, M., et al., *Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways*. Blood, 2000. **96**(12): p. 3907-14.
52. Moore, M.A., *Converging pathways in leukemogenesis and stem cell self-renewal*. Exp Hematol, 2005. **33**(7): p. 719-37.
53. Muller-Tidow, C., et al., *Translocation products in acute myeloid leukemia activate the Wnt signaling pathway in hematopoietic cells*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(7): p. 2890-904.
54. Nakamura, S., Y. Yatabe, and M. Seto, *Zyklusin D1 overexpression in malignant lymphomas*. Pathol Int, 1997. **47**(7): p. 421-9.
55. Nisson, P.E., P.C. Watkins, and N. Sacchi, *Transcriptionally active chimeric gene derived from the fusion of the AML1 gene and a novel gene on chromosome 8 in t(8;21) leukemic cells*. Cancer Genet Cytogenet, 1992. **63**(2): p. 81-8.
56. Ortega, S., M. Malumbres, and M. Barbacid, *Zyklusin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1602**(1): p. 73-87
57. Peterson, L.F. and D.E. Zhang, *The 8;21 translocation in leukemogenesis*. Oncogene, 2004. **23**(24): p. 4255-62.
58. Piard, F., et al., *[Genetic pathways in colorectal cancer: interest for the pathologist]*. Ann Pathol, 2002. **22**(4): p. 277-88.
59. Polakis, P., *Wnt signaling and cancer*. Genes Dev, 2000. **14**(15): p. 1837-51.
60. Rimokh, R., et al., *Rearrangement and overexpression of the BCL-1/PRAD-1 gene in intermediate lymphocytic lymphomas and in t(11q13)-bearing leukemias*. Blood, 1993. **81**(11): p. 3063-7.
61. Rosenwald, I.B., et al., *Eukaryotic translation initiation factor 4E regulates expression of Zyklusin D1 at transcriptional and post-transcriptional levels*. J Biol Chem, 1995. **270**(36): p. 21176-80.
62. Roumier, C., et al., *M0 AML, clinical and biologic features of the disease, including AML1 gene mutations: a report of 59 cases by the Groupe Francais d'Hematologie Cellulaire (GFHC) and the Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique (GFCH)*. Blood, 2003. **101**(4): p. 1277-83.
63. Roussel, M.F., *The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer*. Oncogene, 1999. **18**(38): p. 5311-7.
64. Rowley, J.D., *Chromosomal patterns in myelocytic leukemia*. N Engl J Med, 1973. **289**(4): p. 220-1.
65. Ruchlemer, R., et al., *B-prolymphocytic leukaemia with t(11;14) revisited: a splenomegalic form of mantle cell lymphoma evolving with leukaemia*. Br J Haematol, 2004. **125**(3): p. 330-6.
66. Severson, R.K., et al., *Cigarette smoking and acute nonlymphocytic leukemia*. Am J Epidemiol, 1990. **132**(3): p. 418-22.
67. Sherr, C.J., *Cancer cell cycles*. Science, 1996. **274**(5293): p. 1672-7.

68. Sherr, C.J., *The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited*. *Cancer Res*, 2000. **60**(14): p. 3689-95.
69. Sherr, C.J., *Cell cycle control and cancer*. Harvey Lect, 2000. **96**: p. 73-92.
70. Shimizu, K., et al., *Consistent disruption of the AML1 gene occurs within a single intron in the t(8;21) chromosomal translocation*. *Cancer Res*, 1992. **52**(24): p. 6945-8.
71. Slack, J.L. and R.E. Gallagher, *The molecular biology of acute promyelocytic leukemia*. *Cancer Treat Res*, 1999. **99**: p. 75-124.
72. Steffen, B., et al., *Specific protein redirection as a transcriptional therapy approach for t(8;21) leukemia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(14): p. 8448-53.
73. Steffen, B., et al., *The molecular pathogenesis of acute myeloid leukemia*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2005. **56**(2): p. 195-221.
74. Taketani, T., et al., *AML1/RUNX1 mutations are infrequent, but related to AML-M0, acquired trisomy 21, and leukemic transformation in pediatric hematologic malignancies*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2003. **38**(1): p. 1-7.
75. Tallman, M.S. and P.H. Wiernik, *Retinoids in cancer treatment*. *J Clin Pharmacol*, 1992. **32**(10): p. 868-88.
76. Tamrakar, S., E. Rubin, and J.W. Ludlow, *Role of pRB dephosphorylation in cell cycle regulation*. *Front Biosci*, 2000. **5**: p. D121-37.
77. Tenen, D.G., et al., *Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia*. *Blood*, 1997. **90**(2): p. 489-519.
78. Tetsu, O. and F. McCormick, *Beta-catenin regulates expression of Zyklin D1 in colon carcinoma cells*. *Nature*, 1999. **398**(6726): p. 422-6.
79. Troussard, X., et al., *Zyklin D1 expression in patients with multiple myeloma*. *Hematol J*, 2000. **1**(3): p. 181-5.
80. Vidal, A. and A. Koff, *Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause*. *Gene*, 2000. **247**(1-2): p. 1-15.
81. Weber, J.D., et al., *Ras-stimulated extracellular signal-related kinase 1 and RhoA activities coordinate platelet-derived growth factor-induced G1 progression through the independent regulation of Zyklin D1 and p27*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(52): p. 32966-71
82. Williams, M.E., et al., *Chromosome 11 translocation breakpoints at the PRAD1/Zyklin D1 gene locus in centrocytic lymphoma*. *Leukemia*, 1993. **7**(2): p. 241-5.
83. Wingo, P.A., T. Tong, and S. Bolden, *Cancer statistics, 1995*. *CA Cancer J Clin*, 1995. **45**(1): p. 8-30.
84. Yang, C.C., et al., *Expression of p16 and Zyklin D1 in bladder cancer and correlation in cancer progression*. *Urol Int*, 2002. **69**(3): p. 190-4.
85. Yokota, S., et al., *Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines*. *Leukemia*, 1997. **11**(10): p. 1605-9.

86. Zhurinsky, J., M. Shtutman, and A. Ben-Ze'ev, *Plakoglobin and beta-catenin: protein interactions, regulation and biological roles*. J Cell Sci, 2000. **113 (Pt 18)**: p. 3127-39.

Persönliche Angaben

Geburtsdatum :	18.August 1978
Geburtsort :	Münster
Nationalität :	deutsch
Konfession :	römisch-katholisch
Eltern :	Dr.med. Ingrid Kim-Hiller, Ärztin Prof.Dr. Albert Mu-Yon Kim, Univ.-Prof., M.Sc., Humangenetiker, i.R.

Schulische Ausbildung

1984 - 1988	Katholische Grundschule Havixbeck
1988 - 1998	Gymnasium Paulinum Münster
1997	Teilnahme am Bundeswettbewerb "Jugend Forscht "
1998	Allgemeine Hochschulreife

Universitäre Ausbildung

1999 - 2005	Studium der Humanmedizin an der Universität Witten/Herdecke
-------------	--

Examina

03/01	Physikum
03/02	Erstes medizinisches Staatsexamen
08/04	Zweites medizinisches Staatsexamen
10/05	Drittes medizinisches Staatsexamen
10/05	Approbation als Ärztin

Berufliche Tätigkeit

Ab 05/06	Assistenzärztin in der II. Medizinischen Klinik des St. Franziskus-Hospitals in Münster
----------	---

Danksagung

Im Folgenden möchte mich bei den Menschen bedanken, ohne die diese Arbeit niemals zustande gekommen wäre:

- **Meinem Betreuer und Freund Björn Steffen** für seine intensive fachliche und menschliche Betreuung sowie für seine ständige Diskussionsbereitschaft
- **Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Carsten Müller-Tidow** für die anspruchsvolle Promotionsthematik, für die hochkarätige und zuverlässige Betreuung und für sein Vertrauen
- **Prof. Dr. W. E. Berdel** für die Möglichkeit, meine Arbeit in seiner Klinik und den Laboratorien seiner Klinik durchzuführen
- **Allen Kolleginnen und Kollegen** aus dem ICP Labor der Medizinischen Klinik A, von denen ich gelernt habe, molekularbiologisch und zellbiologisch zu arbeiten, und die die Jahre meiner Promotion für mich fachlich und menschlich wertvoll gemacht haben.
- **Meinen besten Freunden Dajna Verspohl, Doreen Wandelt, Leila Sultan, Nicola Kückmann, David Schotes, Jacek Prigann und Maren Mönnighoff** danke ich für ihren Glauben an mich, ihre einfühlsame Art und ihr unermüdliches Verständnis, auch wenn ich oft keine Zeit für sie hatte.
- **Mein großer Dank gilt meiner Mutter Dr. med. Ingrid Kim-Hiller und meinem Vater Prof. Dr. phil. Albert Mu-Yon Kim**, die diese Arbeit erst möglich gemacht haben und die beide immer ein großes Vorbild für mich waren. Sie haben mich immer unterstützt und während der Durststrecken dieser Arbeit unermüdlich begleitet.
- **Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Dr. med. Christian Brandts** für seine Geduld in anstrengenden Zeiten der Vielfachbelastung und die Begleitung und Stärkung während dieser entscheidenden Lebensphase. Er hat mich mit seinem Optimismus und mit seinem Glauben an mich immer wieder auf den richtigen Weg gebracht.