

Seite 1

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt
Onkologie/Hämatologie/KMT
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Posttranskriptionelle Expressionshemmung von *ETV6/RUNX1*
durch lentivirale Transduktion mit dem Ribozym buRz28

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Stephan Lobitz

aus Düsseldorf

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. K. Seeger
 2. Priv.-Doz. Dr. med. H. Cario
 3. Priv.-Doz. Dr. med. A. Claviez

Datum der Promotion: 30.11.2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	<i>ETV6 und RUNX1</i>	6
1.2	<i>ETV6 (TEL) als transkriptioneller Repressor</i>	6
1.3	<i>RUNX1 (CBFα2, AML1) als transkriptioneller Organisator</i>	7
1.4	<i>Hammerhead-Ribozyme</i>	9
1.5	<i>Retrovirale Nukleinsäurevektoren</i>	10
1.6	<i>Konditioneller lentiviraler shRNA-Vektor</i>	12
2	Aufgabenstellung	15
2.1	<i>Hammerhead-Ribozym gegen ETV6/RUNX1</i>	15
2.2	<i>Lentiviraler Ribozymtransfer</i>	15
2.3	<i>Die Fibroblastenzelllinie HT-1080</i>	16
2.4	<i>Fragestellung und Arbeitsschritte</i>	16
3	Materialien und Methoden	18
3.1	<i>Materialien</i>	18
3.1.1	<i>Chemikalien und Enzyme</i>	18
3.1.2	<i>Plasmide</i>	18
3.1.3	<i>Oligonukleotide</i>	31
3.1.4	<i>Zellen</i>	31
3.1.5	<i>Medien und Zusätze</i>	32
3.2	<i>Methoden</i>	32
3.2.1	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	32
3.2.2	<i>Zellkulturmethoden</i>	38
4	Ergebnisse	48
4.1	<i>Klonierungen</i>	48
4.1.1	<i>Kontrollvektor PRIEG3</i>	48
4.1.2	<i>Kontrollvektor PRIEG7</i>	49
4.1.3	<i>pPRTAEG</i>	50
4.1.4	<i>ETV6/RUNX1-Vektor PRTAIEG7</i>	50
4.1.5	<i>Ribozymvektor LVCT-buRz28</i>	51
4.1.6	<i>Kontrollvektor LVCT-anti-buRz28</i>	51
4.2	<i>Virusproduktion und multiplicity of infection (MOI)</i>	52

4.3	<i>HT-1080-Zellen exprimieren ETV6/RUNX1 nach Transduktion mit PRTAIEG7</i>	52
4.4	<i>LVCT-buRz28 integriert in das HT1080-TA1-Genom</i>	54
4.5	<i>LVCT-anti-buRz28 integriert in das HT1080-TA1-Genom</i>	54
4.6	<i>HT-1080-Zellen exprimieren EGFP nach Transduktion mit LVCT-buRz28 und LVCT-anti-buRz28</i>	55
4.7	<i>Regulation von EGFP durch Doxycyclin</i>	56
4.8	<i>Ribozymale Reduktion (LVCT-buRz28) der ETV6/RUNX1-Expression von HT1080-TA1</i>	57
5	Diskussion	61
5.1	<i>ETV6/RUNX1-Fusion</i>	61
5.2	<i>Auswahl des Vektorsystems</i>	62
5.3	<i>Retroviraler Gentransfer und biologische Sicherheitsaspekte</i>	63
5.4	<i>Auswahl der Modellzelllinie HT-1080</i>	67
5.5	<i>Unterschiedliche Transduktionseffizienzen im Vergleich von PRTAIEG7 zu LVCT-buRz28 und pLVCT-anti-buRz28</i>	68
5.6	<i>Posttranskriptionelle Expressionshemmung von ETV6/RUNX1 durch das lentiviral transferierte Ribozym buRz28</i>	70
5.7	<i>Posttranskriptionelle Expressionshemmung von ETV6/RUNX1: Lentiviral transferiertes buRz28 im Vergleich zu episomalem buRz28 und siRNA</i>	72
5.8	<i>Resumee und Ausblick</i>	72
6	Zusammenfassung	75
7	Lebenslauf	77
8	Publikationsliste	78
9	Erklärung	80
10	Danksagung	81
11	Literaturverzeichnis	82

1 Einleitung

Die Transkriptionsfaktoren ETV6 und RUNX1 sind essenzielle Regulatoren der Hämatopoese. Durch die kryptische chromosomale Translokation t(12;21)(p13;q22), die bei ca. 25% der akuten lymphoblastischen Leukämien (ALL) im Kindesalter nachweisbar ist, entsteht das Fusionsgen *ETV6/RUNX1*, das zur Bildung eines aberranten Fusionsproteins führt. Essenzielle regulatorische Funktionen beider Transkriptionsfaktoren werden dadurch nachhaltig gestört. Die exakten Bedeutungen von ETV6 und RUNX1 in der Hämatopoese sind noch nicht abschließend geklärt. Ebenso ist die Rolle des Fusionsproteins in der Leukämogenese bislang unklar. *ETV6/RUNX1* ist nach gegenwärtigem Kenntnisstand nicht alleine für die maligne Transformation einer Zelle verantwortlich. Es ist vielmehr als *first hit* anzusehen, dem weitere genetische Veränderungen folgen müssen, damit eine Zelle maligne entartet.

Die kontrollierte Stilllegung eines definierten Gens ist eine relevante Strategie sowohl zur Beantwortung grundlagenwissenschaftlicher Fragestellungen als auch zur Therapie bestimmter Infektions- und monogener Erkrankungen. Durch kurze, zur beeinflussten Zielsequenz mehr oder weniger komplementäre RNA-Moleküle kann die Expression von Genen hoch- und herunterreguliert oder vollständig unterdrückt werden. Man bezeichnet diesen in unterschiedlichen Varianten existierenden und auch physiologisch vorkommenden Mechanismus als RNA-Interferenz. Die Methode wurde in den vergangenen Jahren kontinuierlich weiterentwickelt. Inzwischen stehen verschiedene Techniken zum Einbringen regulatorisch wirksamer RNA-Abschnitte in die Zielzellen zur Verfügung. Diese können zum Beispiel mittels lentiviraler Transduktion zur Bildung interferierender RNA-Sequenzen veranlasst werden.

Hammerhead-Ribozyme sind katalytisch wirksame, ebenfalls sehr kurze RNA-Moleküle, die in der Lage sind, definierte RNA-Sequenzen zu schneiden. Sie sind damit potenziell ebenso geeignet, die Expression von Genen posttranskriptionell zu regulieren wie interferierende RNA-Moleküle. Die Länge beider RNA-Entitäten liegt in einer vergleichbaren Größenordnung. Nur wenige Publikationen berichten allerdings über lentiviral vermittelten Ribozymtransfer.

RNA-Interferenzstrategien zur Untersuchung von *ETV6/RUNX1* sind dadurch limitiert, dass sie nur dann spezifisch sein können, wenn sie exakt den *ETV6/RUNX1*-Fusionsbereich als Ziel haben. Alle anderen Sequenzen kommen nicht nur im Fusionsgen sondern auch im zweiten *ETV6*- bzw. im zweiten *RUNX1*-Allel vor. Dies gilt analog

für experimentelle Ansätze, die auf der Verwendung von Ribozymen beruhen. Da sich siRNA-Strategien gegen *ETV6/RUNX1* in der Vergangenheit aber als wenig erfolgreich dargestellt haben, könnte die Stilllegung des Fusionsgens durch ein lentiviral transferiertes, geeignetes Ribozym dennoch ein wichtiges alternatives Verfahren zur RNA-Interferenz sein.

1.1 ETV6 und RUNX1

Durch chromosomale Translokationen werden häufig Gene in ihrer Struktur verändert, die für die normale Entwicklung von Blutzellen essenziell sind¹⁻⁴. Sowohl in myeloischen als auch in lymphoblastischen Leukämien sind die Gene der Transkriptionsfaktoren *ETV6* (*ETS-variant 6*, früher *TEL*) und *RUNX1* (Synonym *CBF α 2*, früher *AML1*) die am häufigsten in chromosomale Translokationen involvierten Genorte¹⁻⁴. Bemerkenswert ist, dass die Gene *ETV6* und *RUNX1* getrennt voneinander an Translokationen in myeloischen Leukämien beteiligt sind, ihre Fusion zu *ETV6/RUNX1* jedoch mit der akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) im Kindesalter assoziiert ist.

1.2 ETV6 (TEL) als transkriptioneller Repressor

Die ETS-Proteine (*E26 transformation-specific sequence*)^{5,6} stellen eine der größten Gruppen signalabhängiger Transkriptionsregulatoren dar, die sowohl in die normale Proliferation und Differenzierung von Zellen als auch in die Tumorgenese eingreifen. Der zur ETS-Gruppe gehörende Transkriptionsfaktor *ETV6* (*ETS variant 6*) zeichnet sich durch zwei Besonderheiten aus. Er ist häufig an Translokationen in Neoplasien beteiligt und besitzt als einziger auch eine transkriptionelle Repressionsaktivität. *ETV6* beinhaltet zwei funktionelle Domänen, die N-terminale *helix-loop-helix*- (HLH, synonym *pointed*) und die ETS-Domäne am C-Terminus. Die HLH-Domäne vermittelt die Homo- oder Heterodimerisierung mit anderen ETS-Transkriptionsfaktoren wie Fli-1 oder TEL2. Über die ETS-Domäne erfolgt die DNA-Bindung an die ETS-Konsensussequenz (*ETS-binding site*, EBS). *ETV6* interagiert auch mit einigen relevanten nukleären Korepressoren, darunter mSin3a (Interaktion über HLH) sowie N-CoR (*nuclear receptor co-repressor*) und SMRT (*silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor*), die zusammen mit der direkten Bindung der Histondeacetylase (HDAC)-3 durch die zentrale Domäne eine Histondeacetylierung, Chromatinkondensation und transkriptionelle Repression bewirken^{7,8}.

ETV6, ein nukleäres Phosphoprotein, wird von MAP-Kinasen durch multiple Phosphorylierungsstellen reguliert. Nach Bindung an EBS als Oligomere unterdrückt ETV6 die Promotoraktivität⁹. Bekannte Beispiele sind die durch ETV6 inhibierte Transkriptionsaktivierung des Fli1-Onkoproteins, die Unterdrückung der Expression von Stromelysin-1 (Matrixmetalloproteinase-3) und die Wirkung als sequenzspezifischer Repressor an EBS-enhaltenden Promotoren. Der Histondeacetylase-Inhibitor Trichostatin verhindert die ETV6-abhängige Repression von Stromelysin und kehrt den ETV6-induzierten Aggregationsphänotyp in NIH3T3-Zellen um⁸.

Das *ETV6*-Gen (12p13) wurde erstmals als Fusionspartner des *platelet-derived growth factor receptor β* (PDGFRβ) [t(5;12)] in chronischen myeloischen Leukämien (CML) beschrieben¹⁰. Seitdem wurden zahlreiche *ETV6*-Translokationen, die zur Bildung von *ETV6*-assoziierten chimären Genen führen, in verschiedenen hämatologischen Neoplasien identifiziert. In Folge einiger Translokationen liegen Rezeptor- bzw. Non-Rezeptor-Tyrosinkinasen fusioniert mit dem N-terminalen ETV6-Anteil vor. Die Oligomerisierung dieser Onkoproteine durch die HLH-Domäne von ETV6 führt zur konstitutiven Aktivierung der Tyrosinkinaseaktivität (z.B. ETV6/PDGFRβ, ETV6/ABL, ETV6/JAK2, ETV6/SYK, ETV6/NTRK3)^{1,3,11}. Andere Translokationen resultieren in der funktionellen Modifikation von Transkriptionsfaktoren durch deren Fusion mit dem N- oder C-terminalen Teil von ETV6. Beispiele sind *ETV6/RUNX1* [t(12;21)(p13;q22)]² oder *MN1/ETV6* [t(12;22)(p13;q11)]¹². Die Störung der eigentlichen Funktion der Partnerproteine könnte einen wesentlichen Anteil an der Entstehung der Leukämie haben.

ETV6 wird in vielen embryonalen und adulten Geweben exprimiert. *ETV6-knock-out*-Mäuse sterben während der Embryogenese an defekter Dottersack-Angiogenese (bei erhaltener primitiver Hämatopoese) und der Apoptose mesenchymaler und neuronaler Zellen. Wegen der embryonalen Letalität ist die Rolle von *ETV6* in der fetalen Leber ungeklärt. ETV6 ist essenziell für die postnatale, adulte Hämatopoese aller Zellreihen im Knochenmark¹³.

1.3 RUNX1 (*CBFα2*, *AML1*) als transkriptioneller Organisator

Die Transkriptionsfaktoren, die zur Gruppe der *core-binding factors* (CBF) gehören, sind sowohl bei myeloischen als auch lymphatischen Leukämien häufig durch chromosomale Translokationen, Mutationen bzw. Amplifikationen verändert. CBF ist ein heteromerer Komplex, der an *core-enhancer*-Elemente in viralen und zellulären Genen

bindet. Die RUNX1-Untereinheit bindet über die N-terminale *runt-homology*-Domäne (RHD) direkt an DNA. CBF β verstärkt die DNA-Bindungsaffinität von RUNX1 und schützt es vor dem Ubiquitin/Proteasom-vermittelten Abbau. Die Rekrutierung der Koaktivatoren schließt auch basale Transkriptionsfaktoren mit intrinsischer Histonacetyltransferase (HAT)-Aktivität ein (CREB, P300/CBP und P/CAF)¹⁴.

Die HAT-induzierte Acetylierung der Histone bewirkt eine Dekondensation der Chromatinstruktur, die zu einer erhöhten Transkription beiträgt. HAT vermögen ebenfalls Transkriptionsfaktoren direkt zu acetylieren, wodurch deren transkriptionelle Aktivität verändert wird. Zusätzlich zu der RHD und einer C-terminalen Transaktivierungsdomäne (TA) besitzt RUNX1 weitere funktionelle Sequenzmotive, die dessen biologische Aktivität bestimmen. Diese umfassen ein nukleäres Matrixsignal, eine hochkonservierte Kernlokalisierungssequenz und zwei mutmaßliche Transkriptionsrepressionsdomänen.

Durch alternatives Spleißen der mRNA entstehen verschiedene RUNX1-Isoformen. RUNX1A weist keine Transkriptionsaktivität auf und wirkt daher im Gegensatz zu RUNX1B als negativer Regulator der Genexpression und der Zelldifferenzierung^{15,16}. Die Überexpression von RUNX1A verhindert die Differenzierung von Granulozyten und stimuliert die Proliferation myeloischer Zelllinien¹⁷. Diese antagonistischen Effekte könnten für die Leukämogenese und hämatopoetische Differenzierung eine Rolle spielen. Der dominant negative Effekt von RUNX1A auf die Transkriptionsaktivierung durch RUNX1B würde damit die Leukämogenese und/oder die Ausprägung eines unreifen myeloischen Phänotyps unterstützen.

Knock-out-Untersuchungen zeigten, dass *RUNX1*, ähnlich wie *CBF β* , essenziell für die normale fetale Hämatopoese aller Zellreihen ist^{13,18,19}. Das Fehlen von *RUNX1* führt zur Nekrose und Hämorrhagien im ZNS²⁰. *RUNX1* bindet an eine Konsensussequenz, die häufig in den Promotor-/*enhancer*-Regionen von eukaryotischen Genen vorkommt. Bekannte *RUNX1*-Zielgene können entsprechend ihrer Funktion in zellulären Signalwegen eingeteilt werden in:

- Moleküle mit stimulierender Wirkung (Wachstumsfaktoren: IL-3, GM-CSF)^{21,22}
- Rezeptoren und Zelloberflächenmoleküle (Wachstumsfaktorrezeptor, Integrine: M-CSFR, FLT3, c-kit; CD36, MDR1, TCR)^{15,23,24}

- Bestandteile von Signalkaskaden (p21; Bcl2)²⁵
- Transkriptionsfaktoren (STAT3, PU.1, c-myb/fos)¹⁸
- Effektormoleküle (MPO)²⁶

Die *RUNX1/ETO-knock-in*-Expression in den *RUNX1*-Genlocus bei intaktem zweitem *RUNX1*-Allel führt ebenfalls zu einem embryonal letalen Phänotyp (Hämorrhagien im ZNS) und zum Fehlen hämatopoetischer Progenitorzellen^{27,28}. Diese Merkmale entsprechen dem Phänotyp bei homozygotem Verlust von *RUNX1* oder *CBFβ*, was auf einen starken Einfluss der mit der Translokation einhergehenden Zerstörung eines der beiden normalen *RUNX1*-Allele (Verringerung der normalen Gendosis) deutet. Hingegen wurde in einem Tetrazyklin-induzierbaren *RUNX1/ETO-knock-in*-System über einen Zeitraum von 24 Monaten keine Leukämie induziert²⁹.

Beide Gene des Transkriptionsfaktor-Komplexes *RUNX1/CBFβ* sind in die bei AML am häufigsten vorkommenden Translokationen t(8;21) (*RUNX1* ca. 10% der AML) und inv(16) (*CBFβ* ca. 8%)³⁰ involviert. Bei ALL im Kindesalter ist *RUNX1* mit noch höherer Frequenz an Translokationen beteiligt (ca. 20-25%)³¹⁻³⁶. In der bei AML (FAB-M2) häufig vorkommenden Translokation t(8;21)(q22;q22) ist *RUNX1* mit *ETO* fusioniert. Chromosomale Translokationen mit *RUNX1*-Beteiligung werden auch mit Therapie-induzierten Leukämien in Verbindung gebracht³⁷. DNA-Topoisomerase-II-Inhibitoren vermögen reproduzierbare sequenzspezifische DNA-Doppelstrangbrüche in entsprechenden Regionen des *RUNX1*- oder *MLL*-Gens zu induzieren³⁸. Dies könnte ein initialer Schritt in der Entstehung von chromosomalen Translokationen mit darauf folgender Entwicklung einer Leukämie sein.

1.4 Hammerhead-Ribozyme

Ribozyme sind katalytisch aktive RNA-Moleküle. Sie wurden erstmals Anfang der 1980er-Jahre beschrieben³⁹⁻⁴¹. Bis dahin war man davon ausgegangen, dass katalytische Aktivität in Zellen ausschließlich von Proteinen ausgeübt wird. Inzwischen wurden zahlreiche Ribozyme beschrieben, unter ihnen auch Moleküle, die in der Lage sind, ihre eigene Synthese zu katalysieren⁴²⁻⁴⁵. Ribozymen wird daher inzwischen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Leben zugesprochen (*RNA world hypothesis*)⁴⁶.

Als erstes *Hammerhead*-Ribozym wurde 1986 eine kleine Satelliten-RNA aus dem *tobacco ringspot virus* isoliert⁴⁷, die in der Lage ist, sich selber zu schneiden. Dabei ent-

gen komplexe Retroviren über weitere Gene, die akzessorische Proteine mit regulatorischen Funktionen kodieren⁵⁶. HIV-1 enthält beispielsweise die akzessorischen Gene *tat*, *rev*, *vif*, *nef*, *vpu* und *vpr*. Die akzessorischen Gene sind wesentlich für die Pathogenität der Viren verantwortlich. *gag* kodiert für die gruppenspezifischen Antigene, also Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine. *pol* enthält die genetische Information für die reverse Transkriptase und die Integrase. Bei einigen Viren kodiert es außerdem die Protease, bei anderen hat die Protease ein eigenes Leseraster im Bereich des *gag*-Gens. *env* kodiert die virale Proteinhülle. Darüber hinaus enthalten alle retroviralen Genome flankierend am 5'- und am 3'-Ende je einen *long terminal repeat* (LTR). LTR lassen sich noch einmal in eine U3-, eine R- und eine U5-Region gliedern und regulieren vor allem die Expression der viralen Gene. Im 5'-Bereich des Genoms findet man ferner das Verpackungssignal Ψ . Auf die weiteren Elemente des Virusgenoms inklusive der akzessorischen Gene bei komplexen Retroviren soll an dieser Stelle aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht eingegangen werden. Sie sind für das Verständnis der dargestellten Versuche kaum bedeutsam⁵⁷.

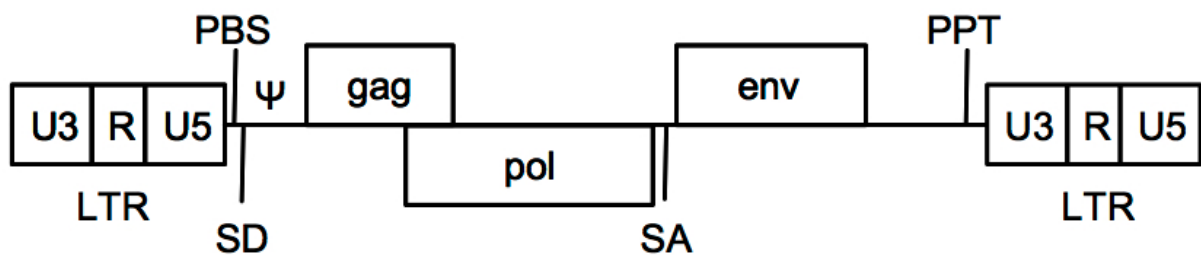


Abbildung 2: Allgemeiner Aufbau eines einfachen Retrovirus.

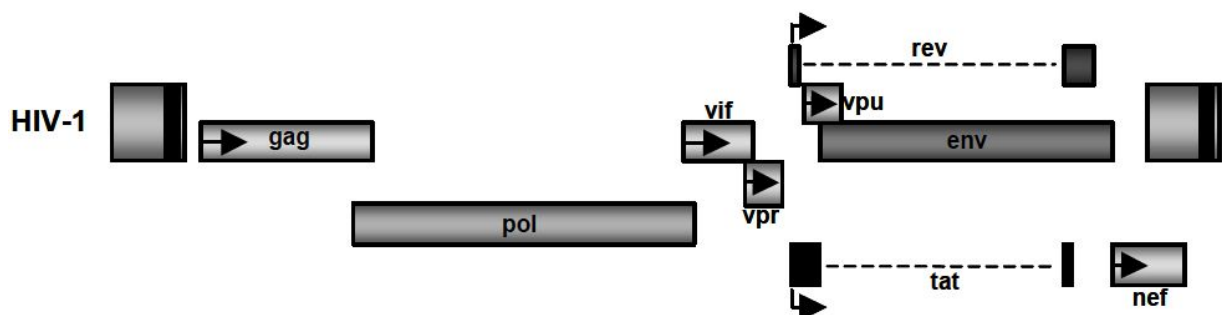


Abbildung 3: Genomorganisation von HIV-1 mit Darstellung der überlappenden Leseraster. Mit freundlicher Genehmigung von Dr. rer. nat. C. Homberg, Neuss.

Die meisten gut untersuchten Retroviren infizieren Wirbeltiere, sind in der Regel sehr wirtsspezifisch und zum Teil Erreger schwerwiegender Krankheiten. Beim Menschen wurden bisher vier Retroviren beschrieben, die humanen T-lymphotropen Viren 1 und 2

(HTLV-1 und -2)⁵⁸⁻⁶⁰ und die humanen Immundefizienzviren 1 und 2 (HIV-1 und -2), die Erreger des erworbenen Immunschwächesyndroms AIDS⁶¹⁻⁶⁸. Verschiedene Retroviren stehen außerdem mit der malignen Entartung ihrer Wirtszellen in kausalem Zusammenhang. So erklärt sich der Name der **Reverse-Transkriptase-Onkoviren**⁷²⁻⁷⁵. Die Familie der Retroviren (*Retroviridae*) wird nach der derzeit gültigen Taxonomie aufgrund genetischer Verwandtschaftsverhältnisse in die Unterfamilien *Orthoretrovirinae* und *Spumaretrovirinae* klassifiziert. Erstere enthält den Genus der in dieser Arbeit verwendeten und von HIV-1 abgeleiteten komplexen Lentiviren.

1.6 Konditioneller lentiviraler shRNA-Vektor

Szulc et al. haben ein inzwischen kommerziell verfügbares lentivirales Transduktionssystem entwickelt, das eine konditionelle Expression von shRNA in den Zielzellen erlaubt (Abbildung 4). Die Regulation des Systems erfolgt durch die Zugabe von Doxycyclin. Es existiert in zwei alternativen Versionen. In der *tet-on*-Variante führt die Zugabe von Doxycyclin zur Expression der shRNA, in der *tet-off*-Variante wird die Expression durch Zugabe von Doxycyclin gestoppt. Der Vektor pLVCT-tTR-KRAB-2SM2 ist ein *tet-on*-Vektor. Er enthält die beiden LTR, das Verpackungssignal Ψ und folgende Elemente:

- die cDNA für das grün fluoreszierende Protein EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) als Reporter gen
- eine IRES (*internal ribosome entry site*), also eine kurze Sequenz, die zur Bildung einer Sekundärstruktur der mRNA führt und so ohne weitere Initiationsfaktoren die Bindung der mRNA an die Ribosomen vermittelt. Dadurch kann die Translation unmittelbar gestartet werden.
- eine Sequenz *tTR-KRAB*, die für ein Fusionsprotein kodiert, das sich aus der Krüppel-assoziierten Box (KRAB), die man in transkriptionsregulatorischen Elementen in den Genomen vieler Säuger findet, und dem Tetrazyklin-Repressor (tTR) aus *Escherichia coli* zusammensetzt. Die tTR-vermittelte Bindung des KRAB-Elements an die DNA über ein tet-Operator-(tetO-)Element führt in einem Radius von 2-3 Kilobasen um die Bindungsstelle zur lokalen Bildung von Heterochromatin. Die betroffene DNA kann nicht in Protein umgesetzt werden, ist also inaktiv. Die Bindung des tet-Repressors an den tet-Operator lässt sich durch Zugabe von Doxycyclin

lösen. Eine Modifikation dieses Systems mit einem Austausch des tet-Repressors gegen einen reversen tet-Repressor führt zu einer Bindung des Repressors an den Operator in Anwesenheit von Doxycyclin und zu einer Ablösung bei Fehlen von Doxycyclin. Letzteres System bezeichnet man im Gegensatz zum vorab beschriebenen *tet-on*-System als *tet-off*-System. Der entsprechende Vektor ist als pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2 kommerziell verfügbar und wurde in dieser Arbeit verwendet.

- ein WPRE (*woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element*), das zelllinien- und promotorspezifisch eine erhöhte Expression der retroviral transferierten Gene bewirkt.

Die DNA-Sequenz, die später zur Expression der shRNA führt, die dann wiederum durch zelluläre Mechanismen zu siRNA prozessiert wird, steht unter Kontrolle eines H1-Promotors. Vor diesem Bereich befindet sich auch der bereits beschriebene regulatorische *tet*-Operator. Die gesamte Kasette aus *tet*-Operator, H1-Promotor und potenziell inhibitorischem Nukleinsäureabschnitt liegt in der Region des Expressionsplasmids, die für die U3-Region des viralen 3'-LTR kodiert. Der Vorteil dieses Konstrukts liegt darin, dass sie im Verlauf bei der Integration der proviralen DNA in die DNA der Zielzelle verdoppelt wird. Dadurch steigt die siRNA-Dosis in der Zielzelle⁷⁶.

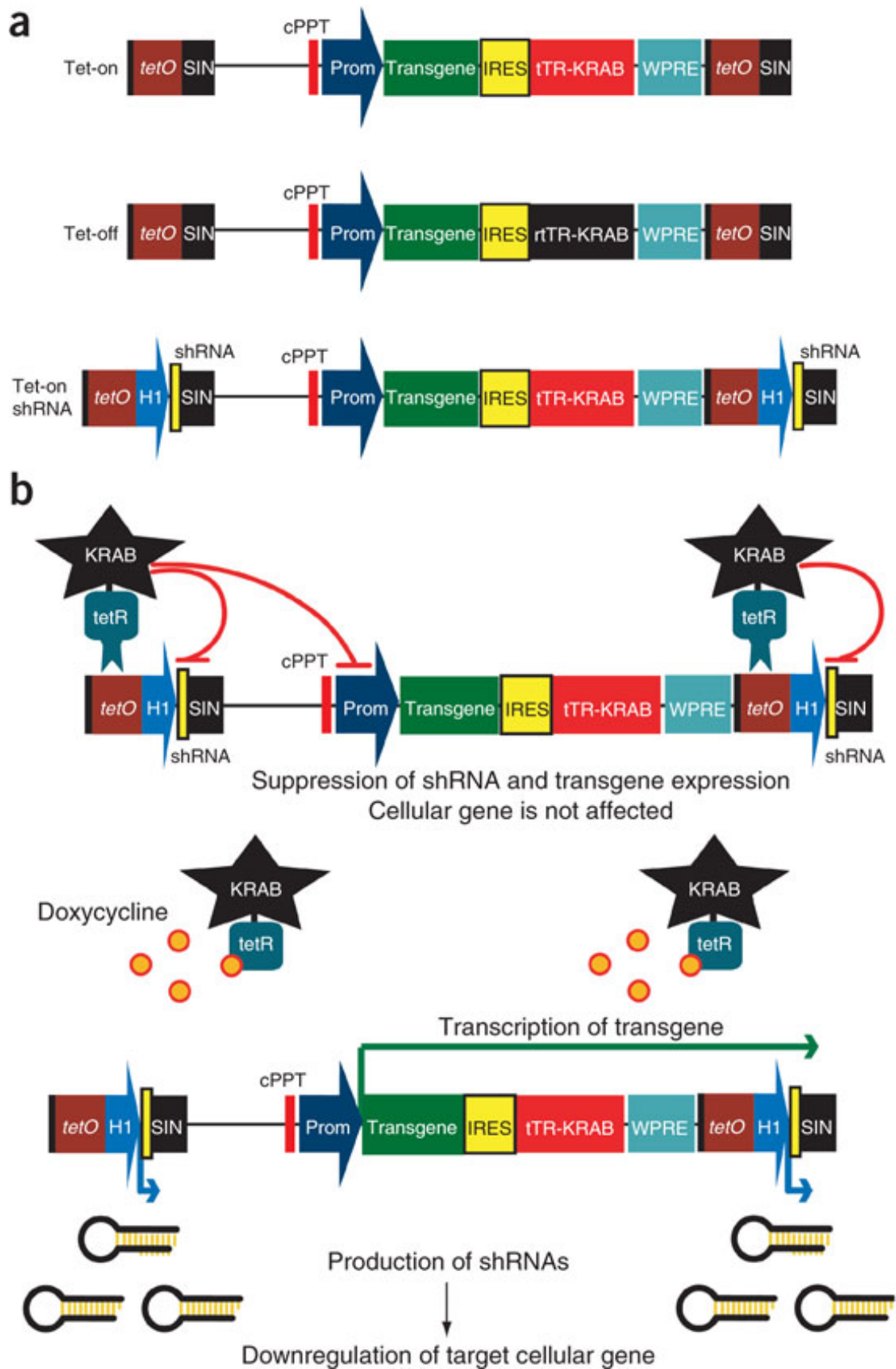


Abbildung 4: Schematische Darstellung des lentiviralen Transduktionssystems zur konditionellen Expression von shRNA. Modifiziert nach Referenz⁷⁶. Mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd. (© 2006).

2 Aufgabenstellung

2.1 Hammerhead-Ribozym gegen ETV6/RUNX1

Choi et al. haben in 2008 eine Arbeit publiziert, in der sie das Ribozym buRz28 vorstellen, das spezifisch gegen die mRNA des *ETV6/RUNX1*-Fusionsgens gerichtet ist⁷⁷.

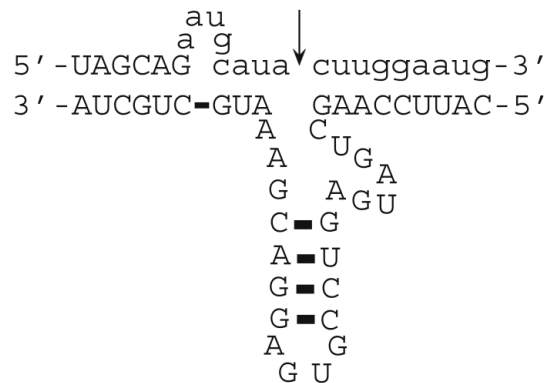


Abbildung 5: Das Ribozym buRz28 (unten), das sich an seine Zielsequenz, die *ETV6/RUNX1*-mRNA angelagert hat. Große Buchstaben kennzeichnen den *ETV6*-, kleine den *RUNX1*-Anteil. Der Pfeil zeigt die mutmaßliche Schnittstelle des Ribozyms.

Als günstiges 5'-NUH-3'-Triplet wurde das AUA-Triplett im *RUNX1*-Anteil der mRNA identifiziert, das die Nucleotide 6, 7 und 8 3' der Fusionsstelle enthält. Da der Schnitt immer 3' des NUH-Tripletts erfolgt, wird also acht Nucleotide 3' des Fusionspunktes geschnitten. Es erwies sich als effektiver, die Stammsequenzen I und III so zu gestalten, dass sie nicht vollständig komplementär zur Zielsequenz sind. Vier Nucleotide (5'-AAUG-3') der Zielsequenz haben daher keinen Bindungspartner und formen eine Schleife (bzw. englisch *bulge* für Ausbuchtung). Das führt dazu, dass es sowohl 3' als auch 5' der Schnittstellen je neun komplementäre Basen gibt. Die Schnittstelle liegt also zentral. buRz28 schneidet nur *ETV6/RUNX1*-Fusions-mRNA, nicht aber die *ETV6*- oder *RUNX1*-mRNA, so dass weiterhin *ETV6*- und *RUNX1*-mRNA durch Transkription des zweiten Allels gebildet werden kann.

2.2 Lentiviraler Ribozymtransfer

Der bereits dargestellte Vektor pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2 eignet sich zur konditionellen Expression von shRNA in zahlreichen Zielzellen. Die shRNA-Sequenz steht im Vektor unter der Kontrolle des H1-Promotors. Der H1-Promotor initiiert die Transkription durch die RNA-Polymerase-III und gehört damit zur Gruppe der Pol-III-Promotoren.

Transkripte von Pol-III-Promotoren findet man in fast allen Zellen, was die Rationale zur Auswahl dieser Promotoren für die Expression von shRNA darstellt⁷⁸⁻⁸³. Der H1-Promotor ist so zur kodierenden Sequenz gelegen, dass die Transkription an der ersten Base beginnt, die für die shRNA kodiert. Die Transkription endet, wenn vier bis sechs Thymidine aufeinander folgen^{84,85}. Die Abspaltung des Transkripts erfolgt nach dem zweiten Thymidin, so dass zwei Uracil-Reste am 3'-Ende überhängen.

Eine shRNA ist mit einer Länge von 49 Basenpaaren – ausgehend von einer 19 Basenpaare langen siRNA, einer Haarnadelschleife von neun Basenpaaren und zwei zusätzlichen Uracil-Resten – in etwa genauso lang wie das buRz28-Ribozym, das inklusive Uracil-Überhang 42 Basenpaare umfasst. Daraus entstand die Idee, den lentiviralen shRNA-Vektor pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2 zu benutzen, um Zellen stabil und konditionell mit Ribozymen zu transduzieren.

2.3 Die Fibroblastenzelllinie HT-1080

Aus zahlreichen Studien ist bekannt, dass der Nachweis des ETV6/RUNX1-Proteins in lymphatischen Zellen technisch sehr anspruchsvoll ist. Deswegen diente in dieser Arbeit die Fibroblastenzelllinie HT1080 als Modellzelllinie. HT1080-Zellen exprimieren von Natur aus kein ETV6/RUNX1. Sie wachsen sehr gut und sind sehr leicht lentiviral zu transduzieren.

2.4 Fragestellung und Arbeitsschritte

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Frage zu klären, ob es möglich ist, das Ribozym buRz28, das offensichtlich eine posttranskriptionelle Aktivität gegen *ETV6/RUNX1*-mRNA hat, lentiviral in eine *ETV6/RUNX1*-positive Modellzelllinie einzubringen und so die Expression des Fusionsproteins in diesen Zellen zu unterdrücken. Es ergaben sich daher folgende Arbeitsschritte:

1. Klonierung eines lentiviralen Vektors, der in der Lage ist, die Fibroblastenzelllinie HT-1080 mit *ETV6/RUNX1* zu transduzieren und zur stabilen Expression des Transgens zu veranlassen
2. Optimierung der Transduktionsbedingungen und Überprüfung, ob das Transgen *ETV6/RUNX1* in den HT-1080-Zielzellen exprimiert wird

3. Klonierung eines lentiviralen Vektors, der in der Lage ist, die *ETV6/RUNX1*-positive, transgene Fibroblastenzelllinie HT-1080 mit dem Ribozym buRz28 zu transduzieren und dessen stabile Expression zu veranlassen
4. Überprüfung, ob die Expression von buRz28 in *ETV6/RUNX1*-positiven HT-1080-Zellen zur Herabregulierung der *ETV6/RUNX1*-Expression führt

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien und Enzyme

Soweit es sich bei den verwendeten Chemikalien nicht um gängige Reagenzien höchsten Reinheitsgrades zur ausdrücklichen Anwendung in der Molekularbiologie handelte, die über zahlreiche Firmen wie z.B. Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen) oder Roth (Karlsruhe) bezogen werden können, sind deren Hersteller in den einzelnen Versuchsprotokollen ausdrücklich aufgeführt.

3.1.2 Plasmide

3.1.2.1 pCMV5-TA

Das Plasmid pCMV5-TA wurde mir freundlicherweise von Dr. Anthony Ford aus der Arbeitsgruppe von Prof. Mel Greaves (London, UK) zur Verfügung gestellt. Es basiert auf dem Plasmid pCMV5 und enthält die *ETV6/RUNX1*-Sequenz⁸⁶.

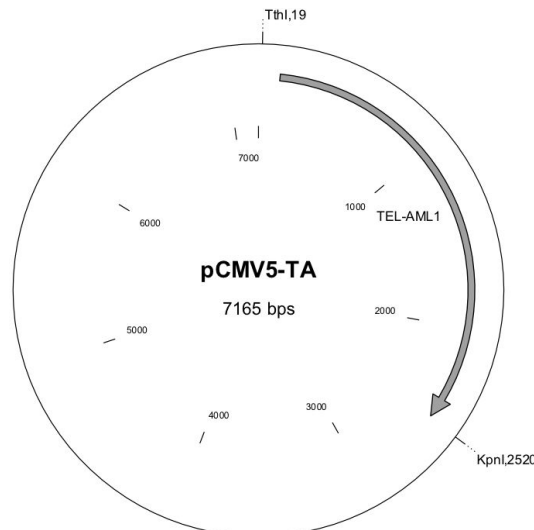


Abbildung 6: Plasmid pCMV5 mit der cDNA für *ETV6/RUNX1* (*TEL/AML1*).

3.1.2.2 pPR1

Das Plasmid pPR1 wurde mir freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. med. H. Hanenberg (Indianapolis, USA) zur Verfügung gestellt. pPR1 ist abgeleitet von pGJ3⁸⁷ und ein lentivirales Transferplasmid der dritten Generation. Als interner Promotor zur Expression des Transgens fungiert die U3-Region des *spleen focus forming virus* (SFFV) gefolgt

von einer *multiple cloning site*, hinter der sich dann *EGFP* als Reportergen befindet. pPR1 enthält in der U3-Region im 3'-LTR eine *loxP-site*, die bei der Integration durch einen sehr komplexen Prozess verdoppelt wird. Die Kopie Teil des 5'-LTR. Dadurch lässt sich das Virus theoretisch selektiv durch eine Behandlung der DNA mit Cre-Rekombinase ausschneiden. Diese Möglichkeit wurde aber in dieser Arbeit nicht genutzt.

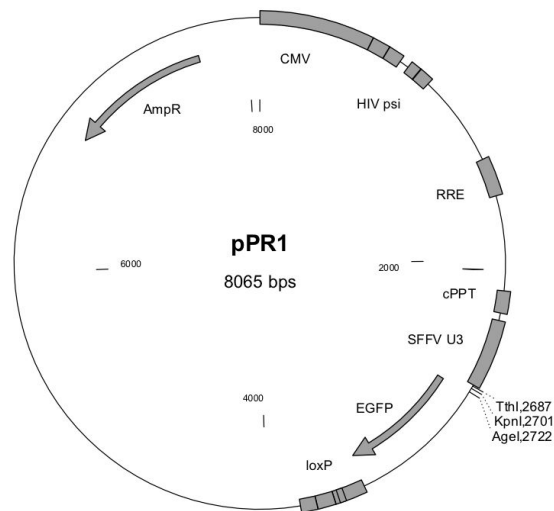


Abbildung 7: Plasmid pPR1. Mit CMV ist der chimäre 5'-LTR bestehend aus heterologem CMV-Promotor, HIV-1-R- und HIV-1-U5-Region bezeichnet. Im Uhrzeigersinn folgen das Verpackungssignal Ψ (psi), das *Rev response element* (RRE) und der *central polypurine tract* (cPPT). Zwischen Ψ und RRE liegt der *major splice donor* (SD), zwischen RRE und cPPT der *splice acceptor* (SA). SD und SA sind der Übersicht halber nicht dargestellt. Nach dem cPPT folgt die Transgen-Expressionskassette, die mit der SFFV-U3-Region beginnt, die als interner Promotor fungiert. Dahinter liegt eine *multiple cloning site* (MCS). Exemplarisch sind die Schnittstellen für TthI, KpnU und AgeI dargestellt, die für das Verständnis der nachfolgend beschriebenen Klonierungen wichtig sind. Hinter der MCS liegt das Reportergen *EGFP*. Es folgt der 3'-LTR. Ein weiteres funktionelles Element in diesem Plasmid ist die *loxP-site*, die in der U3-Region des 3'-LTR gelegen ist. Die 3'-LTR-R- und 3'-LTR-U5-Region sind nicht gesondert gekennzeichnet. AmpR bezeichnet ein β -Laktamase-Gen, das bei der Vermehrung dieses Plasmids in Bakterien genutzt wurde, um transformierte Bakterien in einem Ampicillin-haltigen Nährmedium zu selektionieren.

3.1.2.3 pIRES

Das Plasmid pIRES wurde von der Firma Clontech (Mountain View, CA, USA) bezogen (Bestellnummer: 631605). pIRES enthält die Information für eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES).

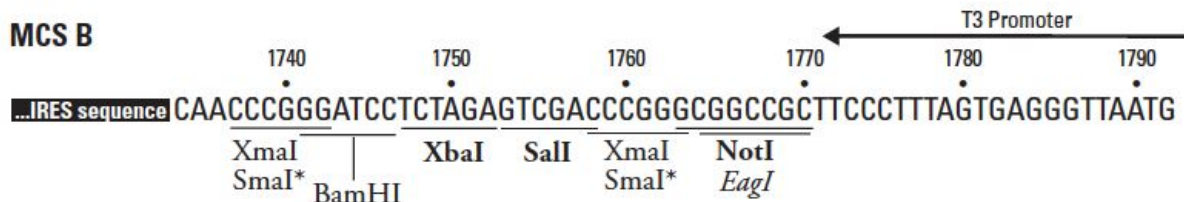
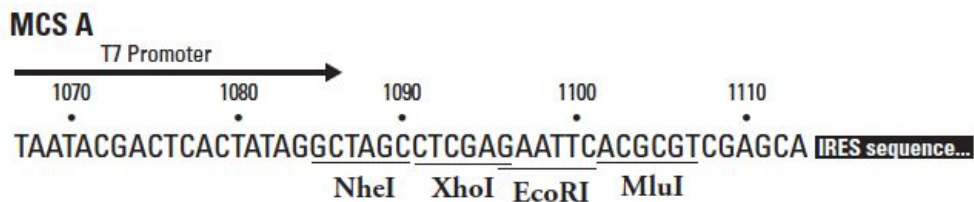
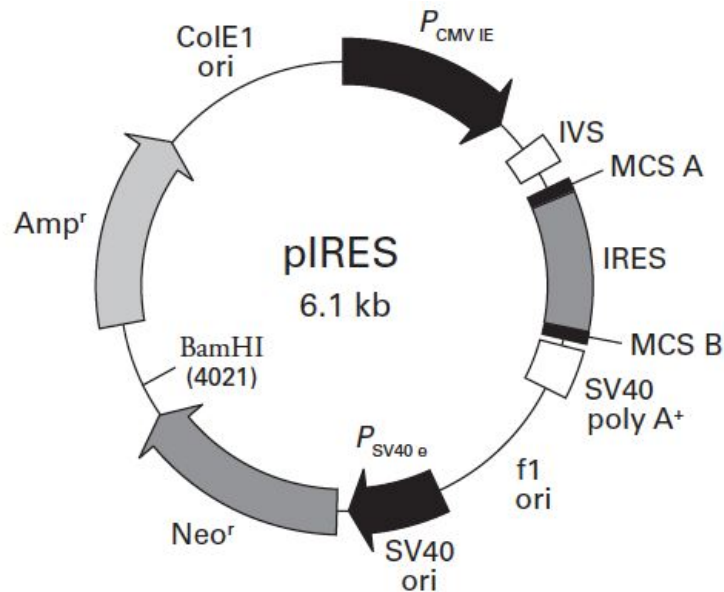


Abbildung 8: Plasmid pIRES der Firma Clontech, Bestellnummer 631605. Die IRES wurde durch einen Doppelverdau mit EcoRI und XbaI aus diesem Plasmid ausgeschnitten. (Abbildungsquelle: http://www.clontech.com/products/detail.asp?tabno=2&catalog_id=631605&page=all&product_id=10480)

3.1.2.4 pPRIEG3

Das Plasmid pPR1 wurde mit der Restriktionsendonuklease Agel linearisiert. Die entstehenden 5'-Überhänge (sog. klebrige Enden oder „*sticky ends*“) wurden mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* aufgefüllt, so dass sogenannte stumpfe Enden („*blunt ends*“) entstanden. Dann wurde die IRES aus pIRES durch einen EcoRI/XbaI-Koverdau ausgeschnitten. Auch hier wurden die entstehenden *sticky ends* durch eine Behandlung mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt. pPR1-*backbone* und IRES-*insert* wurden dann miteinander ligiert. Die richtige Orientierung des *inserts* wurde durch einen Kontrollverdau mit BspMI/EcoRI überprüft.

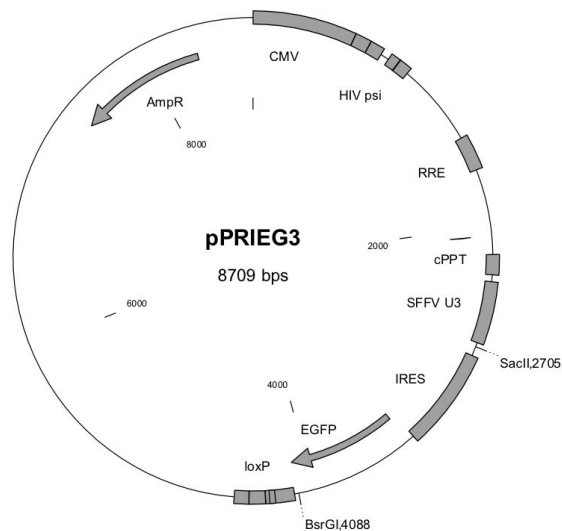


Abbildung 9: Das Plasmid pPRIEG3 ist ein Abkömmling von pPR1 (Abbildung 7). Als zusätzliche Besonderheit enthält pPRIEG3 eine IRES zwischen der MCS und der *EGFP*-cDNA. Die IRES vermittelt die Bindung der mRNA an die Ribosomen, ohne dass dafür weitere Faktoren notwendig sind. Dadurch kann an einer IRES die Proteinsynthese direkt gestartet werden. In bicistronischen Konstrukten wie pPRIEG3 werden die beiden Gene, die unter der Kontrolle des gleichen Promotors stehen, effektiver exprimiert, wenn zwischen ihnen eine IRES liegt.

3.1.2.5 pIRES2-EGFP

pIRES2-EGFP wurde von der Firma Clontech (Mountain View, CA, USA) bezogen (Bestellnummer: 6029-1).

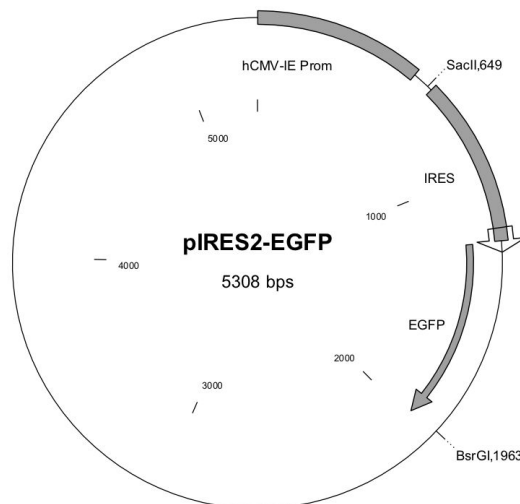


Abbildung 10: Das Plasmid pIRES2-EGFP enthält neben einer IRES eine Kozak-Konsensussequenz, die die Initiation der Translation erleichtert und deswegen zu einer gesteigerten Genexpression führt. In dem konkreten Fall wird dadurch die Expression des *EGFP*-Gens, das 3' der IRES-Kozak-Sequenz liegt, verbessert.

3.1.2.6 pPRIEG7

Das Plasmid pPRIEG7 entstand, indem die IRES-*EGFP*-Kassette aus pPRIEG3 durch die IRES-Kozak-*EGFP*-Sequenz aus pIRES2-EGFP ausgetauscht wurde. Beide Plas-

mide wurden hierzu mit *SacII* und *BsrGI* verdaut. Aufgrund des Doppelverdaus mit Enzymen, die unterschiedliche Überhänge erzeugten, war bei der Ligation des *backbones* mit dem *insert* nur die korrekte Orientierung der übertragenen Sequenz möglich.

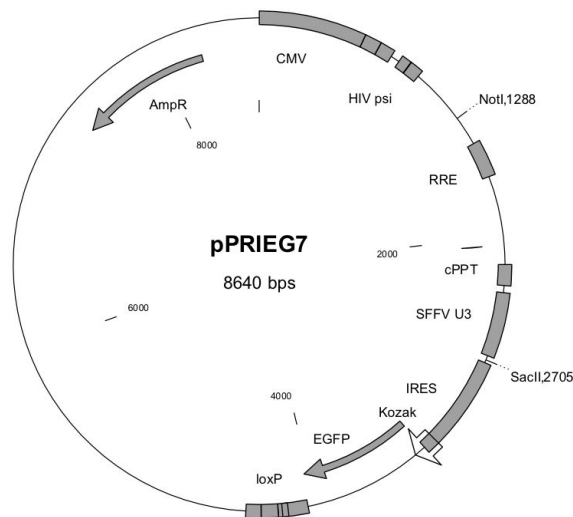


Abbildung 11: Durch den Austausch der IRES-EGFP-Kassette des Plasmid pPRIEG3 gegen die IRES-Kozak-EGFP-Kassette aus pIRES2-EGFP entstand das Plasmid pPRIEG7, das das Reportergen *EGFP* effektiver exprimiert.

3.1.2.7 pPRTAEG

pPRTAEG wurde kloniert, indem *ETV6/RUNX1* aus pCMV5-TA durch einen sequentiellen Verdau mit *KpnI* und *Tth111I* herausgeschnitten und dann mit pPR1 ligiert wurde. pPR1 war vorher durch den gleichen Doppelverdaus eröffnet worden. Die beiden Schnittstellen lagen in der MCS nur wenige Basen auseinander, so dass kaum genetisches Material verloren ging. Aufgrund des Doppelverdaus mit Enzymen, die unterschiedliche Überhänge erzeugten, war bei der Ligation des *backbones* mit dem *insert* nur die korrekte Orientierung der übertragenen Sequenz möglich.

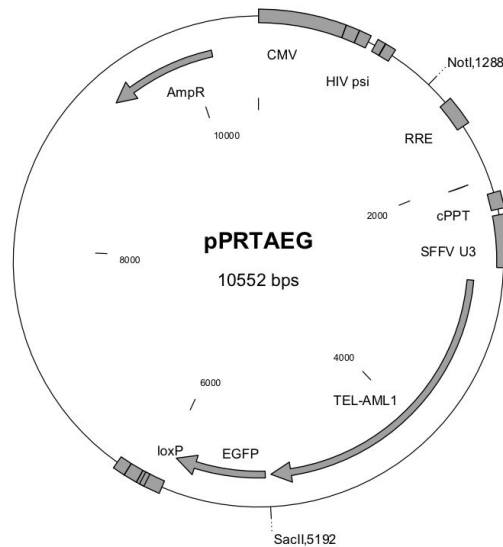


Abbildung 12: Das Plasmid pPRTAEG war niemals zur Produktion von Viren gedacht, sondern lediglich als Zwischenschritt zur Klonierung des Vektor pPRTAIEG7, da durch die vorab beschriebene Klonierung eine von NotI- und SacII-Schnittstellen flankierte Kasette entstand, die u.a. die *ETV6/RUNX1*-cDNA enthielt, die dann aufgrund günstiger Schnittstellen direkt in pPRIEG7 kloniert werden konnte.

3.1.2.8 pPRTAIEG7

Der Vektor pPRTAIEG7 basiert auf pPRIEG7. Das NotI/SacII-Fragment aus pPRIEG7 wurde gegen das *ETV6/RUNX1*-enthaltende Fragment aus pPRTAEG ersetzt, das ebenfalls durch einen Doppelverdau mit NotI und SacII ausgeschnitten wurde. Auch bei dieser Klonierung war durch den Doppelverdau mit zwei Enzymen, die unterschiedlich Überhänge erzeugten, nur die korrekte Orientierung des *inserts* möglich.

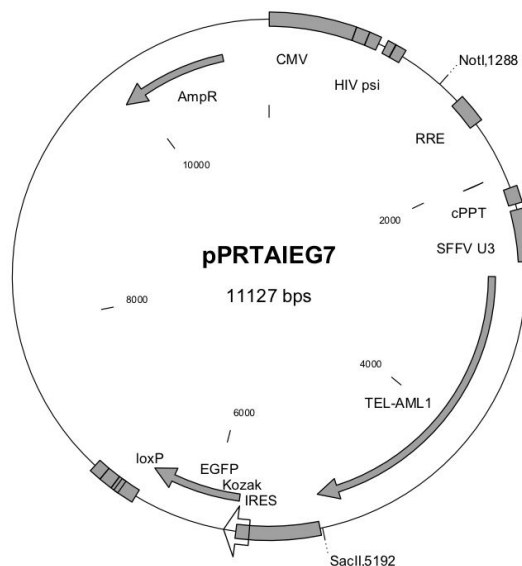
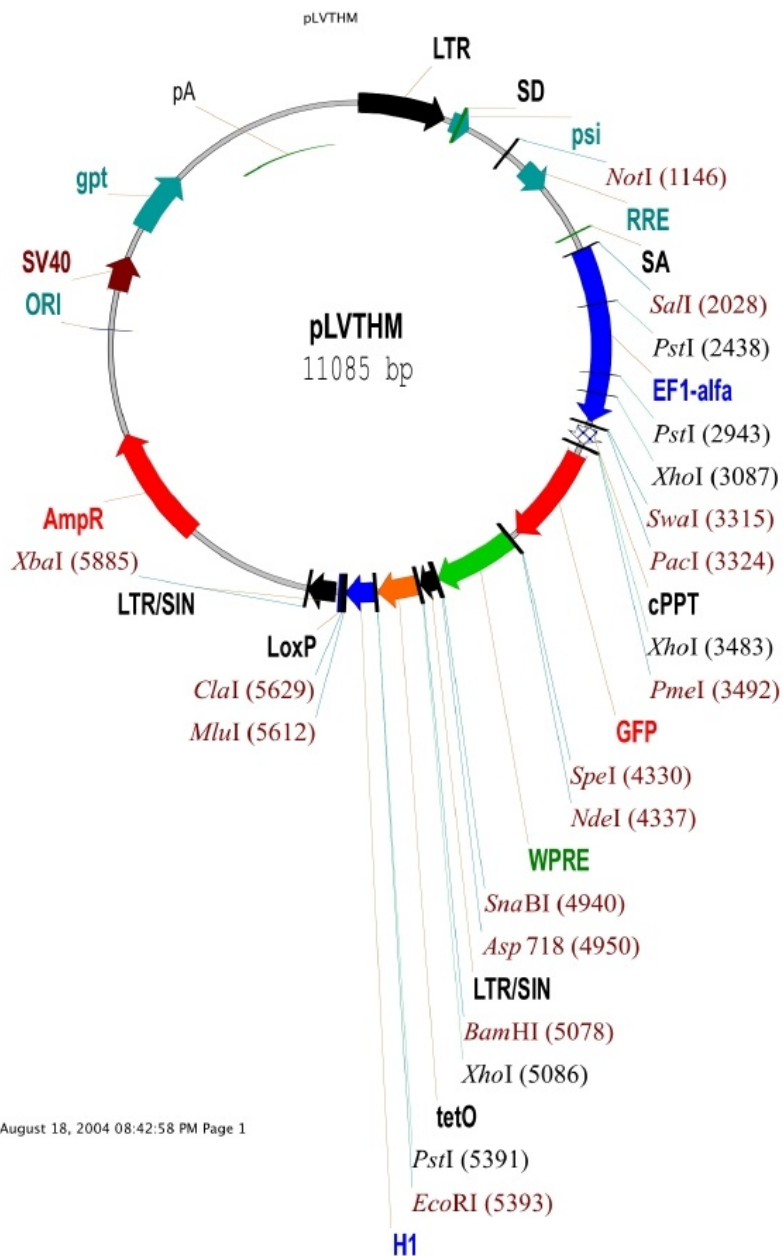


Abbildung 13: Lentiviraler Vektor der dritten Generation pPRTAIEG7. Der Vektor ermöglicht mit Hilfe eines internen SFFV-U3-Promotors die Expression der *ETV6/RUNX1*-cDNA (früher: *TEL/AML1*). pPRTAIEG7 ist ein bicistronisches Konstrukt, das zusätzlich *EGFP* mit Hilfe einer IRES und einer Kozak-Konsensussequenz sehr effektiv exprimiert. Die Transduktionseffizienz mit diesem Vektor kann durch eine Messung der *EGFP*-Expression der Zielzellen quantifiziert werden. Die im 3'-LTR enthaltene *loxP*-

site wird bei der Integration des Vektors in das Genom seiner Zielzelle verdoppelt und die Kopie wird Teil des 5'-LTR. Dadurch könnte das Virus durch eine Behandlung der Zielzellen mit Cre-Rekombinase theoretisch wieder ausgeschnitten werden. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Besonderheit des Vektors pPRTAIEG7 jedoch nicht genutzt.

3.1.2.9 pLVTHM

pLVTHM wurde mir freundlicherweise über die Firma addgene (Cambridge, MA, USA, Plasmid 12247) von Prof. Didier Trono (Lausanne, Schweiz, www.tronolab.com) zur Verfügung gestellt. Der Vektor ist Teil eines von den Arbeitsgruppen von Prof. Didier Trono und Prof. Patrick Aebischer (ebenfalls Lausanne, Schweiz) entwickelten lentiviralen Expressionssystem für shRNA (s. 1.6), die dann in der Zielzelle zu siRNA prozessiert wird. Der die shRNA kodierende DNA-Abschnitt wird in diesem System in den Bereich zwischen den MluI- und ClaI-Schnittstellen im Bereich des lentiviralen 3'-LTR kloniert. In einem zweiten Klonierungsschritt kann dieser Bereich dann in zahlreiche andere Vektoren kloniert werden, die von den beiden o.g. Arbeitsgruppen für verschiedene Fragestellungen und Zelllinien entwickelt worden sind. Diese Vektoren können allesamt über addgene bezogen werden. pLVTHM wurde selber niemals zur Virusproduktion verwendet. Seine über den 3'-LTR hinausgehenden Elemente werden deswegen an dieser Stelle nicht erklärt, da sie für die weiteren Versuche keine Relevanz haben.



iv, August 18, 2004 08:42:58 PM Page 1

Abbildung 14: pLVTHM wurde mir freundlicherweise über die Firma addgene von Prof. Didier Trono und Prof. Patrick Aebischer (beide Lausanne, Schweiz) zur Verfügung gestellt und diente als Basisplasmid zur Klonierung des Ribozyms in den Vektor pLVCT-rtTRKRAB-2SMS. pLVTHM und pLVCT-rtTRKRAB-2SMS sind Teile eines von den Arbeitsgruppen von Prof. Trono und Prof. Aebischer entwickelten Systems zur Transduktion verschiedenster Zellen mit kurzen DNA-Abschnitten, die zu shRNA transkribiert und dann von der Zielzelle zu siRNA prozessiert werden. Das System wurde in dieser Arbeit zweckentfremdet und zur Transduktion meiner Zielzellen mit dem Ribozym buRz28 (s.u.) genutzt (mit freundlicher Genehmigung von addgene, Prof. D. Trono und Prof. P. Aebischer).

3.1.2.10 pLVCT-rtTRKRAB-2SM2

Das Vektorplasmid pLVCT-rtTRKRAB-2SMS2 wurde mir freundlicherweise von Prof. Patrick Aebischer (Lausanne, Schweiz) über die Firma addgene (Cambridge, MA, USA, Plasmid 11779) zur Verfügung gestellt. Es kodiert einen lentiviralen Vektor der zweiten

Generation, dessen Transgenexpression durch einen CAG-Promotor kontrolliert wird. Der CAG-Promotor setzt sich aus dem *early-enhancer*-Element des Zytomegalievirus (CMV) und dem Hühner- β -Aktin-Promotor zusammen. Er wird häufig zur Transgenexpression in Säugerzellen genutzt und ist insbesondere für die Transgenexpression in murinen embryonalen Stammzellen geeignet, welche wiederum perspektivisch die Zielzellen unserer Arbeitsgruppe sein werden⁸⁸. Dieser Umstand bildete die Rationale zur Auswahl des CAG-Promotors. In Uhrzeigerrichtung kodiert der Vektor ferner für *EGFP* als Reportergen, eine IRES, eine Sequenz *rtTRKRAB*, die für ein Fusionsprotein aus der Krüppel-assoziierten Box (KRAB) und dem reversen Tetrazyklin-Repressor (*rtTR*) aus *E. coli* kodiert sowie ein WPR-Element (*woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element*), das Zelllinien- und Promotor-spezifisch eine erhöhte Expression der lentiviral transferierten Gene bewirkt^{89,90}.

Die *rtTR*-vermittelte Bindung des KRAB-Elements an die DNA über ein *tet*-Operator-Element (*tetO*) führt zur lokalen Bildung von Heterochromatin und damit zur Inaktivierung der DNA. Dies geschieht in einem 2-3 kb Bereich um die Bindungsstelle und führt damit auch zur Hemmung der *rtTRKRAB*-Expression (*autoregulatory loop*). Die Bindung des reversen *tet*-Repressors an den *tet*-Operator ist Doxycyclin-abhängig und löst sich in Abwesenheit dieses Antibiotikums (*tet-off*-System), was dann zu einer Expression der Transgene führt. Dieses konditionale Genexpressionssystem ermöglicht eine quantitative und zeitliche Regulation der Genexpression⁷⁶.

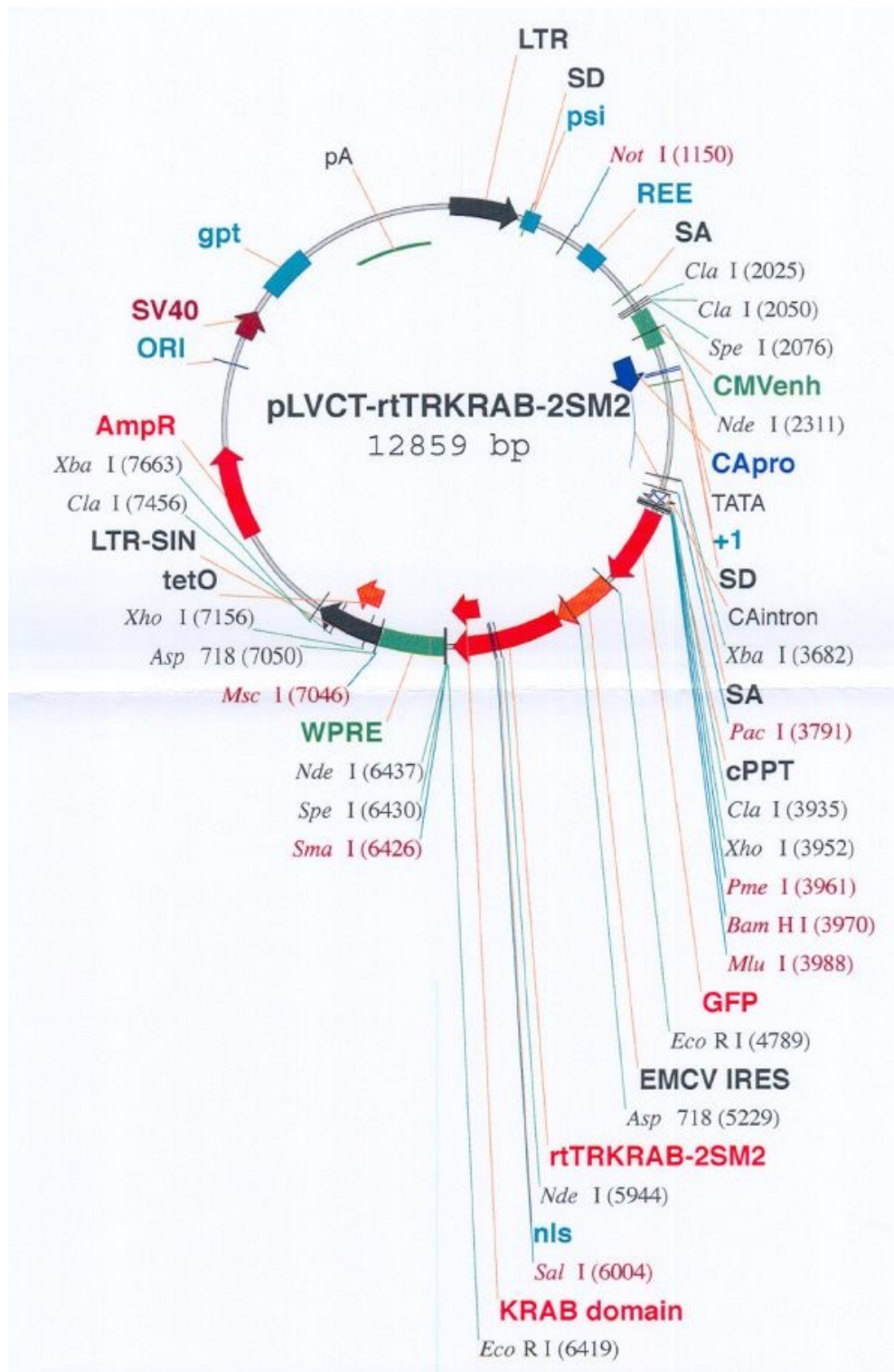


Abbildung 15: pLVCT-rtTRKRAB-2SMS2 ist ein lentivirales Vektorplasmid der zweiten Generation, das durch eine komplexe Interaktion seiner *in cis* liegenden Elemente eine Doxycyclin-regulierbare Expression seiner Transgene erlaubt. Plasmid und Abbildung wurden mir freundlicherweise von addgene und Prof. Aebischer (Lausanne, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

3.1.2.11 Verpackungsplasmid psPAX2

psPAX2 ist ein lentivirales Verpackungsplasmid der zweiten Generation, das im Wesentlichen HIV-1 *gag*, *pol*, *tat* und *rev* unter der Kontrolle eines CAG-Promotors exprimiert. psPAX2 wurde mir freundlicherweise von Herrn Prof. Didier Trono (Lausanne, Schweiz) über die Firma addgene (Cambridge, MA, USA, Plasmid 12260) zur Verfügung gestellt.

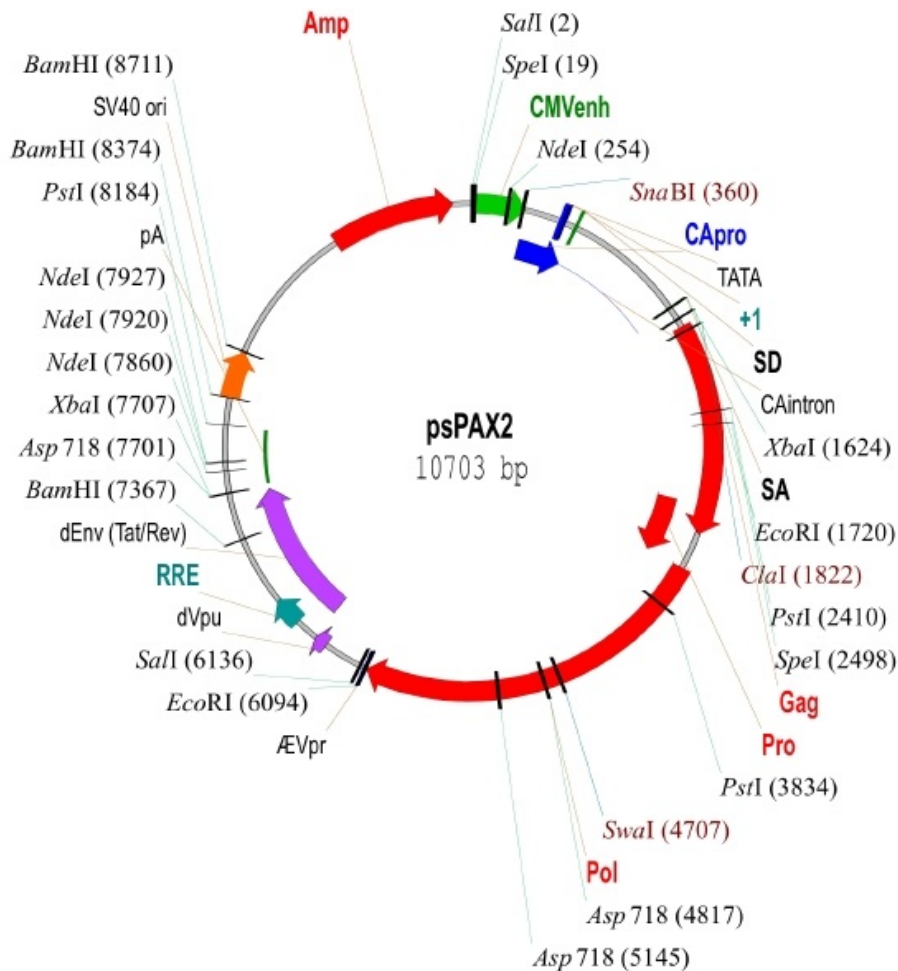


Abbildung 16: Lentivirales Verpackungsplasmid der zweiten Generation psPAX2 (mit freundlicher Genehmigung von addgene, Prof. D. Trono und Prof. P. Aebischer).

3.1.2.12 Hüllplasmid pMD2.G

Das lentivirale Hüllplasmid pMD2.G exprimiert das G-Protein des *vesicular stomatitis virus* (VSV-G) unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. pMD2.G wurde mir ebenfalls von Herrn Prof. Didier Trono (Lausanne, Schweiz) über die Firma addgene (Cambridge, MA, USA, Plasmid 12259) zur Verfügung gestellt.

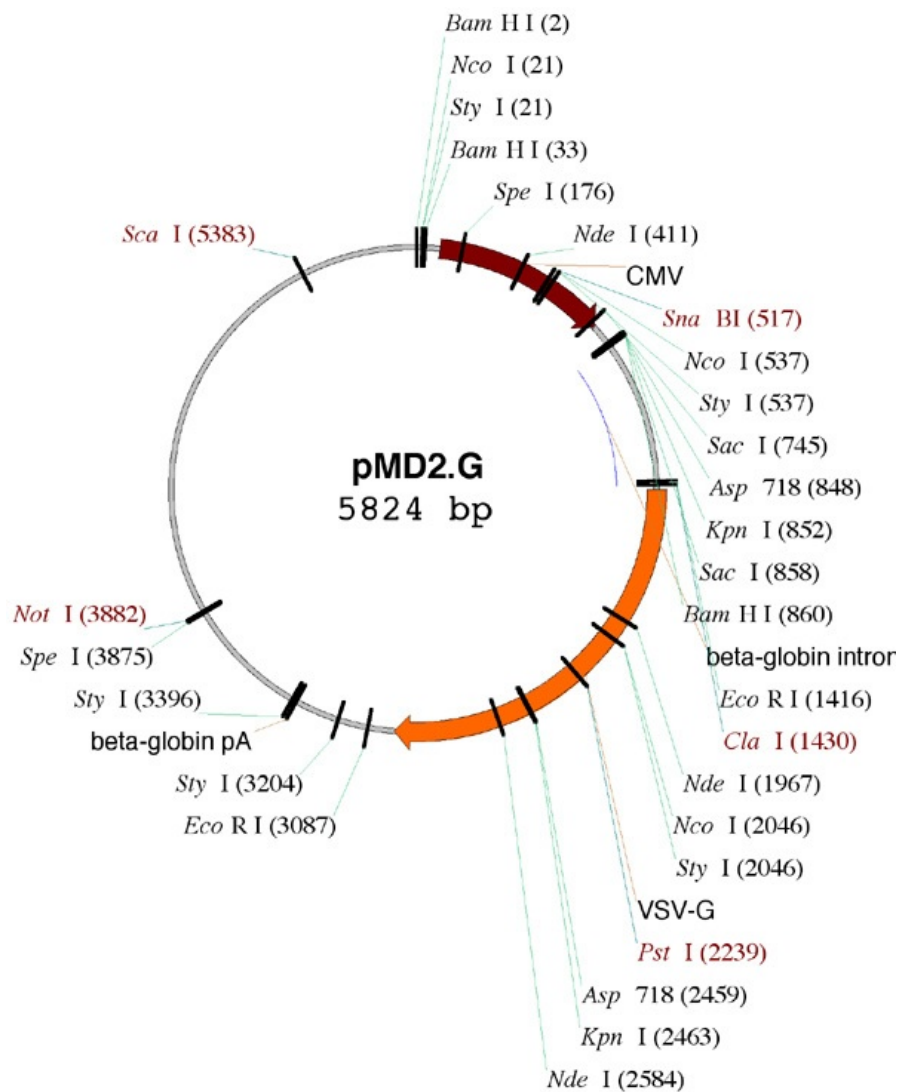


Abbildung 17: Lentivirales Hüllplasmid pMD2.G. Es kodiert für das G-Protein des VSV (mit freundlicher Genehmigung von addgene und Prof. D. Trono).

3.1.2.13 Verpackungsplasmid pMDLg/pRRE

Das Verpackungsplasmid der dritten Generation pMDLg/pRRE kodiert entsprechend für *gag*, *pol* und ein *RRE* unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Auch dieses Plasmid wurde mir über die Firma addgene (Cambridge, MA, USA, Plasmid 12259) von Herrn Prof. Didier Trono (Lausanne, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

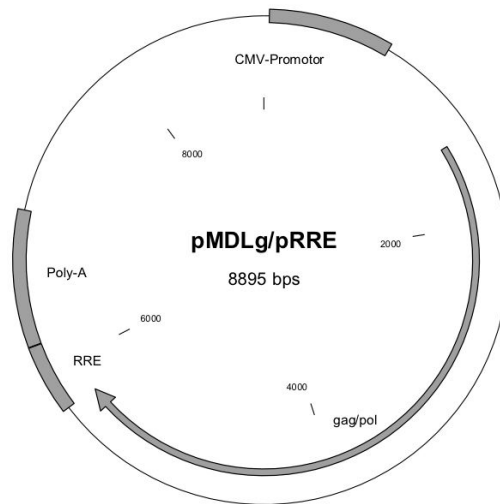


Abbildung 18: *gag-pol*-Expressionsplasmid pMDLg/pRRE. Dessen Genexpression steht unter der Kontrolle eines CMV-Promotors und wird durch ein *RRE* verstärkt.

3.1.2.14 Hilfsplasmid pRSV Rev

pRSV Rev kodiert das für lentivirale Vektoren der dritten Generation notwendige *rev*, das über *in trans* gelegene *rev-response*-Elemente auf den ko-transfizierten Plasmiden den Export der mRNA-Fragmente aus dem Kern in das Zytoplasma aktiviert. pRSV Rev wurde über die Firma addgene (Cambridge, MA, USA, Plasmid 12253) von Herrn Prof. Didier Trono (Lausanne, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

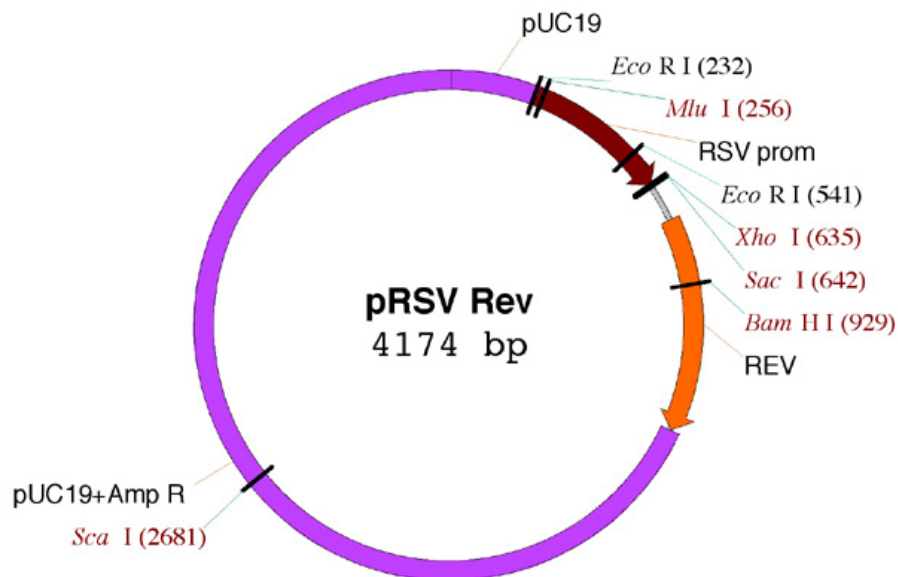


Abbildung 19: Schematische Darstellung des *rev*-Expressionsplasmids pRSV Rev. pRSV Rev wird in lentiviralen Transduktionssystemen der 3. Generation benötigt, um die Expression der Virusgene in Produzentenzellen zu erhöhen (mit freundlicher Genehmigung von addgene und Prof. D. Trono).

3.1.3 Oligonukleotide

Die das Ribozym buRz28 kodierenden Oligonukleotide buRz28-F und buRz28-R zur Klonierung in das lentivirale Expressionsplamid pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2 wurden bei der Firma TIB MOLBIOL GmbH (Berlin) bestellt:

buRz28-F:

5'-cgcggtccccCATTCCAAGCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAATGCTGCTAttttggaat---3'

buRz28-R:

5'-cgatttccaaaaTAGCAGCATTTCGTCCTCACGGACTCATCAGCTTGAATGgggga-----3'

Sie wurden so gestaltet, dass sie nach dem *annealing* MluI-ClaI-kompatible Überhänge ausbilden (s.u.). Die Kernsequenz (in Großbuchstaben) entspricht der Erstbeschreibung dieses Ribozyms von Choi et al.⁷⁷.

Zur Klonierung eines mutmaßlich funktionslosen Kontrollvektors wurden zwei Oligonukleotide bestellt, die komplementär zur Ribozymsequenz sind:

anti-buRz28-F:

5'-cgcggtccccGTAAGGTTGACTACTCAGGCACTCCTGCTTTACGACGATtttttggaat---3'

anti-buRz28-R:

5'-cgatttccaaaaATCGTCGTAAAGCAGGAGTGCCTGAGTAGTCGAACCTTACgggga-----3'

3.1.4 Zellen

3.1.4.1 Bakterienstamm *Escherichia coli* DH5 α (*E. coli* DH5 α)

Der Bakterienstamm *E. coli* DH5 α wurde zur Amplifikation rekombinanter Plasmide verwendet.

3.1.4.2 Virusproduktionszelllinie 293T

Die humane embryonale Nierenzelllinie 293T diente als Virusproduktionszelllinie und wurde über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) bezogen. Die Zellen exprimieren stabil das SV40 *Large-T*-Antigen⁹¹. Daraus resultiert eine gesteigerte Genexpression in Plasmiden, die den SV40-Replikationsursprung (ORI) tragen.

3.1.4.3 HT-1080

Die humane Fibrosarkomzelllinie HT-1080 wurde ebenfalls über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) bezogen⁹². HT-1080-Zellen (Bestellnummer: ACC 315) wachsen adhärent, lassen sich sehr gut kultivieren, vermehren sich rasch und lassen sich besonders gut lentiviral transduzieren. Sie sind zudem *ETV6/RUNX1*-negativ. Eine vollständige molekulargenetische Charakterisierung dieser Zellen findet sich im Internet unter www.dsmz.de.

3.1.4.4 Humane B-Vorläuferzell-Leukämie-Zelllinie REH

Die humane B-Vorläuferzell-Leukämie-Zelllinie REH stammt von einer jugendlichen afrikanischen Patientin mit dem ersten Rezidiv einer ALL^{93,94}. REH-Zellen sind *ETV6/RUNX1*-positiv und wachsen als Einzelzellen in Suspension. Sie können über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig) bezogen werden (Bestellnummer: ACC 22). Eine vollständige molekulargenetische Charakterisierung dieser Zellen findet sich im Internet unter www.dsmz.de.

3.1.5 Medien und Zusätze

Zur Kultur der Eukaryoten-Zellen wurden die Medien RPMI 1640 (Gibco/BRL, Karlsruhe), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 4,5 g/l Glukose (Gibco/BRL, Karlsruhe) und Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Sigma, Deisenhofen) verwendet. Diese wurden mit 10% (DMEM und RPMI) bzw. 20% (IMDM) (je v/v) fetalem Kälberserum (FKS) (Gibco/BRL, Karlsruhe), 2 mM Glutamin (Gibco/BRL, Karlsruhe), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Gibco/BRL, Karlsruhe) versetzt.

Die Bakterienzellen wurden in LB-Medium bzw. auf LB-Agar (Sigma, Deisenhofen) kultiviert.

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

Alle hier nicht ausdrücklich aufgeführten molekularbiologischen Standardmethoden wurden den Protokollen in „*Molecular Cloning*“⁹⁵ und „*Current Protocols in Molecular Biology*“⁹⁶ entsprechend durchgeführt.

Die Klonierung des Ribozyms in den Vektor pLVCT-rtTRKRAB-2SM2 erfolgte analog der Klonierung einer shRNA in diesen Vektor⁹⁷. Die Protokolle sind daher im Folgenden auf die für das Verständnis notwendigen Schritte reduziert.

3.2.1.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

3.2.1.1.1 Herstellung transformationskompetenter *E. coli* DH5 α

Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien, die benötigt wurden, um Plasmide zu vermehren, wurden *E. coli* DH5 α auf einer LB-Agarplatte (Sigma) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde eine einzelne Kolonie isoliert, in 5 ml LB-Medium (Sigma) überführt und über Nacht auf einem Bakterienschüttler bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Am Folgetag wurde 1 ml aus dieser Bakterienkultur entnommen und in 100 ml frisches LB-Medium gegeben. Diese Kultur wurde erneut bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Dabei wurde in regelmäßigen Abständen die optische Dichte der Kultur mit einem BioPhotometer plus (Eppendorf, Hamburg) gemessen bis bei einer Wellenlänge von 600 nm eine Absorbtion von 0,5 erreicht war. Die Bakterienkultur wurde dann 5 min auf Eis gekühlt und anschließend 10 min bei 750 g und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde in 40 ml Transformationspuffer 1 (s.u.) resuspendiert, 90 min bei 4°C inkubiert und dann erneut 10 min bei 750 g und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde in 8 ml Transformationspuffer 2 (s.u.) aufgenommen. Die Bakteriensuspension in Transformationspuffer 2 wurde anschließend in 100- μ l Aliquots schockgefroren und schließlich bei -80°C gelagert.

Transformationspuffer 1:	100 mM RbCl
	50 mM MnCl ₂
	30 mM Kaliumacetat
	10 mM CaCl ₂
	15% Glycerin (pH 5,8)
Transformationspuffer 2:	10 mM MOPS
	10 mM RbCl
	75 mM CaCl ₂
	15% Glycerin (pH 6,8)

3.2.1.1.2 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation wurden die Bakterien auf Eis aufgetaut. Dann wurden 10 µl des Ligationsansatzes zu einem Aliquot kompetenter Zellen gegeben, kurz gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Inkubation bei 42°C für 90 s und einer anschließenden dreißigminütigen Inkubation auf Eis erfolgte die Zugabe von 500 µl LB-Medium und die Kultivierung für 30 min bei 37°C. Je 200 µl des Transformationsansatzes wurden auf Agarplatten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

3.2.1.1.3 Identifikation und Vermehrung positiver Transformanden

Die erfolgreich transformierten Bakterien bildeten Kolonien auf LB-Selektionsagar (100 µl/ml Ampicillin) aus, die am Morgen nach dem Ausstrich der Bakterien isoliert werden konnten. Diese Klone wurden dann in 5 ml LB-Medium mit 100 µl/ml Ampicillin überführt und über Nacht im Bakterieneschüttler bei 37°C und 225 rpm vermehrt. Am nächsten Morgen wurde dann die amplifizierte Plasmid-DNA isoliert, aufgereinigt und durch einen geeigneten Kontrollverdau überprüft. Konnte das korrekte Plasmid nachgewiesen werden, so wurde in größerem Maßstab DNA präpariert oder es wurde zur späteren Verwendung ein Glycerin-Stock der Bakterien angelegt.

3.2.1.1.4 Anlegen von Glycerin-Stocks von *E. coli* DH5α

Klone von *E. coli* DH5α wurden über Nacht in 5 ml LB-Medium vermehrt, mit 20% Glycerin (v/v) versetzt, gut vermischt und sofort in 0,5-ml-Portionen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Danach wurden die Zellen bei -80°C gelagert.

3.2.1.1.5 DNA-Mini-Präparation

DNA-Mini-Präparationen mit einer Ausbeute bis zu maximal 20 µg DNA wurden in der Regel durchgeführt, um zu überprüfen, ob Bakterienklone wirklich das gewünschte Plasmid trugen. Zur Präparation der DNA wurde stets der Qiagen Plasmid Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben benutzt.

3.2.1.1.6 DNA-Maxi-Präparation

Wurde DNA in größerem Ausmaße benötigt, z.B. für Transfektionen, Klonierungen und ähnliche Experimente, so wurde der Endotoxin-freie Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben benutzt. Die DNA-Ausbeute liegt bei Verwendung dieses Kits in einer Größenordnung von ca. 500 µg.

3.2.1.1.7 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die spektralphotometrische Messung von DNA erfolgte bei einer Wellenlänge λ von 260 nm gegen Wasser bzw. TE-Puffer in einer Quarzküvette. Eine Extinktion (E) von 1 entspricht bei dieser Methode einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Für Proteine liegt das Absorptionsmaximum bei 280 nm. Daher kann man aus dem Verhältnis der Extinktionen E260/E280 auf den Reinheitsgrad isolierter Nukleinsäuren schließen. Die DNA wurde nur dann in weitere Versuche eingesetzt, wenn das Extinktionsverhältnis zwischen 1,8 bis 2,0 lag.

Die DNA-Konzentration wurde für alle Versuche auf 1 µg/µl mit TE-Puffer eingestellt.

3.2.1.1.8 Agarosegelelektrophorese

Agarose-Pulver wurde in einer Konzentration von 0,8% (w/v) in Standard-TAE-Puffer gelöst und unter Rühren solange gekocht bis die Lösung klar und schlierenfrei war. Zur Färbung der DNA wurde Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 µg/ml zugegeben. Die Elektrophorese wurde dann bei einer Stromstärke von 200 mA und einer Spannung von ca. 60-80 V durchgeführt.

3.2.1.1.9 DNA-Extraktion aus Agarosegel

Die gesuchten Fragmente wurden auf einem UV-Tisch möglichst sparsam aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des NucleoSpin-Extract-Kits von Macherey-Nagel (Düren) gemäß Herstellerangaben isoliert.

3.2.1.1.10 Enzymatischer DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Alle Restriktionsendonukleasen und sämtliche weiteren DNA-modifizierenden Enzyme wurden über die Firma New England Biolabs GmbH (NEB, Frankfurt am Main) bezogen. Restriktionsendonukleasen sind in der Lage DNA-Doppelstränge zu schneiden. Sie erkennen ein mehr oder weniger spezifisches, meist palindromisches Motiv aus wenigen Basen und schneiden den Doppelstrang dann an einer definierten Stelle innerhalb

dieses Motivs entweder glatt durch, so dass sogenannte *blunt ends* entstehen oder sie schneiden die beiden Stränge gegeneinander versetzt, so dass ein 3'- oder ein 5'-Überhang entsteht. Derartige Überhänge werden als *sticky ends* bezeichnet.

Der Verdau erfolgt bei einer für das Enzym spezifischen Temperatur in einem spezifischen Puffer. Die Firma NEB bietet vier solcher Puffer an. Es können mehrere Enzyme gleichzeitig zu einer DNA-Probe gegeben werden, um sie zu verdauen, sofern diese Enzyme im Hinblick auf Temperaturoptimum und Puffer kompatibel miteinander sind. Im Katalog von NEB finden sich zu den optimalen Versuchsbedingungen umfangreiche Angaben. Manche Enzyme lassen sich durch Hitzeexposition inaktivieren, andere müssen bei Bedarf durch Reinigungstechniken entfernt werden.

Restriktionsverdau sind z.B. im Rahmen von Klonierungen notwendig. Außerdem kann mit Hilfe sogenannter Kontrollverdau anhand des Schnittmusters einer DNA-Probe grob eine Aussage über ihre Sequenz bzw. bestimmte Mutationen getroffen werden. Es kann zum Beispiel durch eine geschickte Enzymwahl entschieden werden, ob ein Fragment, das im Rahmen einer Klonierung in einen Vektor ligiert worden war und dass beidseits, d.h. 3' und 5' identische Überhänge hatte, richtig orientiert im Vektor vorliegt.

Ein typischer Restriktionsverdau erfolgte nach folgendem Beispiel-Protokoll:

- Enzym A: 10.000 IU/ml, 50% Aktivität in Puffer 3 bei 37°C, 5-facher Überverdau empfohlen, damit 95% der DNA wirklich verdaut werden, Inaktivierung bei 65°C/15 min möglich
- Enzym B: 5.000 IU/ml, 100% Aktivität in Puffer 3 bei 37°C, 10-facher Überverdau empfohlen, damit 95% der DNA wirklich verdaut werden, braucht Rinderserumalbumin zur optimalen Aktivität, Inaktivierung bei 80°C/20 min möglich
- Ansatz:
 - 2 µl DNA (= 2 µg)
 - 2 µl Enzym A
 - 4 µl Enzym B
 - 2 µl 10-fach Puffer 3
 - 2 µl Rinderserumalbumin
 - ad 20 µl mit ddH₂O

Inkubation bei 37°C für eine Stunde, danach Inaktivierung bei 80°C (20 min)

3.2.1.1.11 Auffüllen von 5'-Überhängen durch das Klenow-Fragment

Das große Fragment der DNA-Polymerase I, das sogenannte Klenow-Fragment, ist u.a. in der Lage, 5'-Überhänge an DNA-Fragmenten aufzufüllen und so *sticky ends* zu *blunt ends* umzuwandeln. Dazu wurde 1 µg DNA mit 1 U Klenow-Fragment in NEB-Puffer 2, der mit jeweils 33 µM aller vier Nukleotide (dNTP) versetzt worden war, für 15 min bei 25°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration 10 mM) und nachfolgendes Erhitzen auf 75°C für 20 min gestoppt.

3.2.1.1.12 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurden ca. 200 ng *backbone*-DNA mit ca. 50 ng *insert*-DNA und 1 µl T4-DNA-Ligase (NEB) sowie mit 2 µl 10x-T4-Ligase-Puffer gemischt, mit Aqua bidest. auf 20 µl aufgefüllt und über Nacht bei 16°C inkubiert. Dieses Massenverhältnis entsprach bei den meisten Klonierungen einem Stoffmengenverhältnis von 1:4 bis 1:7 zugunsten des *inserts*.

Durch einen Überschuss an *insert*-DNA erhöht sich die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Ligation.

3.2.1.2 Klonierung der Vektoren pLVCT-buRz28 und pLVCT-anti-buRz28

3.2.1.2.1 Herstellung des *Annealing*-Puffers

Der *Annealing*-Puffer bestand aus 100 mM Kaliumacetat, 2 mM Magnesiumacetat und 30 mM HEPES (pH 7,4) in Aqua bidest.

3.2.1.2.2 *Annealing* der Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden mit Aqua bidest. auf eine Konzentration von 1 µM eingestellt. Dann wurden 2 µl der beiden Oligonukleotide mit 46 µl *Annealing*-Puffer versetzt, 4 min bei 95°C inkubiert, dann für 10 min auf 70°C erhitzt und dann auf Raumtemperatur gekühlt. Danach konnten sie bei -20°C gelagert werden.

3.2.1.2.3 Phosphorylierung der Oligonukleotide

Zu 5 µl der *annealten* Oligonukleotide wurden 12 µl Aqua bidest., 2 µl T4-Ligase-Puffer (mit 1 mM ATP) und 1 µl T4-Polynukleotidkinase gegeben. Das Gemisch wurde 30 min bei 37°C inkubiert und dann 10 min bei 70°C Hitze-inaktiviert.

3.2.1.2.4 Verdau von LVTHM

Die *annealten* Oligonukleotide konnten nicht auf direktem Wege in den endgültigen Vektor pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2 kloniert werden. Sie mussten zunächst in das Plasmid pLVTHM und dann in einem zweiten Schritt in den definitiven Vektor kloniert werden.

2 µg pLVTHM wurden über Nacht mit 1 µl MluI und 2 µl ClaI bei 37°C in NEB-Puffer 3 (supplementiert mit 100 µg/ml Rinderserumalbumin (BSA)) in einem Gesamtansatz von 20 µl verdaut. Der Ansatz wurde anschließend durch Gelelektrophorese (s. Abschnitt 3.2.1.1.8) aufgereinigt.

3.2.1.2.5 Ligation der Oligonukleotide mit dem Vektor

5 µl der phosphorylierten Oligonukleotide wurden mit 1 µl (= 20-100 ng) MluI-ClaI-verdaulichem Vektor, 11 µl Aqua bidest., 2 µl T4 Ligase-Puffer und 1 µl (=40 U) T4-Ligase (Gesamtvolumen: 20 µl) gegeben und dann bei 16°C für 16 Stunden inkubiert.

3.2.2 Zellkulturmethoden

3.2.2.1 Kultivierung von Bakterien

E. coli DH5α wurden je nach Anwendung in LB-Medium (Sigma) oder auf LB-Agar bei 37°C kultiviert. Zur Selektion von β-Laktamase-positiven, d.h. transformierten Bakterien wurden dem Medium ggf. 100 µl/ml Ampicillin zugefügt.

3.2.2.2 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die adhärent wachsenden 293T- und HT-1080-Zellen wurden bei 37°C und 5% Kohlenstoffdioxidgehalt der Umluft in einem Inkubator in luftbefeuchteter Umgebung kultiviert. Beide Zelllinien wurden alle zwei bis drei Tage passagiert. Zu diesem Zweck wurde zunächst das Kulturmedium durch Absaugen entfernt. Dann wurden die Zellen ein- bis zweimal mit PBS (*phosphate buffered saline*, PAA, Cölbe), einer Phosphat-gepufferten Salzlösung, die Kalzium- und Magnesium-frei ist, gewaschen und mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,05%/ 0,02%/ w/v; PAA, Cölbe) benetzt (1 ml pro 10-cm-Kulturschale). Danach wurden die Zellen 5-10 min bei 37°C inkubiert, in Medium resuspendiert und zwischen 1:3 und 1:10 (je nach weiterer Versuchsplanung) passagiert.

Die in Suspension wachsenden REH-Zellen wurden in RPMI 1640 mit Zusätzen (s.o.) bei 37°C und 5% Kohlenstoffdioxidgehalt der Umluft in einem Inkubator in luftbefeuchte-

ter Umgebung kultiviert. REH-Zellen wurde alle drei Tage im Verhältnis 1:10 passagiert, indem 90% des Mediums abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt wurden.

3.2.2.3 Transfektion der Produzentenzelllinie HEK293T und Virusproduktion

Die Zelllinie 293T dient in dem vorliegenden Versuchssystem zur Virusproduktion. Aus Sicherheitsgründen wurden die Komponenten, die benötigt werden, um ein infektiöses Lentivirus zu erzeugen, auf verschiedene Plasmide verteilt, mit denen die Produzentenzelle kotransfiziert werden musste, damit sie infektiöse Viruspartikel erzeugen konnte. Das Transferplasmid enthielt dabei u.a. das Transgen, die sogenannten Helferplasmide kodierten für essenzielle Virusproteine (siehe 5.3.).

In der konkreten Anwendung waren pPRIEG7, pPRTAIEG7, pLVCT-buRz28 und pLVCT-anti-buRz28 die Transferplasmide. pPRIEG7 und pPRTAIEG7 hatten einen *tat*-unabhängigen chimären 5'-LTR und waren daher zur Nutzung in einem Drittgenerationsverpackungssystem geeignet, das maximale biologische Sicherheit bot, da die essenziellen Viruskomponenten auf insgesamt vier Plasmide verteilt waren. pLVCT-buRz28 und pLVCT-anti-buRz28 wurden mit einem Verpackungssystem der zweiten Generation genutzt, das mit der Kontransfektion von drei Plasmiden arbeitete.

Tabelle 1: Transfer- und zugehörige Helferplasmide.

Transferplasmide		Helferplasmide	
pPRIEG7	pMDLg/pRRE	pRSV Rev	pMD2.G
pPRTAIEG7	pMDLg/pRRE	pRSV Rev	pMD2.G
pLVCT-buRz28	psPAX2	--	pMD2.G
pLVCT-anti-buRz28	psPAX2	--	pMD2.G

1. Tag

293T-Zellen (2×10^6) wurden auf einer 10-cm-Zellkulturschale (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) in 10 ml DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin ausgesät und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2. Tag

Das Medium wurde gegen frisches Medium gewechselt, das zuvor über Nacht im Brutschrank hinsichtlich Temperatur und CO₂-Gehalt äquilibriert worden war. 400 µl Aqua

ad iniectionabilia (Braun, Melsungen) wurden in einem 15-ml-Röhrchen (BD Falcon, Heidelberg) vorgelegt. Die Plasmid-DNA wurde entsprechend der Angaben in der nachfolgenden Tabelle zugegeben.

Tabelle 2: Für die Kotransfektionen der Virusproduktionszelllinie 293T benötigte Plasmidmengen.

Plasmid	Benötigte DNA
Drittgenerationssystem	
pPRIEG7 oder pPRTAIEG7	20 µg = 20 µl
pMD2.G	6 µg = 6 µl
pMDLg/pRRE	10 µg = 10 µl
pRSV Rev	5 µg = 5 µl
Zweitgenerationssystem	
pLVCT-buRz28 oder pLVCT-anti-buRz28	20 µg = 20 µl
pMD2.G	6 µg = 6 µl
psPAX2	15 µg = 15 µl

Dann wurden zunächst tropfenweise 50 µl 2,5 M CaCl₂-Lösung unter leichtem Schütteln und 500 µl 2 x HBS-Puffer unter starkem Schütteln zugefügt. 2 x HBS-Puffer bestand aus 16 g NaCl, 0,76 g KCl, 0,2 g Na₂HPO₄ (wasserfrei), 10 g HEPES und 2 g Glukose in Milli-Q-Wasser (Millipore, Merck, Billerica, MA, USA), das mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,05 eingestellt, sterilfiltriert und bei -20°C eingefroren wurde.

Das Gemisch wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und durfte dabei keinerlei Bewegung oder Erschütterungen ausgesetzt werden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde es dann ganz vorsichtig tropfenweise auf die vorbereiteten 293T-Zellen gegeben. Die Tropfen wurden nicht in das Medium fallen gelassen, sondern unter direktem Kontakt der beiden Flüssigkeiten vorsichtig in das Medium gegeben.

3. Tag

Das Medium der transfizierten 293T-Zellen wurde gegen IMDM mit GlutaMAX I und 25 mM HEPES (Gibco, Invitrogen, San Francisco, CA, USA) ausgetauscht, das mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin versetzt war. Dieses Medium war zuvor im Inkubator über Nacht hinsichtlich Temperatur und CO₂-Gehalt äquilibriert worden. Das Medium musste sehr vorsichtig zugegeben werden, da sich die 293T-Zellen zu diesem Zeitpunkt extrem leicht von der Kulturplatte ablösten. Danach wurden die Zellen wieder bei 37°C inkubiert.

4. Tag

Der Lentivirus-haltige Zellkultur-Überstand wurde vorsichtig abgenommen, mit einem 0,45-µm-Filter filtriert und direkt verwendet, bei 4°C bis zu einer Woche aufbewahrt oder bei -80°C eingefroren. Das abgenommene Medium wurde wieder durch IMDM ersetzt.

5. Tag

wie 4. Tag

6. Tag

wie 5. Tag

3.2.2.4 Konzentration der Virusüberstände durch Ultrazentrifugation

VSV-G-pseudotypisierte Lentiviren können grundsätzlich durch Ultrazentrifugation konzentriert werden. Hierzu ist eine 120-minütige Zentrifugation bei 50000 g in einer auf 16°C gekühlten Ultrazentrifuge (z.B. Beckman Coulter, Typ TL-100) notwendig. Für die dargestellten Versuche wurden keine konzentrierten Überstände verwendet.

3.2.2.5 Transduktion der HT-1080-Zellen mit Lentivirus-haltigen Zellkultur-Überständen

Die lentivirale Transduktion von HT-1080-Zellen erfolgte, indem 2×10^6 Zellen auf einer 10 cm-Zellkulturplatte (Falcon, Fläche: 58,1 cm²) ausgesät wurden. Am Folgetag wurde das Medium vollständig durch Lentivirus-haltigen Überstand ersetzt. Zu diesem Zeitpunkt konnte bei einer Verdopplungszeit von 30 h eine Zellzahl von ca. $3-3,5 \times 10^6$ angenommen werden. Bei einem Virustiter von $4-7 \times 10^8/10$ ml Virus-haltigem Überstand entsprach dies einer *multiplicity of infection* (MOI) von 100-250. Diesem Ansatz wurden noch 10 µg/ml Protaminsulfat (Sigma) zugesetzt. Der Vorgang wurde am Folgetag wiederholt.

3.2.2.6 Messung der EGFP-Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie

Die mikroskopische Darstellung der EGFP-Expression erfolgte frühestens 48 Stunden nach der Transduktion mithilfe eines inversen Mikroskops (Axiovert 200, Carl Zeiss AG, Oberkochen) und einem MC-Spectrum Green Filterset (AHF Analysentechnik AG, Tübingen). Die Dokumentation erfolgte mit einer AxioCam Mrm Digitalkamera und der Software AxioVision Rel. 4.5 (Carl Zeiss AG, Oberkochen).

3.2.2.7 Messung der EGFP-Expression mittels Durchflusszytometrie

Die Quantifizierung der EGFP-Expression wurde mit einem Durchflusszytometer vom Typ FACSCalibur (BD Biosciences, Heidelberg) vorgenommen, indem die Fluoreszenz im Kanal FL-1 gemessen und als Histogramm mit dekadisch-logarithmischer X-Achse dargestellt wurde. Die Auswertung erfolgte mit der Software FlowJo (Version 7.6.3).

3.2.2.8 Sequenzierung der viral transduzierten HT-1080-Zellen

Die Sequenzierungen wurde bei der Firma GenExpress Gesellschaft für Proteindesign mbH (Berlin) in Auftrag gegeben. Zum Nachweis der Integration des Vektors pLVCT-buRz28 wurden folgende *primer* benutzt:

Forward: 5'-TCGCTATGTGTTCTGGGAAA-3'

Reverse: 5'-GAGCTCCCAGGCTCAGATCT-3'

Für den Nachweis der Integration des Kontrollvektors pLVCT-anti-buRz28 wurden folgende *primer* verwendet:

Forward: 5'-TCGCTATGTGTTCTGGGAAATCA-3'

Reverse: 5'-CTCCCAGGCTCAGATCTGGTC-3'

3.2.2.9 Regulation der lentiviralen Transgene durch Zugabe von Doxycyclin

Die lentiviralen Vektoren pLVCT-buRz28 und pLVCT-anti-buRz28 sind *tet-off*-Vektoren. Das bedeutet, dass die Transgenexpression in Gegenwart des Antibiotikums Doxycyclin zum Erliegen kommen sollte. Zur Unterdrückung der Transgenexpression wurden dem Kulturmedium der HT1080-Zellen mindestens 14 Tage lang 5 µg/ml Doxycyclin (Sigma) zugefügt.

3.2.2.10 Western Blot

Der *Western Blot* diente zum direkten Nachweis des ETV6/RUNX1-Proteins. Zunächst wurden die Gesamtproteine aus den Zellen isoliert und in einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel entsprechend ihrer Molekülgröße voneinander getrennt. Danach wurden die einzelnen Fraktionen auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran, Roth, Karlsruhe) transferiert (sog. „Blotten“). Es erfolgte dann ein spezifischer Proteinachweis auf der Membran durch einen an ETV6/RUNX1 und RUNX1 bindenden Antikörper, der dann wiederum durch einen Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen wurde. In einem letzten Schritt wurde ein Substrat zuge-

geben, das durch die Peroxidase umgesetzt wird und dann luminesziert. Die Lumineszenz wurde mittels einer geeigneten Kamera dokumentiert und mit Hilfe eines Größenstandards konnte die Größe des nachgewiesenen Proteins bestätigt werden.

3.2.2.10.1 Proteinextraktion nach Poirel

Die Proteinextraktion erfolgte nach der Poirel-Methode. Zunächst wurde der sogenannte SDN-Puffer gemäß folgender Tabelle auf Eis angesetzt.

Tabelle 3: Zusammensetzung des SDN-Puffers.

Zielkonz.	Reagenz	Hersteller	Volumen	Stammlösung
100 mM	Tris-HCl pH 8,0	Roth # 9090.3	100 µl	1 M
150 mM	NaCl	Merck #1064005000	30 µl	5 M
0,5%	Na- Deoxycholat	Sigma # D5670	100 µl	5%
0,5%	SDS	Gibco # 15553-035	50 µl	10%
0,5%	NP40	Sigma # I8896	5 µl	100%
5 mM	EDTA pH 8,0	Gibco # 15575-038	10 µl	500 mM
10 mM	NaF	Merck # 1064500025	20 µl	500 mM
1 mM	Pefablock SC	Roche # 11429868001	10 µl	100 mM
1 x	Protease Inhi- bitor Cocktail	Roche # 1697498	100 µl	5 x
50 µM	Na ₃ VO ₄	Merck # 567540-5GM	0,5 µl	100 mM
	H ₂ O		574,5 µl	
Gesamtvolumen			1 ml	

Die Zellen wurden zunächst zentrifugiert und das Medium vollständig abgenommen. 10⁷ Zellen wurden in 900 µl ihres Mediums und 100 µl SDN-Puffer auf Eis resuspendiert und dann 10-12 Ultraschallbehandlungen „mittlerer Stärke“ ausgesetzt. Dazu wurde ein Ultraschall-Homogenisator vom Typ HD2070 mit einem Stufenhorn vom Typ SH70G und einer Mikrospritze vom Typ Sonotrode MS73 (Bandelin Electronic, Berlin) benutzt. Danach wurde die Suspension in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge (Rotanta/R, Hettich, Tuttlingen) 10 min bei 14.000 U/min zentrifugiert und der Protein-haltige Überstand ab-

genommen. Die Proteinkonzentration wurde dann bei einer Wellenlänge von 280 nm mit dem NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Bonn) bestimmt.

3.2.2.10.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophoresen wurden mit dem *Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System* von Bio-Rad (Hercules, CA, USA) durchgeführt. Für die nachfolgenden Versuche wurden Gele mit einer effektiven Blot-Fläche von 7,5 x 10 cm und einer Dicke von 1 cm gegossen. Das Mini-PROTEAN-System wird mit einer ausführlichen Bedienungsanleitung geliefert, so dass im Nachfolgenden nur auf die wesentlichen Schritte eingegangen wird.

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese erfolgte unter Verwendung eines 12%-igen Trenn- und eines 4%-igen Sammelgels. Trenn- und Sammelgel wurden folgenden Tabellen gemäß angesetzt.

Tabelle 4: Zusammensetzung des 12%-igen Trenngels

Acrylamid Rotiphorese® Gel 30	Roth; #3029.1	7,2 ml
Trenngelpuffer 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	Roth; # 9090.3	4,5 ml
APS 10 % in Wasser	Roth; # 9592.2	0,09 ml
TEMED	Sigma; #T2024	0,02 ml
Wasser		6,19 ml
Summe		18 ml

Tabelle 5: Zusammensetzung des 4%-igen Sammelgels

Acrylamid Rotiphorese® Gel 30	Roth; #3029.1	1,33 ml
Sammelgelpuffer 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	Roth; # 9090.3	2,5 ml
APS 10 % in Wasser	Roth; # 9592.2	0,04 ml
TEMED	Sigma; #T2024	0,02 ml
Wasser		6,11 ml
Summe		10 ml

Zunächst wurden die kleine und die große Glasplatte mit dem Platzhalter in der Gießapparatur miteinander verschraubt. Dann wurde das Trenngel bis zum Oberrand der kleinen Platte eingefüllt und mit Isopropanol (100%) überschichtet. Nach dem Polymerisieren des Trenngels (30-45 min) wurde das Isopropanol abgenommen, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein Kamm luftblasenfrei in das Sammelgel eingesetzt. Nach der Polymerisation des Sammelgels (45-60 min) konnte das Gel sofort verwendet oder feucht in einer Tüte bei 4°C für mehrere Tage aufbewahrt werden.

Im Anschluss wurde der Kamm vorsichtig entfernt, die innere Laufkammer vollständig sowie die äußere Laufkammer zur Hälfte mit Laufpuffer befüllt und die Taschen mit den Proteinextrakten (je 50 µg) beladen. Sie wurden dazu mit Laemmli-Puffer (5 x) im Verhältnis 1:5 gemischt, 5 min bei 95°C denaturiert und dann auf das Gel gegeben (20 µl Gesamtvolumen bei 10 Taschen/Gel und 15 µl Gesamtvolumen bei 15 Taschen/Gel).

Tabelle 6: Zusammensetzung des Laufpuffers (10 x)

Tris-Base	30,3 g	250 mM
Glycin	150,14 g	2 M
SDS	5 g	1%
Aqua dest.	ad 1000 ml	

Tabelle 7: Zusammensetzung des Laemmli-Puffers (5 x)

1 M Tris/HCl (pH 6,8)	3 ml	60 mM
SDS	1 g	10%
Glycerol	5 ml	50%
Beta-Mercaptoethanol	2 ml	10%
Bromphenolblau	25 mg	1,5%

Als Größenstandard wurden 5 µl peqGold Protein-Marker VI (Peqlab, Erlangen) aufgetragen, leere Taschen wurden mit Laemmli-Puffer (5 x) aufgefüllt. Zum Einlaufen der Proben in das Gel wurde für 20 min eine Spannung von 80 V angelegt. Danach wurden 180 V angelegt bis der Marker den unteren Gelrand fast erreicht hatte (ca. 90 min).

3.2.2.10.3 Übertragen der Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran nach der Semi-Dry-Methode

Zunächst wurden eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran, Roth, Karlsruhe) und vier Filterpapiere (Roth, Karlsruhe) auf die Größe des Gels zugeschnitten. Dann wurde das Gel 5 min in gekühltem Transferpuffer äquilibriert, um SDS und Salze zu entfernen. Die PVDF-Membran wurde zunächst 2 min in 100% Methanol und dann 2 min in Transferpuffer gebadet. Die Filterpapiere wurden kurz in Transferpuffer getränkt.

Im Anschluss wurde der Blotstapel in folgender Richtung aufgebaut:

Kathode
1. Filterpapier
2. Filterpapier
Gel
PVDF-Membran
3. Filterpapier
4. Filterpapier
Anode

Eingeschlossene Luftblasen wurden so gut wie irgend möglich entfernt. Zuletzt wurden die Proteine durch Anlegen einer Spannung von 12 V für 90 min vom Gel auf die Membran transferiert („geblottet“). Das Blotten erfolgte in einem *Semidry Blotter* (Trans-Blot SD Cell and Systems; Bio-Rad, Hercules, CA, USA, #170-3848)

Tabelle 8: Zusammensetzung des Transferpuffers (10 x), pH 8,1-8,4

Tris-Base	19,3 g
Glycin	90 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Tabelle 9: Zusammensetzung des Transferpuffers (1 x). Der Puffer sollte bei Benutzung eiskalt sein.

Transferpuffer (10x)	100 ml
Methanol (100%)	100 ml
Aqua dest.	800 ml

3.2.2.10.4 Immundetektion

Zur Absättigung unspezifischer, freier Proteinbindestellen wurde die PVDF-Membran nach dem Blotten zunächst eine Stunde lang mit Block-Puffer (Roth, Karlsruhe, #A151.1) blockiert. Dann wurde der Primärantikörper (RUNX1-rabbit-mAB, Epitomics, Burlingame, CA, USA, #2593-1) zugegeben und der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran drei Mal 15 min mit PBST gewaschen, ehe der Sekundärantikörper (*HRP conjugated Donkey anti-rabbit*, Amersham, #NA9340-1ML) zugegeben wurde. Es folgte dann eine Inkubationszeit von 1-2 h bei Raumtemperatur. Abschließend wurde die Membran drei Mal 15 min mit PBST gewaschen.

Mit Hilfe des „*SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate*“ (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) wurde die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase spezifisch nachgewiesen. Hierzu wurden die beiden Komponenten des Kits im Verhältnis 1:1 gemischt und 2 ml dieser Lösung für 1 min auf die Membran gegeben. Die Entwicklung der Membran erfolgte mittels VersaDoc Imaging Systems (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Die Detektion des Signals erfolgte dann mit einem *Molecular Imager VersaDoc MP 4000* System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA, #170-8640).

3.2.2.11 Quantitative PCR

Die quantitativen PCR-Untersuchungen und die dazu notwendigen Vortestungen wurden von der Firma GenExpress Gesellschaft für Proteindesign mbH (Berlin) durchgeführt auf einem LightCycler 480 (Roche Applied Science, Mannheim) durchgeführt. Jede Probe wurden je zwei Mal und auf je drei unterschiedliche Referenzgene (*Aktin*, *HPRT*, *ABL*) normiert untersucht. Die Rationale zur Auswahl dieser Referenzgene ist im Ergebnisteil erläutert (siehe Seite 57).

Die Normierung ist notwendig, um Schwankungen in der Menge der in den Versuch eingesetzten cDNA auszugleichen. Die Hauptrationale bei der Auswahl eines Referenzgens ist, dass die Expression dieses Gens unter variierenden Versuchsbedingungen konstant bleiben sollte. Geeignete Referenzgene sind entsprechend von den untersuchten Zellen und von den Versuchsbedingungen abhängig, denen diese Zellen ausgesetzt werden. Die Expression des untersuchten Gens kann dann relativ auf die Expression des Referenzgens bezogen werden.

4 Ergebnisse

4.1 Klonierungen

Im ersten experimentellen Teil der Promotionsarbeit wurden sechs lentivirale Transferplasmide für die Produktion von fünf lentiviralen Vektoren kloniert, pPRTAEG diente lediglich als Zwischenstufe, um die Klonierung von pPRTAIEG7 zu erleichtern. Die Klonierungen sind methodisch im Abschnitt 3.1.2 beschrieben.

- PRIEG3 und PRIEG7 waren als Kontrollvektoren konzipiert, d.h. sie transduzierten die Zielzellen nur mit der cDNA für das grün fluoreszierende Protein EGFP, was eine Bestimmung der Transduktionseffizienz erlauben sollte.
- PRTAIEG7 war ein Vektor für *ETV6/RUNX1* und *EGFP* und sollte zur Koexpression der beiden Proteine in den Zielzellen führen.
- LVCT-buRz28 war ein lentiviraler Vektor, der in den Zielzellen zur Expression des Ribozyms buRz28 führen sollte. Außerdem enthielt der Vektor Sequenzen die eine Doxycyclin-abhängige Regulation der Transgenexpression erlauben sollten sowie *GFP* als Reportergen.
- LVCT-anti-buRz28 war bis auf die Ribozymsequenz identisch mit LVCT-buRz28. Er enthielt stattdessen eine zum Ribozym buRz28 komplementäre Sequenz, die zur Expression einer mutmaßlich funktionslosen RNA führen sollte und diente somit als Kontrollvektor.

4.1.1 Kontrollvektor PRIEG3

Als Kontrollvektor zur Ermittlung der Transduktionseffizienz wurde PRIEG3 kloniert. PRIEG3 enthielt als Transgen lediglich die cDNA für *EGFP*. Am 5'-Ende der transgenen Sequenz lag eine IRES, die theoretisch zu einer verbesserten EGFP-Expression führen sollte. Da in Vorversuchen eher eine verschlechterte Expression zu beobachten war, wurde der Vektor noch einmal modifiziert. Das Resultat war PRIEG7. PRIEG3 wurde für die dargestellten Versuche letztlich überhaupt nicht verwendet.

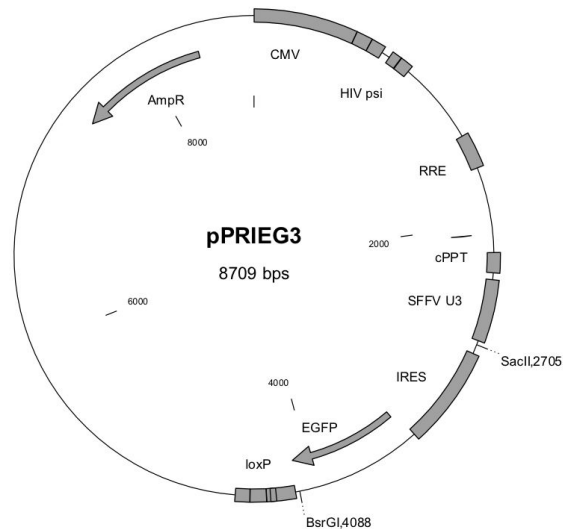


Abbildung 20: Lentivirales Transferplasmid pPRIEG3 (siehe auch 3.1.2.4).

4.1.2 Kontrollvektor PRIEG7

Durch die Einführung einer Kozak-Sequenz in den Vektor PRIEG3 konnte die EGFP-Expression erheblich verbessert werden (Abbildung 24). Der entsprechende Vektor wurde mit PRIEG7 bezeichnet. Die Kozak-Sequenz war in PRIEG7 3' der IRES im Bereich des *EGFP*-Startkodons lokalisiert. Kozak-Sequenzen werden von Ribosomen erkannt und sind wichtig für den Start der Translation während der Proteinbiosynthese. Neben *EGFP* enthielt der Vektor keine weiteren Transgene. PRIEG7 diente in den hier dargestellten Experimenten daher als Kontrollvektor.

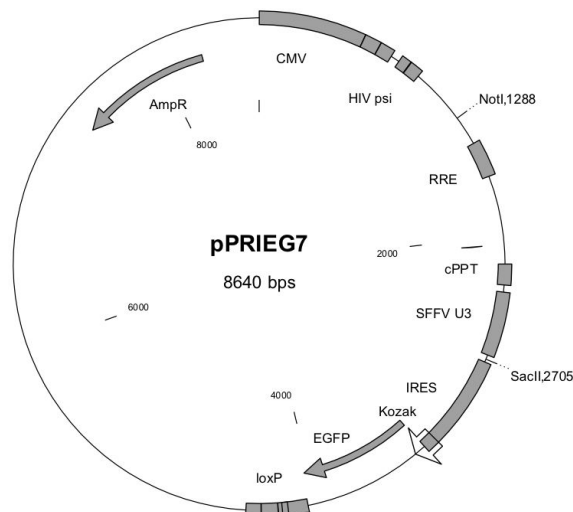


Abbildung 21: Lentivirales Transferplasmid pPRIEG7 (siehe auch 3.1.2.6)

4.1.3 pPRTAEG

pPRTAEG war von vornherein nur als Zwischenstufe für die Klonierung von pPRTAIEG7 gedacht. pPRTAEG basierte auf PR1, in dessen *multiple cloning site* die cDNA für *ETV6/RUNX1* kloniert wurde. 3' dieser Sequenz lag die cDNA für *EGFP*. Durch diesen Zwischenschritt ergaben sich sehr günstige Schnittstellen für die Klonierung von pPRTAIEG7.

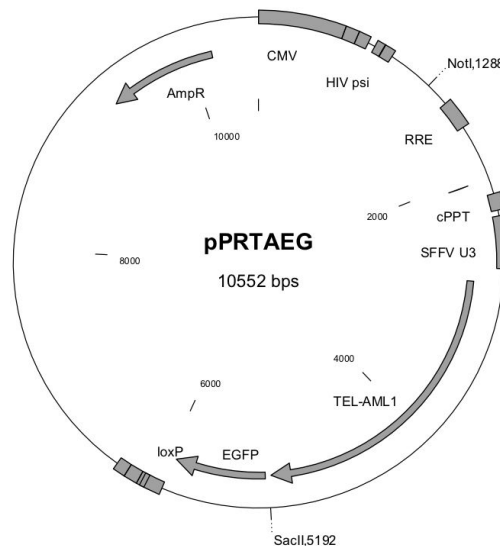


Abbildung 22: Lentivirales Transferplasmid pPRTAEG (siehe auch 3.1.2.7)

4.1.4 *ETV6/RUNX1*-Vektor PRTAIEG7

Zur Kotransfektion von Zielzellen mit der *ETV6/RUNX1*-cDNA und *EGFP*-cDNA als Reporter gen wurde das lentivirale Transferplasmid pPRTAIEG7 kloniert. pPRTAIEG7 basierte auf pPRIEG7 und enthielt zusätzlich im Bereich der *multiple cloning site* die cDNA für *ETV6/RUNX1*. Die Kotransfektion von 293T-Zellen mit pPRTAIEG7, pMDLg/pRRE, pRSV Rev und pMD2.G führte zur Bildung replikationsinkompetenter lentiviraler Partikel, die genutzt werden konnten, um geeignete Zielzellen mit *ETV6/RUNX1* und *EGFP* zu kotransduzieren. Die EGFP-Expression konnte zur Quantifizierung der Transduktionseffizienz genutzt werden.

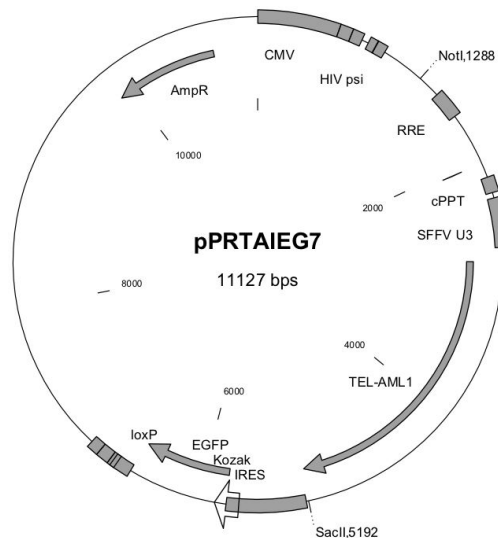


Abbildung 23: Lentivirales Transferplasmid pPRTAIEG7 (siehe auch 3.1.2.8)

4.1.5 Ribozymvektor LVCT-buRz28

Für die *Silencing*-Versuche mit dem Ribozym buRz28 wurde der Vektor LVCT-buRz28 kloniert. LVCT-buRz28 transferierte das Ribozym *buRz28* und *EGFP* als Reportergen in die Zielzellen. Beide Transgene waren Teil eines komplexen Tetrazyklin-regulierten Systems, das ebenfalls auf dem Vektor *in cis* kodiert war (siehe Abschnitt 1.6). Die Regulation der Transgenexpression erfolgte durch die An- oder Abwesenheit von Doxycyclin im Kulturmedium. Doxycyclin im Kulturmedium führte zur Repression der Transgenexpression (siehe auch Abschnitt 3.1.2.10).

4.1.6 Kontrollvektor LVCT-anti-buRz28

LVCT-anti-buRz28 war bis auf die Ribozymsequenz vollständig identisch mit LVCT-buRz28. Statt mit der Ribozymsequenz transduzierte dieser Vektor seine Zielzellen jedoch mit einer zur Ribozymsequenz komplementären und damit funktionslosen Sequenz. Er diente somit als Negativkontrolle. LVCT-anti-buRz28 war ebenfalls ein durch Doxycyclin regulierbarer *tet-off*-Vektor.

Aus Kostengründen wurde keiner dieser vier Vektoren vollständig sequenziert. Eine korrekte Sequenz wurde dann angenommen, wenn die beim Verdau der Vektorplasmide mit Restriktionsendonukleasen entstehenden Fragmente die theoretisch erwarteten Längen aufwiesen. In pLVCT-buRz28 und pLVCT-anti-buRz28 wurde zusätzlich der kritische Bereich sequenziert (siehe 4.4 und 4.5), in dem sich die DNA befand, die nach reverser Transkription, Intergration ins Genom der Zielzelle und nachfolgender Tran-

skription durch die zelluläre Expressionsmaschinerie zur Bildung des Ribozyms in der Zielzelle führen sollte (siehe auch Abschnitt 3.1.2.10).

4.2 Virusproduktion und *multiplicity of infection* (MOI)

Die Güte der Virusproduktion wurde funktionell kontrolliert. Als indirektes Maß für den Virustiter diente die Quantifizierung der EGFP-Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflusszytometrie. Das heißt, es wurden keine Messungen der Virustiter vorgenommen. Aus eigenen Versuchsserien mit dem gleichen Vektorsystem war bekannt, dass die Virustiter durchschnittlich in einer Größenordnung von $4-7 \times 10^4/\mu\text{l}$ (entsprechend $4-7 \times 10^8/10 \text{ ml}$) liegen⁹⁸. Daraus ergab sich bei $3-3,5 \times 10^6$ HT-1080-Zielzellen auf einer 10-cm-Platte eine MOI in einer Größenordnung 100-250.

4.3 HT-1080-Zellen exprimieren *ETV6/RUNX1* nach Transduktion mit PRTAIEG7

Der Vektor PRTAIEG7 wurde als bicistronisches Konstrukt kloniert, um Zellen erzeugen zu können, die gleichzeitig ETV6/RUNX1 und EGFP exprimieren. EGFP diente in diesem System als Reporterprotein, das die erfolgreiche Transduktion der Zielzelle und die Expression der Transgene signalisierte. Da EGFP nur ein indirekter Marker der ETV6/RUNX1-Expression war, wurde die Koexpression von ETV6/RUNX1 in Vorversuchen durch *Western-Blot*-Untersuchungen nachgewiesen (Abbildung 24). In der Folge wurde dann nur noch die EGFP-Expression dokumentiert und eine ETV6/RUNX1-Koexpression in EGFP-exprimierenden Zellen als gegeben vorausgesetzt.

Die nachfolgende Abbildung 24 zeigt, dass HT-1080-Zellen nach einmaliger Transduktion gemäß dem in Abschnitt 3.2.2.5 beschriebenen Standardprotokoll nahezu vollständig EGFP exprimierten. Im *Western Blot* und in der rtPCR zeigte sich zudem eine sehr hohe Expression von ETV6/RUNX1.

Durch Transduktion mit dem lentiviralen Vektor PRTAIEG7 konnte also eine *ETV6/RUNX1*-positive HT-1080-Zelllinie (HT-1080-TA1) generiert werden, die der Ausgangspunkt für alle weiteren Versuche in dieser Dissertation war. In der quantitativen PCR zeigte sich auf cDNA-Ebene, dass HT-1080-TA1-Zellen durchschnittlich eine 270-fache ETV6/RUNX1-Expression im Vergleich zu *ETV6/RUNX1*-positiven REH-Zellen aufwiesen, die in der Mess-Serie als Referenz dienten.

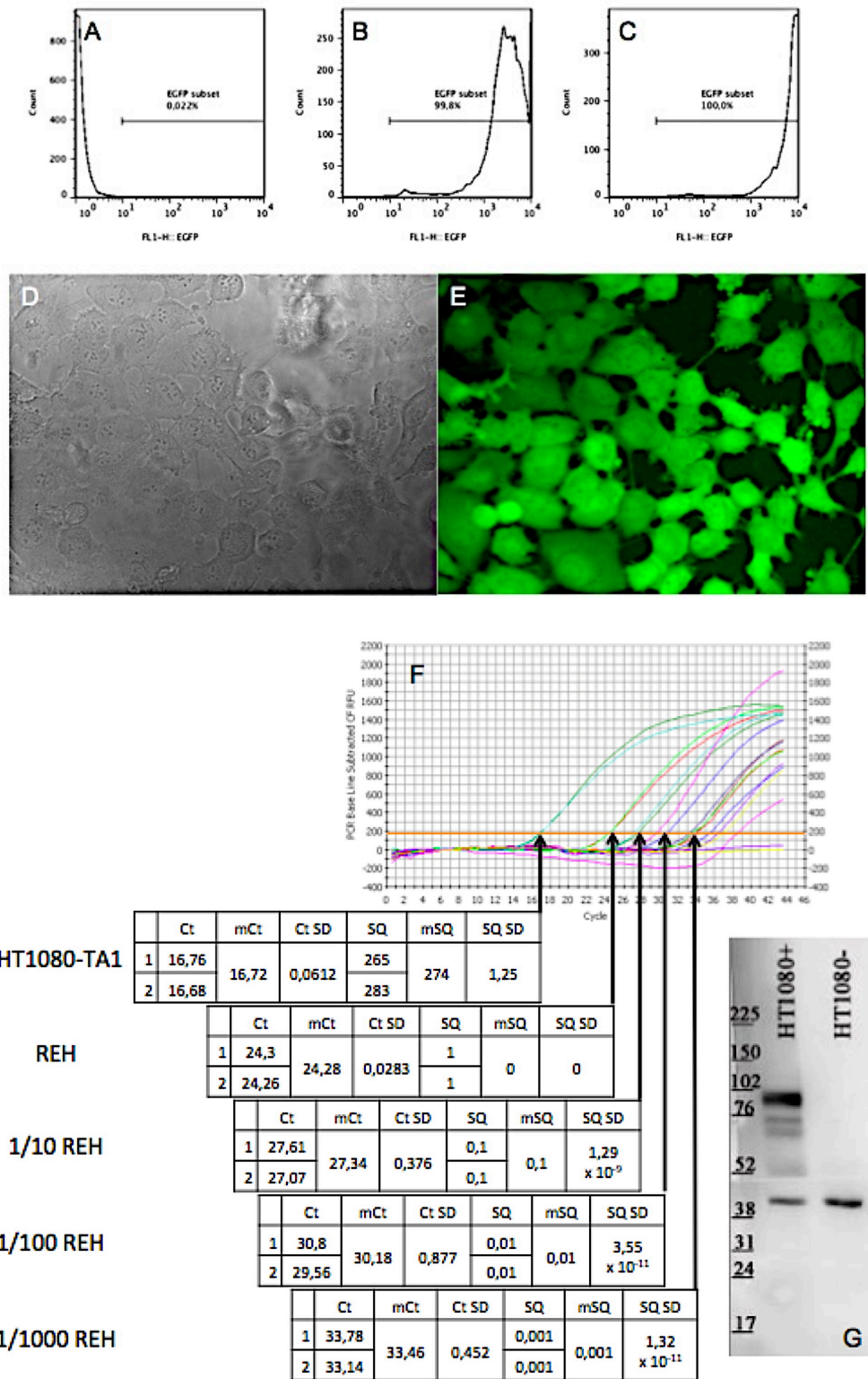


Abbildung 24: Lentivirale Transduktion HT-1080-Zellen mit ETV6/RUNX1. HT-1080-Zellen zeigen nach einmaliger Exposition gegenüber PRTAIEG7 eine nahezu vollständige Transduktion. *Durchflusszytometrie*: A) Negativkontrolle, B) so gut wie alle HT-1080-Zellen exprimieren nach einmaliger Transduktion mit dem Leervektor PRIEG7 das EGF-Protein, C) Alle HT-1080-Zellen exprimieren nach einmaliger Transduktion mit dem bicistronischen Vektor pPRTAIEG das EGF-Protein. *Mikroskopie (400-fach)*: HT-1080-Zellen nach einmaliger Transduktion mit PRTAIEG7 D) im Durchlicht und E) in der Fluoreszenzmikroskopie. *Quantitative PCR*: F) 274-fache Expression von ETV6/RUNX in den transduzierten HT-1080-Zellen im relativen Vergleich zu REH-Zellen, deren Expressionsniveau als 1 definiert wurde. *Western Blot*: G)

HT-1080-TA1 (links) vs. HT-1080-Wildtyp (rechts). Nach RUNX1-Detektion zeigt sich die charakteristische ETV6/RUNX1-Bande bei ≈ 96 kDa.

4.4 LVCT-buRz28 integriert in das HT1080-TA1-Genom

HT-1080-TA1-Zellen wurden lentiviral mit dem Vektor pLVCT-buRz28 transduziert, der die Zellen zur Expression des gegen *ETV6/RUNX1*-gerichteten Ribozyms veranlassen sollte. Der Nachweis der dafür notwendigen DNA-Sequenz im Genom der Zielzellen erfolgte durch Sequenzierung (Abbildung 25). Die mit buRz28 transduzierten Zellen wurden anschließend als HT-1080-TA1-buRz28 bezeichnet. Ein Nachweis der Expression des Ribozyms erfolgte nicht.

```
5'-CTTTGGATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACGCGTCCCCCATTCC-  
AAGCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAATGCTGCTATTTTTGGAAATCGATAC-  
CGTCGCATGGGAATAACTTCGTATAGCATAACATTATACGAAGTTATGCTGCTTTTT-  
GCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCC-3'
```

Abbildung 25: Ergebnis der DNA-Sequenzierungen von zwei HT-1080-ETV6/RUNX1-Zelllinien, die zuvor mit LVCT-buRz28 transduziert worden waren. Die eigentliche Ribozym-Sequenz ist unterlegt und entspricht der erwarteten Sequenz.

4.5 LVCT-anti-buRz28 integriert in das HT1080-TA1-Genom

Als Negativkontrollen wurden als HT-1080-TA1-anti-buRz28 bezeichnete Zelllinien generiert, die eine zum Ribozym buRz28 komplementäre Sequenz enthielten. Die durch diese Sequenz kodierte RNA war weder in der Lage, eine Ribozym-Struktur auszubilden, noch an die Ziel-DNA zu binden und damit inert. Die entsprechende Sequenz wurde mit dem lentiviralen Vektor pLVCT-anti-buRz28 in die Zielzellen eingebracht und ihre Integration in das Genom der HT1080-TA1-Zellen durch Sequenzierung nachgewiesen (Abbildung 26).

```
5'-GTCTTTGGATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACGCGTCCCCGTAA-  
GGTTCGACTACTCAGGCACTCCTGCTTTACGACGATTTTTGGAAATCGATAC-  
CGTCGCATGGGAATAACTTCGTATAGCATAACATTATACGAAGTTATGCTGCTTTTT-  
GCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAG-3'
```

Abbildung 26: Ergebnis der DNA-Sequenzierungen von zwei HT-1080-TA1-Zelllinien, die zuvor mit dem Kontrollvektor LVCT-anti-buRz28 transduziert worden waren. Die zum Ribozym komplementäre Sequenz ist rot unterlegt und entspricht der erwarteten Sequenz.

4.6 HT-1080-Zellen exprimieren *EGFP* nach Transduktion mit LVCT-buRz28 und LVCT-anti-buRz28

Da HT-1080-TA1-Zellen bereits *EGFP* durch die Transduktion mit dem Vektor PRTAIEG7 koexprimierten, konnte die Expression von *EGFP* nicht als Marker und Maß für eine Transduktion dieser Zellen mit LVCT-buRz28 oder LVCT-anti-buRz28 benutzt werden. Deswegen wurden parallel stets *EGFP*-negative HT-1080-Wildtyp-Zellen mit den genannten Vektoren transduziert. Die Effizienz der Transduktion der Wildtyp-Zellen wurde dann als indirektes Maß für die Transduktionseffizienz der *ETV6/RUNX1*-positiven Zellen genutzt.

Dabei zeigten sich in einem repräsentativen Experiment folgende Ergebnisse nach dreimaliger Transduktion:

Tabelle 10: *EGFP*-Expression nach dreimaliger Transduktion

Zelllinie	1. Ansatz	2. Ansatz	Mittelwert
HT-1080 wt (Negativkontrolle)	1,16%	--	1,16%
HT-1080-TA1 (Positivkontrolle)	98,3%	--	98,3%
HT-1080 + LVCT-buRz28	77,6%	87,2%	82,4%
HT-1080 + LVCT-anti-buRz28	36,4%	54,2%	45,3%

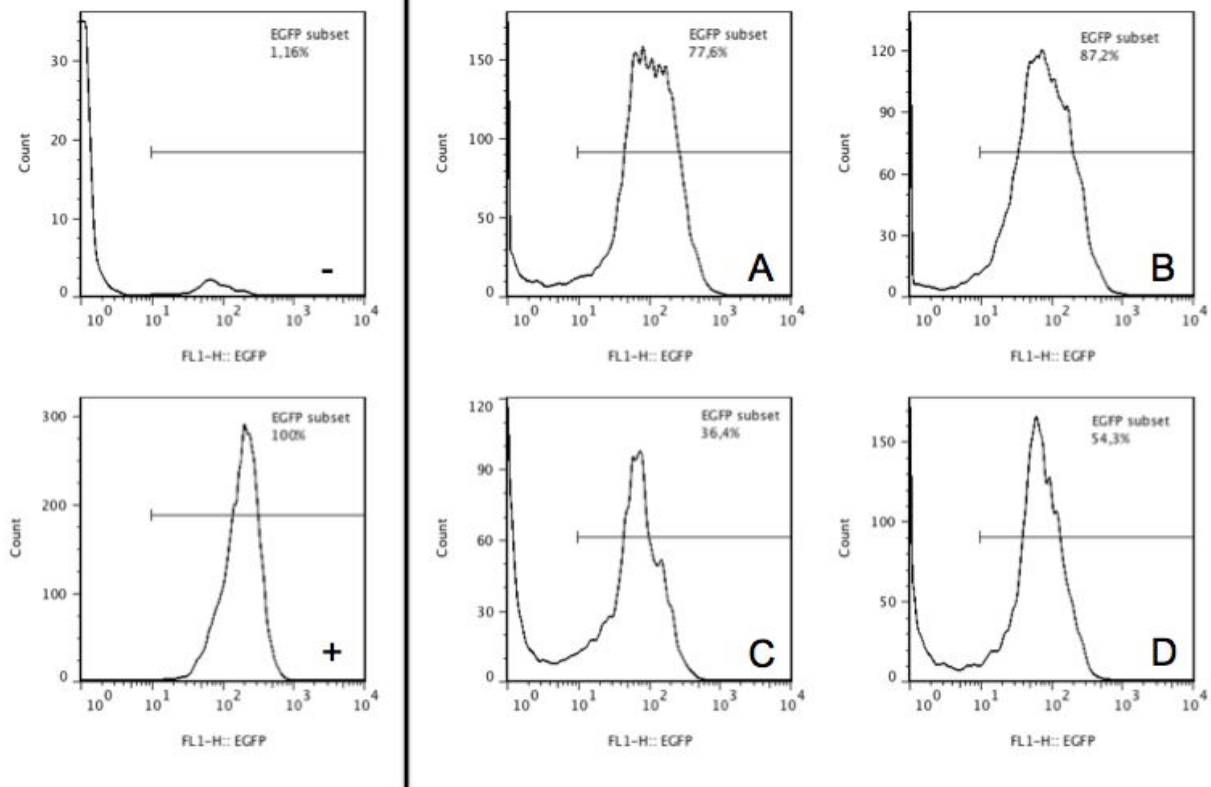


Abbildung 27: Bestimmung der EGFP-Expression als Maß für die Effizienz der Transduktion von HT-1080-Wildtyp-Zellen durch die lentiviralen Vektoren LVCT-buRz28 (A und B) und LVCT-anti-buRz28 (C und D). „-“ bezeichnet die Negativkontrolle (HT-1080-Wildtyp) und „+“ die Positivkontrolle (HT-1080-TA1). Die kleine EGFP-positive Population bei 10^2 in der Negativkontrolle kommt durch ein Verschleppen von Zellen der Positivkontrolle in die Negativkontrolle während der Geräteeinstellung zustande.

4.7 Regulation von EGFP durch Doxycyclin

Die Vektoren LVCT-buRz28 und LVCT-anti-buRz28 sind Tetrazyklin-regulierte *tet-off*-Vektoren. Das bedeutet, dass eine Abhängigkeit der Transgenexpression von der Anwesenheit von Tetrazyklin-Antibiotika besteht. Im vorliegenden System führte die Anwesenheit von Doxycyclin im Kulturmedium zu einer Unterdrückung der EGFP-Expression. Überführte man die Doxycyclin-behandelten Zellen erneut in Doxycyclin-freies Medium, so kam es wieder zur Expression der transgenen EGFP-Sequenz. Die Regulierbarkeit des Vektorsystems wurde nur anhand der Messung der EGFP-Expression überprüft.

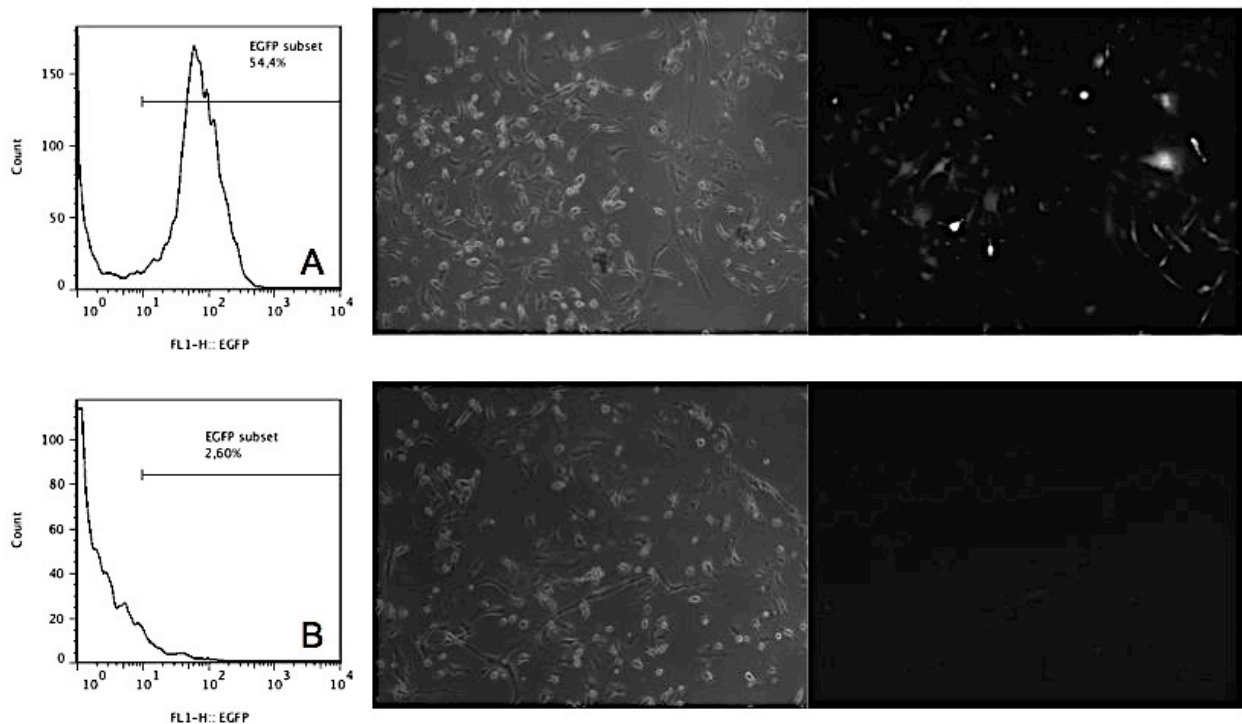


Abbildung 28: EGFP-Expression von HT-1080-Zellen nach einmaliger Transduktion mit pLVCT-anti-buRz28. Die Zellen exprimieren zu 54% EGFP (A). Nach 14-tägiger Inkubation in Doxycyclin-haltigem Medium zeigen die Zellen fast keine Expression des lentiviral-transferierten *EGFP*-Gens mehr (B). Links: Durchflusszytometrie, Mitte: Durchlichtmikroskopie, rechts: Fluoreszenzmikroskopie.

4.8 Ribozymale Reduktion (LVCT-buRz28) der *ETV6/RUNX1*-Expression von HT1080-TA1

Die Versuchsserien zeigen, dass das lentiviral mit dem Vektor pLVCT-buRz28 in die Zielzellen HT-1080-TA1 eingebrachte Ribozym buRz28 in der Lage ist, die Expression von *ETV6/RUNX1* zu reduzieren. Als Maß dafür diente die Menge an *ETV6/RUNX1*-messenger-RNA, die per quantitativer rtPCR bestimmt wurde. Die *ETV6/RUNX1*-Expression wurde auf die Expression von drei verschiedenen Referenzgenen bezogen, deren eigene Expression ungefähr im Bereich der Expression des Testgens (*ETV6/RUNX1*) liegen und nicht durch die Expression des Testgens beeinflusst sein sollte. Sie sollte demnach theoretisch zu jedem Zeitpunkt in der Versuchsreihe konstant sein. Es wurden drei unterschiedliche Referenzgene (*β-Aktin*, *ABL1*, *HPRT*) gewählt. Diese Gene zeigten in Vorversuchen in *ETV6/RUNX1*-positiven und HT-1080-Wildtyp-Zellen offenbar keine Unterschiede in ihrer Expression und wurden daher als geeignete Referenzgene betrachtet (bislang nicht publizierte Daten von Katja Kaulfuß und Thomas Heiden, siehe Abbildung 29).

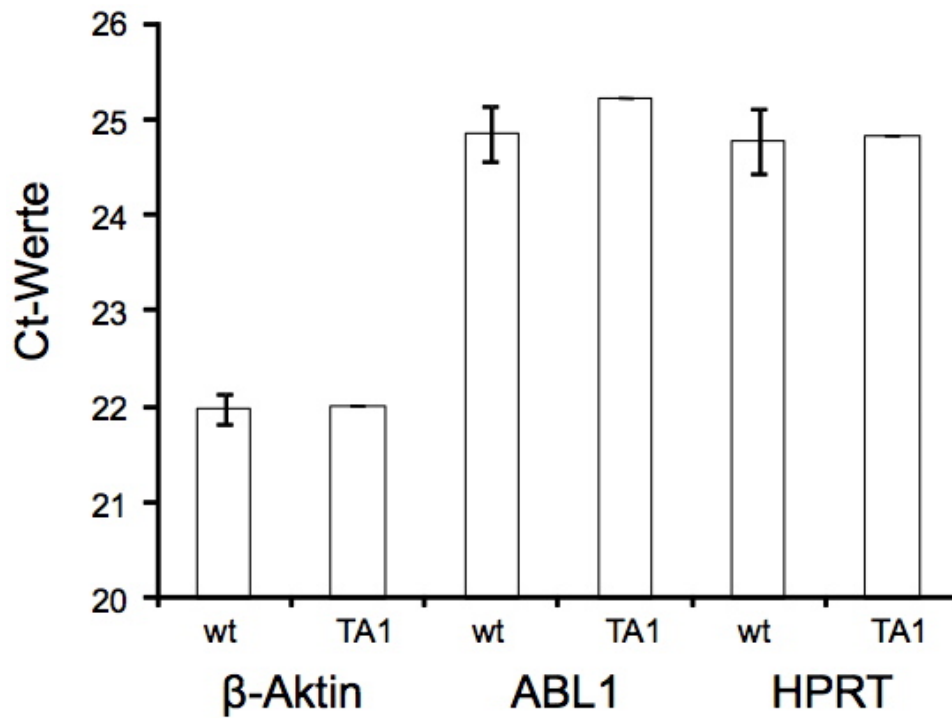


Abbildung 29: Expression von β -Aktin, ABL1 und HPRT in fünf HT-1080-Wildtyp-Zelllinien (Mittelwert \pm Standardabweichung) und einer ETV6/RUNX1-positiven HT-1080-Zelllinie (HT-1080-TA1). ETV6/RUNX1-positive und Wildtypzellen zeigen offenbar keine Unterschiede in der Expression von β -Aktin, ABL1 und HPRT (mit freundlicher Genehmigung von Katja Kaulfuß und Dr. Dr. Thomas Heiden).

In allen drei Systemen zeigte sich ein Rückgang der *ETV6/RUNX1*-Expression um zirka ein Drittel im Vergleich zu den Kontrollzellen (HT-1080-TA1 und HT-1080-TA1-anti-buRz28, siehe Abbildung 30).

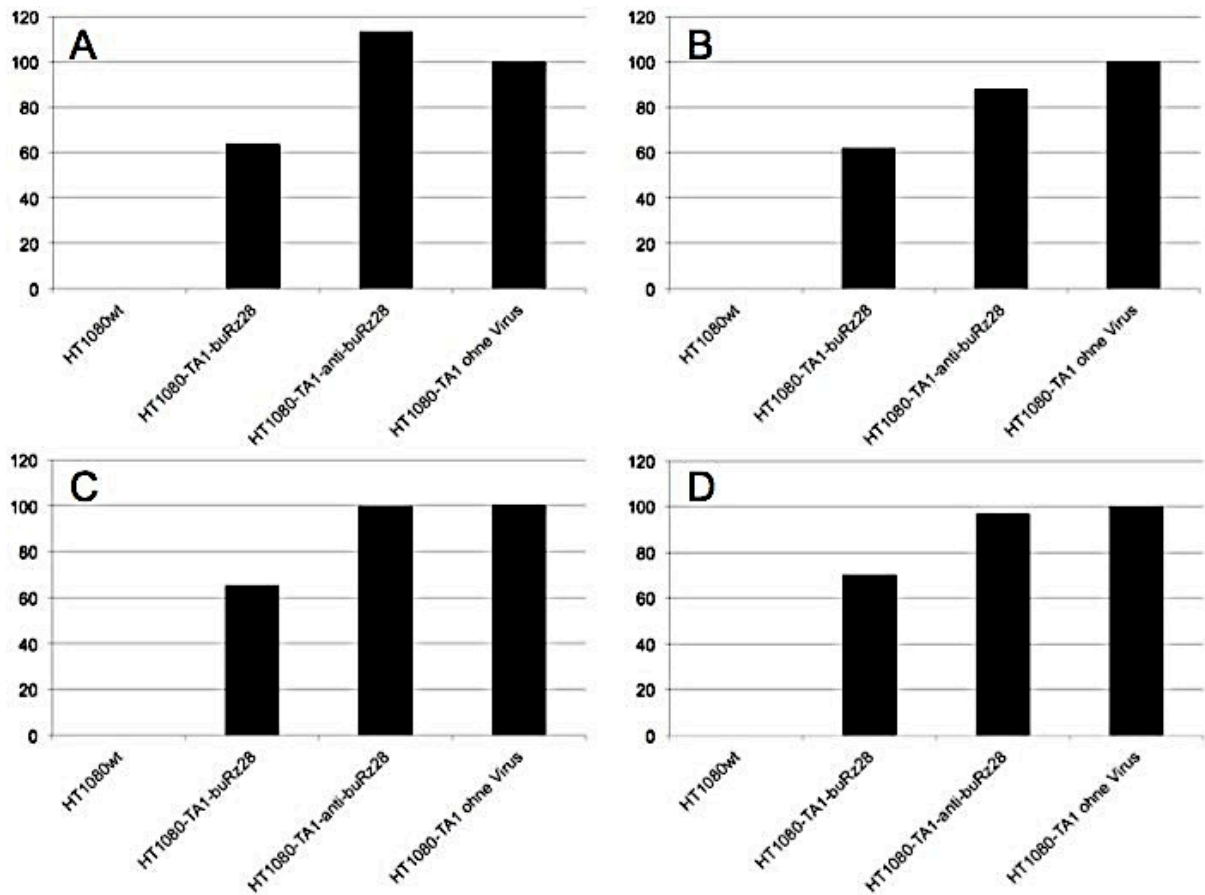


Abbildung 30: Relative *ETV6/RUNX1*-Expression von HT-1080-Wildtyp-Zellen (Negativkontrolle), HT-1080-TA1-buRz28 und HT-1080-TA1-anti-buRz28 (Positivkontrolle) im Verhältnis zu HT-1080-TA1 (jeweils in [%]). Die *ETV6/RUNX1*-Expression in HT-1080-TA1-Zellen wurde immer als 100% definiert. In A) wurde β -Aktin als Referenzgen verwendet, in B) *ABL* und in C) *HPRT*. In D) sind die Mittelwerte aller drei Systeme aufgetragen. Es zeigt sich, dass die *ETV6/RUNX1*-Expression durch lentivirale Transduktion der HT-1080-TA-Zellen mit dem Ribozym buRz28 im Mittel um ca. 1/3 zurück ging.

Tabelle 11: Rohwerte zu Abbildung 30

	<i>ETV6/RUNX1</i> gegen	Zelllinie	1. Serie $2^{-\Delta Ct}$	2. Serie $2^{-\Delta Ct}$	Mittelwert $2^{-\Delta Ct}$	Relative Ex- pression	Ex-
A	<i>β-Aktin</i>	HT-1080wt	0	0	0	0%	
		HT-1080-TA1- buRz28	8,01	7,82	7,92	63,73%	
		HT-1080-TA1- anti-buRz28	15,61	12,55	14,08	113,37%	
		HT-1080-TA1 ohne Virus	12,42	-	12,42	100%	
B	<i>ABL</i>	HT-1080wt	0	0	0	0%	
		HT-1080-TA1- buRz28	64,52	78,28	71,40	61,96%	
		HT-1080-TA1- anti-buRz28	108,43	94,4	101,42	88,01%	
		HT-1080-TA1 ohne Virus	115,23	-	115,23	100%	
C	<i>HPRT</i>	HT-1080wt	0	0	0	0%	
		HT-1080-TA1- buRz28	58,99	64,36	61,68	70,37%	
		HT-1080-TA1- anti-buRz28	88,28	81,7	84,99	96,97%	
		HT-1080-TA1 ohne Virus	87,64	-	87,64	100%	
D			<i>β-Aktin</i>	<i>ABL</i>	<i>HPRT</i>	Mittelwert	
		HT-1080wt	0%	0%	0%	0%	
		HT-1080-TA1- buRz28	63,73%	61,96%	70,37%	65,35%	
		HT-1080-TA1- anti-buRz28	113,37%	88,01%	96,98%	99,45%	
		HT-1080-TA1 ohne Virus	100%	100%	100%	100%	

5 Diskussion

5.1 ETV6/RUNX1-Fusion

Obwohl die Mechanismen der zellulären Transformationen durch Veränderungen von *ETV6* und *RUNX1* noch weitgehend unklar sind, scheint gesichert, dass Deletionen von und Fusionen mit *ETV6* (Chromosom 12p13) zu verschiedenen malignen hämatologischen Erkrankungen beitragen^{3,10,33,34}. Murine Modelle veranschaulichen jedoch, dass *ETV6/RUNX1* nur ein geringes Transformationspotential besitzt und alleine nicht zur Ausprägung einer Leukämie ausreicht⁹⁹⁻¹⁰¹. *ETV6/RUNX1-knock-in*-Mäuse entwickeln keine Leukämie und Wachstumsfaktor-abhängige Zelllinien, die von *ETV6/RUNX1*-exprimierenden murinen Progenitoren stammen, sind nach Transplantation in bestrahlten syngenem oder SCID-Mäusen nicht leukämogen⁹⁹. Der Phänotyp eines *ETV6/RUNX1*-induzierbaren transgenen Mausmodells bestätigt diese Ergebnisse. Die Mäuse entwickeln nach *ETV6/RUNX1*-Induktion in hämatopoetischen Zellen nur präleukämische Zellpopulationen jedoch keine Leukämie⁹⁹. Dies wird auch in einem Knochenmarktransplantationsmodell bestätigt¹⁰⁰. Die Inzidenz einer Leukämie in diesen murinen Modellen nahm nur bei dem Vorhandensein zusätzlicher kooperierender Mutationen zu¹⁰¹. In einer jüngeren Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Translokation *ETV6/RUNX1* mit dem Auftreten eines bestimmten Zellklons assoziiert ist, der durch die Oberflächenantigenkombination $CD34^+/CD38^{-/low}/CD19^+$ charakterisiert ist¹⁰². Die Autoren beschrieben u.a. eineiige Zwillinge, von denen ein Individuum an einer Leukämie erkrankte. Der andere Zwilling blieb gesund. Bei beiden Kindern ließ sich - im Gegensatz zu gesunden Kontrollpersonen - der besagte Zellklon nachweisen. Durch serielle Transplantationsversuche konnte außerdem gezeigt werden, dass die $CD34^+/CD38^{-/low}/CD19^+$ -Zellen Selbsterneuerungspotential im Sinne von Stammzellen haben und sehr wahrscheinlich die präleukemischen Zellen sind, aus denen nach Erwerb einer bzw. mehrerer zusätzlicher Mutation(en) Leukämienstammzellen hervorgehen¹⁰². Letztendlich untermauern diese Ergebnisse die Hypothese, dass das Fusionsprotein *ETV6/RUNX1* alleine kein leukämogenes Potential hat, jedoch sein Auftreten präleukämische Veränderungen induziert und nach Akquisition weiterer genetischer Aberrationen die Entstehung einer Leukämie begünstigt.

Die Beeinträchtigung der normalen hämatopoetischen Differenzierung durch das Fusionsprotein *ETV6/RUNX1* (Unterdrückung der Transkriptionsaktivierung von *RUNX1*;

Dimerisation mit ETV6; Rekrutierung des nukleären Repressionskomplexes N-CoR/SMRT/mSin3A/HDAC3) fördert die Entstehung multipotenter Progenitorzellen und präleukämischer Zellpopulationen mit einer Differenzierungsblockade am Übergang vom pro-B- in das prä-B-Stadium^{25,100,103}. Jedoch erst durch zusätzliche (synergistisch wirkende) Mutationen kommt es zur Ausprägung einer Leukämie. Diese Beobachtung wird zum einen durch weitere Untersuchungen an eineiigen Zwillingen unterstützt, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten an einer *ETV6/RUNX1*-positiven ALL erkrankten (unterschiedliche Latenzzeit desselben, *in utero* durch fetto-fetale Transfusion übertragenen Zellklons)^{104,105}, zum anderen durch die synergistische Wirkung weiterer Mutationen in retroviral *ETV6/RUNX1*-transduzierten Zellen. Das simultane Vorhandensein homozygoter Deletionen der Tumorsuppressorgene *p16INK4a*, *p15INK4b* und *p19ARF* (Chromosomenregion 9p12) erhöht die Leukämierate in *ETV6/RUNX1*-transduzierten Zellen¹⁰¹. Interstitielle Deletionen der Chromosombanden 9p12 und des nicht-rekombinierten Chromosoms 12p13, die den *ETV6*-Genlocus einschließt, sind häufige sekundäre Ereignisse bei *ETV6/RUNX1*-positiven ALL^{106,107}.

Der Krankheitsverlauf der heterogenen *ETV6/RUNX1*-positiven ALL-Rezidivgruppe zeichnet sich zwar durch ein gutes Ansprechen auf die Therapie aus, die Rezidivrate von Patienten mit *ETV6/RUNX1*-positiver ALL unterscheidet sich aber nicht von der anderer gematchter Patienten ohne diese Translokation¹⁰⁸. Die Variabilität kooperierender Mutationen (sekundäre Veränderungen) innerhalb der *ETV6/RUNX1*-positiven ALL-Rezidivgruppe scheint langfristig einen entscheidenden Einfluss auf den Krankheitsverlauf und die Heilungschancen auszuüben.

Aufgrund der besonderen Relevanz der Translokation *ETV6/RUNX1* für Patienten mit einer ALL im Kindesalter, besteht weiterhin ein besonderes Interesse, die biologischen Folgen dieser Translokation sowie die physiologischen Funktionen der beiden involvierten Wildtypgene vollständig zu verstehen.

5.2 Auswahl des Vektorsystems

Um Zellen zur Expression von Transgenen zu veranlassen, stehen verschiedene Transfektions- und Transduktionstechniken zur Verfügung. Retrovirale Vektoren sind in der Lage, Zellen mit Transgenen zu transduzieren, indem sie diese stabil in deren Genome integrieren¹⁰⁹. Die transferierten Sequenzen werden dann bei jeder Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben, was einen erheblichen Vorteil gegenüber Systemen bie-

tet, die Transgene in einer episomalen Form in ihre Zielzellen einbringen (z.B. Lipofektion oder Elektroporation). Episomal vorliegende DNA geht häufig im Laufe der Zeit verloren. Problematisch ist allerdings, dass die retrovirale Integration mit der Zerstörung anderer Gene oder regulatorischer Bereiche sowie mit einer Genexpressionsdysregulation durch Positionseffekte einhergehen kann. Retrovirale Vektoren können daher zu schweren Störungen in ihren Zielzellen führen. Das kann bis zur malignen Entartung führen^{110,111}. Diese Phänomene beobachtet man wiederum bei episomalen Vektoren nicht^{112,113}.

Die Entscheidung, für diese Arbeit ein retrovirales Transduktionssystem zu benutzen, war vor allem dadurch begründet, dass in unserem Labor eine entsprechende Expertise vorhanden war.

Die gängigen retroviralen Vektorsysteme basieren entweder auf lentiviralem oder auf γ -retroviralem Gentransfer. Ein Vorteil von lentiviralen Vektoren gegenüber γ -retroviralen Transduktionssystemen liegt darin, dass Lentiviren auch Zellen transduzieren können, die sich gerade in Ruhe befinden und nicht teilen, während γ -retrovirale Vektoren die Kernmembran nicht überwinden können^{114,115}. Sie sind daher nur in der Lage, Zellen während der Mitose (ab der Prophase) zu transduzieren. Nachteilig ist, dass die Produktion von lentiviralen Vektoren aufwändiger ist als die von γ -retroviralen, da γ -Retroviren von Produzentenzelllinien erzeugt werden können, die nahezu ununterbrochen Viren freisetzen, während lentivirale Partikel nur transient über wenige Tage von ihren Produzentenzellen hergestellt werden^{114,116,117}.

Die Entscheidung, lentivirale Vektoren zu verwenden, erklärt sich in erster Linie dadurch, dass perspektivisch Arbeiten an Zellen vorgenommen werden sollen, die sich selten teilen (z.B. humane hämatopoetische Stammzellen, murine embryonale Stammzellen).

5.3 Retroviraler Gentransfer und biologische Sicherheitsaspekte

Die Verwendung von Retroviren mit kompletten Genomen birgt diverse Risiken. Neben der Gefahr, die unmittelbar vom verwendeten Wildtyp-Virus oder gegebenenfalls eingebrachter transgener Sequenzen ausgeht, besteht eine indirekte, unkalkulierbare Gefährdung durch eine unkontrollierte Verbreitung der Viren und durch die Möglichkeit der Rekombination mit den Genomen natürlich vorkommender Retroviren. Retrovirale Vek-

torsysteme zur Transduktion spezifischer Zielzellen mit transgener Erbinformation sind daher unter Sicherheitsaspekten gegenüber den Wildtyp-Viren modifiziert.

Im Folgenden werden die sicherheitstechnischen Überlegungen für lentivirale Systeme dargestellt, die sich von HIV-1 ableiten. Die lentivirale RNA wird im Rahmen der Virusvermehrung mehrfach gespleißt, damit alle notwendigen Virusproteine erzeugt werden können. Ein fertiges Virion muss jedoch mit ungespleißter RNA ausgestattet werden, um auch in der nächsten Generation replikationsfähig zu bleiben. Ungespleißte RNA ist daher durch das Verpackungssignal Ψ , eine kurze Sequenz im 5'-Bereich des Genoms, gekennzeichnet. Die Grundidee aller sicherheitstechnischen Überlegungen ist eine Verteilung der essenziellen Elemente des viralen Genoms auf verschiedene Plasmide, mit denen eine sogenannte Virusproduktionszelle kotransfiziert wird. Diese Zelle enthält die komplette genetische Information, die sie zur Produktion neuer Viren braucht. Eines dieser Plasmide ist das sogenannte Transferplasmid. Dieses Transferplasmid enthält als einziges der ganzen Plasmide das Verpackungssignal Ψ . Die vom Transferplasmid transkribierte RNA wird somit als genomische RNA erkannt, die verpackt werden muss und verlässt letztlich mit dem Virion die Zelle. Daher muss das Transferplasmid auch das Transgen kodieren. Die auf den anderen, sogenannten Helferplasmiden gelegenen Virusgene führen zwar zur Expression der viralen Proteine in der Produzentenzelle und gestatten somit die Produktion neuer Viren, die auf den Helferplasmiden enthaltene Erbinformation für essenzielle virale Proteine wird jedoch nicht in das Virion inkorporiert und verbleibt in der Produzentenzelle. Das die Produzentenzelle verlassende Virion kann daher einmalig eine Zielzelle infizieren und transduzieren, sich dort aber nicht weiter vermehren, da essenzielle Gene in der Produzentenzelle zurückgeblieben sind. Derartig hergestellte Viren sind also replikationsdefekt.

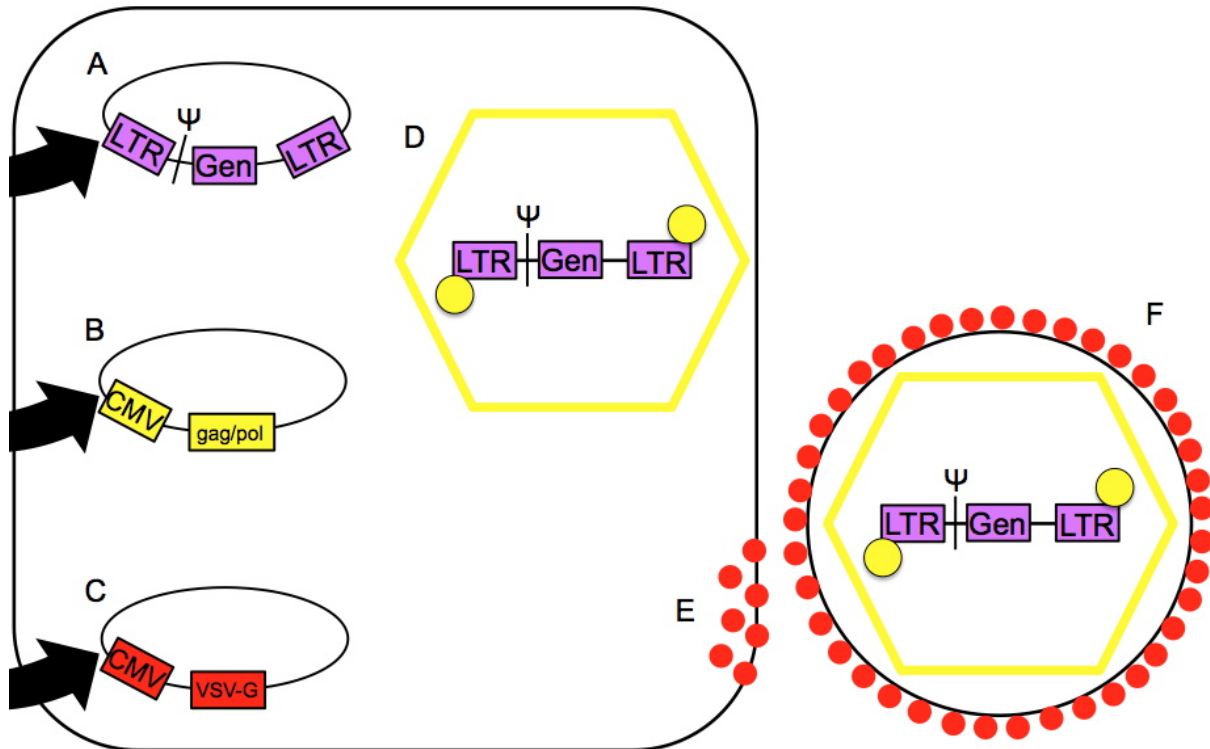


Abbildung 31: Lentivirales Vektorsystem der zweiten Generation. Der Übersichtlichkeit halber sind nur die für das Grundverständnis des Systems wichtigen Gene dargestellt: zunächst wird die Virusproduktionszelllinie (in dieser Arbeit 293T) mit dem Transferplasmid (A), dem gag-pol-Expressionsplasmid (B) und dem VSV-G-Expressionsplasmid (C) kofunktioniert. Das Transferplasmid (A) liefert die genomische RNA für das Virion (F), das gag-pol-Expressionsplasmid veranlasst die Produzentenzelle zur Bildung der Kapsidproteine und der viralen Enzyme und das VSV-G-Expressionsplasmid kodiert die Hüllproteine des vesicular stomatitis virus (sog. Pseudotypisierung, s.u.).

Im Sinne einer molekulargenetischen „Evolution“ lassen sich grob drei lentivirale Generationen unterscheiden. In den Transferplasmiden der ersten Generation wurde lediglich das *env*-Gen deletiert. Die Produzentenzellen wurden dann mit einem solchen Transferplasmid und mit einem zweiten Helferplasmid kofunktioniert, das das *env*-Protein *in trans* kodiert. Eine Weiterentwicklung dieses Systems war die Deletion von *gag* und *pol* auf dem Transferplasmid und die Auslagerung dieser beiden Gene auf das Helferplasmid.

In der zweiten Virusgeneration wurden zusätzlich die akzessorischen Gene, die maßgeblich für die Pathogenität von HIV (*vpr*, *vif*, *vpu* und *nef*) verantwortlich sind, vollständig deletiert. *gag* und *pol* wurden zusammen mit *tat* und *rev* auf ein sogenanntes Verpackungsplasmid ausgelagert. *tat* erhöht die transkriptionelle Aktivität der viralen Gene in der Zielzelle, *Rev* fördert den Export der genomischen RNA in das Zytoplasma, indem es durch Spleißen entstehende Fragmente der HIV-mRNA, die ein *Rev response element* (RRE) tragen, den Export aus dem Kern in das Zytoplasma ermöglicht. Das

Wildtyp-*env*-Gen wurde deletiert und stattdessen ein heterologes Hüllprotein-Gen auf einem zusätzlichen, dritten Plasmid, dem sogenannten Hüllplasmid bereitgestellt. Durch Austausch des *env*-Gens lässt sich der Gewebetropismus eines Retrovirus ändern¹¹⁸. Den Austausch des Wildtyp-*env*-Gens gegen Fremd-*env*-Gene bzw. Analoga mit konsekutiver Veränderung der Virushüllproteine und damit des Gewebetropismus bezeichnet man als Pseudotypisierung. Das G-Protein des *vesicular stomatitis virus* (VSV-G) ist ein *env*-Analogon, das an Phospholipide bindet, die ubiquitär in Zellmembranen vorkommen und damit pseudotypisierten Viren ein breites Wirtszellspektrum eröffnet. Außerdem stabilisiert es die Viruspartikel, so dass VSV-G-pseudotypisierte Viren durch Ultrazentrifugation konzentrierbar sind¹¹⁹⁻¹²². Retroviren mit VSV-G-Hülle eignen sich zur Transduktion hämatopoetischer Zellen¹²³.

Die dritte Generation lentiviraler Vektorsysteme verzichtet zusätzlich auf *tat*. Die Rationale bildet erneut eine sicherheitstechnische Überlegung, da bekannt ist, dass *tat*-deletierte Lentiviren replikationsunfähig sind. Da die Aktivierung der HIV-Promotorregion im 5'-LTR auf dem Transferplasmid aber *tat*-abhängig ist, muss diese durch einen heterologen Promotor ersetzt werden. Dies ist häufig der CMV-Promotor^{124,125}. Damit auch *gag* und *pol* ausreichend exprimiert werden, muss das Verpackungsplasmid ein RRE enthalten. Zusätzlich ist ein viertes Plasmid erforderlich, das *rev* kodiert. Über eine Aktivierung des RRE auf dem Verpackungsplasmid durch das *in trans* kodierte *rev*, nimmt die Menge an *gag-pol*-mRNA zu, die den Kern in Richtung Zytoplasma verlässt. So lässt sich die *gag-pol*-Expression posttranskriptionell steigern.

Die Produktion von Drittgenerationsviren erfordert die Kotransfektion des Transferplasmi- ds und der drei Helferplasmide in die Virusproduktionszelle. Dies ist technisch extrem anspruchsvoll.

Auch die genetische Information der Transferplasmide wurde im Laufe der Jahre immer wieder verändert. Es hat sich dabei jedoch gezeigt, dass bestimmte Elemente unabk ömmlich sind. Das RRE und der die Replikation beschleunigende *central polypurine tract* (cPPT) sind für eine ergiebige Virusproduktion und damit letztlich auch effektive Transduktion der Zielzellen erforderlich. Die heute gebräuchlichen Transferplasmide enthalten außerdem den 5'-LTR, die *major splice donor site* (SD), das Verpackungssignal Ψ , den *envelope splice acceptor* (SA), das Transgen mit einem eigenständigen Promotor und den 3'-LTR.

Es ist bekannt, dass die U3-Region im 3'-LTR für die Replikation der Wildtyp-Viren essenziell ist. Das liegt daran, dass diese Sequenzen bei der Integration des Virus auf die virale Promotorregion im 5'-LTR übertragen werden und dort ihre Funktion entfalten. Replikationsdefekte Viren der dritten Generation sind aber nicht auf die Integrität dieser Sequenz angewiesen, da sie ohnehin einen heterologen Promotor enthalten und die in der U3-Region des 3'-LTR enthaltenen *enhancer* und transkriptionssteigernden Elemente nicht benötigen. Die entsprechenden Sequenzen in diesen Viren können daher entfernt werden. Viren, in denen essenzielle Elemente der U3-Region des 3'-LTR fehlen, bezeichnet man als *selbstinaktivierend*. Potenzierend wirkt, dass die transkriptionelle Aktivität von Wildtyp-LTR auch die Expression von Protoonkogenen in der Zielzelle beeinflussen kann. Außerdem gibt es häufig unerwünschte Wechselwirkungen zwischen proviralem 5'-LTR und internen, die Transgen-Expression kontrollierenden, heterologen Promotoren. Auch diese Effekte werden in selbstinaktivierenden Viren nicht beobachtet. Zusammengefasst sind die wesentlichen Sicherheitselemente moderner lentiviraler Vektoren (1.) die Deletion nicht-essenzieller Gene, (2.) die Verteilung der essenziellen Gene auf drei verschiedene Plasmide und (3.) die Selbstinaktivierung^{112,126-128}.

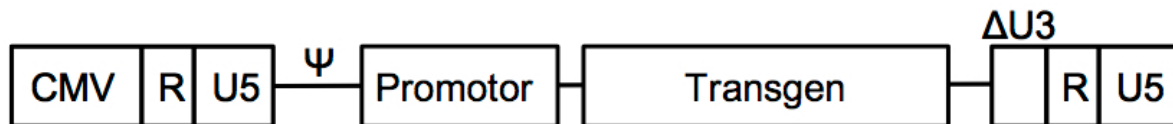


Abbildung 32: Genomorganisation eines modernen lentiviralen Vektors der dritten Generation

5.4 Auswahl der Modellzelllinie HT-1080

Da humane hämatopoetische Stammzellen und murine embryonale Stammzellen schwer zu gewinnen und teuer sind, erschienen diese Zellen nicht geeignet, um daran das vorab beschriebene Vektorsystem direkt zu erproben. Die *ETV6/RUNX1*-positive humane B-Vorläuferzell-Leukämiezelllinie REH war für die initialen Versuche ebenfalls ungeeignet, da Diakos et al. beschrieben haben, dass der *ETV6/RUNX1-knock-down* in REH zur Apoptose führt¹²⁹. Da das in dieser Arbeit angewendete System zwar theoretisch durch Tetrazyklin-Antibiotika regulierbar sein sollte, im Vorhinein aber naturgemäß nicht klar war, ob dieser Regulationsmechanismus auch funktionieren würde, war die Verwendung von REH-Zellen nicht sinnvoll. Nach *ETV6/RUNX1-knock-down* wäre im Falle eines Versagens des Regulationssystems ein Selektionsdruck in der Zellkultur

zugunsten der nicht transduzierten Zellen entstanden, der möglicherweise zu einer Elimination der transduzierten Zellen geführt hätte. Daher wurde eine andere Modellzelllinie benötigt. Diese sollte unabhängig von der *ETV6/RUNX1*-Expression gut wachsen, leicht zu kultivieren sein und sich gut lentiviral transduzieren lassen. Eine biologische Ähnlichkeit mit den definitiven Zielzellen war im konkreten Fall nicht notwendig, da es zunächst um eine Etablierung der Methodik ging.

Die genannten Kriterien trafen auf die humane Fibrosarkomzelllinie HT-1080 zu. Sie war darüber hinaus kommerziell verfügbar, molekulargenetisch gut charakterisiert und es bestanden umfangreiche Zellkulturerfahrungen mit dieser Zelllinie in unserem und in anderen Laboren⁹².

5.5 Unterschiedliche Transduktionseffizienzen im Vergleich von PRTAIEG7 zu LVCT-buRz28 und pLVCT-anti-buRz28

Während HT-1080-Zellen mit dem Vektor PRTAIEG7 durch eine einzige Exposition gegenüber Lentivirus-haltigem Medium nahezu vollständig transduziert werden konnten, führte auch die wiederholte Transduktion von HT-1080 mit den Vektoren LVCT-buRz28 und LVCT-anti-buRz28 nur zu einer EGFP-Expression in 50-80% der Zielzellen. Dies kann verschiedene Gründe haben. Im einfachsten Falle waren die Virustiter der LVCT-Präparationen schlechter als die der PRTAIEG7-haltigen Virusüberstände. Da die Virustiter leider nicht systematisch gemessen worden sind, kann dies nicht sicher ausgeschlossen werden. Es gibt aber einige Hinweise, die dagegen sprechen. Zum einen ähneln sich die beiden lentiviralen Systeme sehr und während in dem einen System (PR-Vektoren) konstant Virusüberstände hergestellt worden sind, die sehr gute Transduktionsergebnisse erzielten, wurden in dem anderen System (LVCT-Vektoren) ebenso konstant Virusüberstände hergestellt, die eher zu einer mäßigen Transgenexpression in den Zielzellen führten. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die vermeintlich schlechteren Transduktionsergebnisse eher einen biologischen als einen produktionstechnischen Hintergrund haben. Zu dieser These passt die Beobachtung, dass nach der Ultrazentrifugation der Virusüberstände für andere Versuchsserien sowohl in PRTAIEG7- als auch in LVCT-Präparationen, immer ähnlich große Viruspellets beobachtet wurden. Ein makroskopisch sichtbares Viruspellet zeigt erfahrungsgemäß durchaus an, dass die Virusausbeute hoch ist, auch, wenn es sich dabei bestenfalls um ein semiquantitatives Maß handelt. Es ist wahrscheinlich, dass nicht die Transduktionseffizienz im LVCT-

System schlechter war als im PR-System, sondern die Transgenexpression nach erfolgreicher Transduktion.

Für die Interpretation der Ergebnisse ist es wichtig, sich noch einmal die Konstruktion der Ribozym-Vektoren zu vergegenwärtigen. Die Elemente, die für die Tetrazyklin-gesteuerte Expressionsregulation von Bedeutung sind (rtTRKRAB), werden von einem RNA-Polymerase-II-Promotor, hier dem CAG-Promotor, gesteuert. Gleiches gilt für die EGFP-Expression. Auch diese steht unter der Kontrolle des CAG-Promotors. Die Expression der Ribozym-Sequenz wird hingegen von einem H1-Promotor, der zu den RNA-Polymerase-III-Promotoren gehört, kontrolliert. Es ist denkbar, dass die EGFP-Expression in HT-1080-Zellen nach Transduktion mit einem LVCT-Vektor deswegen nicht immer zuverlässig funktioniert hat, weil sie in dem hier dargestellten System unter der Kontrolle CAG-Promotors stand.

Es ist bekannt, dass CAG-Promotoren in der Zielzelle häufig inaktiviert werden¹³⁰. Lentivirale Vektoren mit CAG-Promotoren exprimieren ihre Transgene in HT-1080 schlecht. Auch die deutlich schlechtere EGFP-Expression im Vergleich zu den Zellen, die mit den Vektoren PRIEG7 und PRTAIEG7 transduziert wurden, lässt sich so erklären. Möglicherweise war also gar nicht die Transduktionseffizienz durch die LVCT-Vektoren schlechter, sondern die Expression des Reportergens und damit auch die des Tetrazyklin-abhängigen Regulationssystems. Da die EGFP-Expression und die Tetrazyklin-Regulation des Vektorsystems unter der Kontrolle des gleichen Promotors standen, ist also anzunehmen, dass in den Zellen, die zwar mit dem Ribozym transduziert wurden, aber kein EGFP exprimierten, auch keine Regulation durch Doxycyclin möglich war. Diese Zellen exprimierten folglich möglicherweise auch unter Doxycyclin-Einfluss noch das Ribozym, was wahrscheinlich dazu geführt hat, dass sie weiterhin vermindert ETV6/RUNX1 exprimierten. Die ETV6/RUNX1-Expression wurde in diesen Zellen jedoch leider nicht gemessen, was sich im Nachhinein als Fehler erwiesen hat. Dieser komplexe Zusammenhang muss in zukünftigen Versuchsserien unbedingt beachtet werden.

Der Effekt der potenziell reduzierten CAG-Promotoraktivität in diesem System war bei der Versuchsplanung bekannt. Es fiel dennoch die Entscheidung zur Benutzung eines Vektors mit CAG-Promotor, da die Planung von Folgeprojekten Studien an murinen embryonalen Stammzellen vorsah. In diesen funktionieren CAG-Promotoren wiederum verhältnismäßig gut¹³¹. Diese Annahme konnte in ersten Vorversuchen, die nicht Be-

standteil dieser Arbeit sind und deswegen auch nicht gezeigt werden können, bestätigt werden.

Ebenfalls der langfristigen Versuchsplanung ist die Auswahl von *EGFP* als Reporter gen in den LVCT-Konstrukten geschuldet. Dadurch, dass die *ETV6/RUNX1*-Expression in den HT-1080-Zellen durch einen Vektor vermittelt ist, der die Zielzellen mit einem *EGFP*-Gen kotransduziert, fluoreszieren diese HT-1080-Abkömmlinge *per se* grün. Bei Transduktion dieser Zellen mit einem weiteren Vektor eignet sich *EGFP* daher nicht mehr als Reporter gen. Es wurde dennoch die Entscheidung getroffen, auch die Vektoren LVCT-buRz28 und LVCT-anti-buRz28 mit *EGFP* als Reporter gen auszustatten, da sämtliche Folgeversuche perspektivisch an Zellen durchgeführt werden sollen, die kein *EGFP* exprimieren werden. In diesen Zellen wird sich *EGFP* dann wieder als Reporter gen eignen. Da *EGFP* fluoreszenzmikroskopisch und durchflusszytometrisch sehr leicht messbar ist, wurde die Entscheidung getroffen, den vorab beschriebenen Nachteil in Kauf zu nehmen und dadurch zu umgehen, dass in jedem Transduktionsansatz Wildtyp-HT-1080-Zellen als Kontrolle mitgeführt wurden. Es wurde angenommen, dass die in diesen Zellen gemessene *EGFP*-Expression der Transgenexpression in den parallel transduzierten HT-1080-TA1-Zellen annähernd entsprach. Dies wurde als die bestmögliche Kontrolle eingeschätzt, die in einem vernünftigen Kosten-Nutzen-Verhältnis zu den zu erwartenden Versuchsergebnissen stand.

5.6 Posttranskriptionelle Expressionshemmung von *ETV6/RUNX1* durch das lentiviral transferierte Ribozym buRz28

In dieser Promotionsarbeit konnte gezeigt werden, dass die lentiviral vermittelte Transduktion von *ETV6/RUNX1*-positiven HT-1080-Zellen mit dem Ribozym buRz28 zu einer Reduktion der *ETV6/RUNX1*-Expression führt. Insgesamt wurde ein Rückgang der *ETV6/RUNX1*-Expression in einer Größenordnung von zirka einem Drittel des Ausgangswertes bestimmt. Dies erscheint zunächst nicht besonders überzeugend. Es kann aber angenommen werden, dass das Ribozym in Zellen, die von Natur aus *ETV6/RUNX1*-positiv sind, erheblich wirksamer sein wird als in Zellen die durch lentivirale Transduktion künstlich zu einer hohen *ETV6/RUNX1*-Expression veranlasst worden sind.

Diese Annahme ist dadurch begründet, dass in primären (natürlich vorkommenden) *ETV6/RUNX1*-positiven Zellen, z.B. hämatopoetischen Stammzellen, nur eine Kopie

des aberranten Gens enthalten ist, während die lentivirale Transduktion von Zellen in der Regel dazu führt, dass mehrere Kopien pro Zelle vorhanden sind. Außerdem ist die SFFV-U3-Region, die Promotoreigenschaften hat und in dem in dieser Arbeit benutzten System die *ETV6/RUNX1*-Expression in HT-1080-TA1-Zellen steuert, sehr potent, was die Transgenexpression weiter steigert. Diesen theoretischen Annahmen entsprechend wurde eine etwa 270-fach erhöhte mRNA-Menge in lentiviral mit *ETV6/RUNX1*-transduzierten HT-1080-Zellen gegenüber der Referenzzelllinie REH gemessen, die von einem Leukämie-Patienten stammt und nur eine *ETV6/RUNX1*-Kopie besitzt. Entsprechend ist zu erwarten, dass in den transgenen *ETV6/RUNX1*-positiven HT-1080-Zellen auch höhere Ribozym-Dosen gebraucht werden, um eine suffiziente Unterdrückung der Genexpression zu erzielen. Vor diesem Hintergrund scheint die Annahme berechtigt, dass die *ETV6/RUNX1*-Expression *in natura* effektiver gehemmt werden kann als in den hier benutzten Modellzellen. Dies zu verifizieren, wird Aufgabe von Folgeanalysen sein.

Ein anderer Grund, warum das lentiviral transferierte Ribozym buRz28 nur eine verhältnismäßig geringe *ETV6/RUNX1*-Expressionshemmung erreicht, könnte die Tatsache sein, dass es nicht vollständig mit dem von den Erstbeschreibern episomal eingebrachten Ribozym übereinstimmt. Dies ist durch das benutzte System begründet und lässt sich nicht vermeiden. Der Vektor pLVCT-rtTRKRAB-2SMS2 exprimiert die das Ribozym kodierende Sequenz unter der Kontrolle eines H1-Promotors. Das Terminationssignal bei der Transkription in RNA sind fünf Adeninreste. Die ersten beiden werden aber noch transkribiert⁷⁹. Der Kettenabbruch erfolgt erst zwischen dem zweiten und dem dritten Adenin. Das Ribozym endet daher mit zwei Uracil-Resten, die im Originalribozym von Choi et al. nicht vorkommen⁷⁷. Zwar haben diese beiden Uracil-Reste keinen Bindungspartner bei der Anlagerung des Ribozyms an die *ETV6/RUNX1*-mRNA. Es muss aber trotzdem unterstellt werden, dass sie das System in irgendeiner Form, z.B. durch eine Veränderung der Stabilität der mRNA o.ä. beeinflussen. Möglicherweise ist das lentiviral erzeugte Ribozym daher weniger aktiv als das episomal als Oligonukleotid eingebrachte Ribozym in der Erstbeschreibung^{132,133}.

Unwahrscheinlich hingegen ist ein Einfluss des Promotors auf die Aktivität des Ribozyms. Der H1-Promotor ist ein RNA-Polymerase-III-Promotor (Pol-III-Promotor). Pol-III-Promotoren sind mit Genen assoziiert, die in fast allen Zellen eine ähnliche Aktivität haben, weil sie an ubiquitären zellulären Prozessen beteiligt sind. Pol-III-

Promotoren werden deswegen kaum reguliert und insofern ist es auch unwahrscheinlich, dass sie in einer Zelle inaktiviert werden. Vermutlich ist der H1-Promotor also nicht für die mäßige Aktivität des Ribozyms verantwortlich. H1-Promotoren führen außerdem zur Bildung von RNA-Transkripten ohne einen Poly(A)-Schwanz^{78,134}.

5.7 Posttranskriptionelle Expressionshemmung von ETV6/RUNX1: Lentiviral transferiertes buRz28 im Vergleich zu episomalem buRz28 und siRNA

Es gibt zahlreiche Arbeitsgruppen, die sich weltweit mit der posttranskriptionellen Expressionshemmung von ETV6/RUNX1 beschäftigen. Die Bemühungen sind meist vergeblich und werden in der Regel nicht durch Publikationen dokumentiert. Zaliouva *et al.* konnten in REH-Zellen und einer mit *ETV6/RUNX1* transfizierten HeLa-Zelllinie¹³⁵ mit verschiedensten um den Bruchpunkt herum bindenden siRNA-Konstrukten jeweils maximal einen *knock-down* von 58% erreichen¹³⁶. Diakos *et al.* zeigen einen im *Western Blot* effektiv wirkenden *knock-down*, der aber von den Autoren nicht genauer quantifiziert wird¹²⁹. Auch Choi *et al.* zeigen in ihrer Publikation, die erstmalig das Ribozym buRz28 beschreibt, nur einen *Western Blot*, der zwar semiquantitativ einen guten *knock-down* von *ETV6/RUNX1* belegt. Aber auch in dieser Arbeit fehlt eine genauere Quantifizierung⁷⁷. Ein Vergleich des hier dargestellten Systems mit den zitierten Ansätzen ist deswegen nicht möglich. Wenn ein *knock-down* von 58% im Jahre 2011 aber noch publiziert werden kann, kann wohl vorsichtig davon ausgegangen werden, dass auch andere Arbeitsgruppen Probleme damit haben, *ETV6/RUNX1* posttranskriptionell effektiv zu hemmen.

5.8 Resumee und Ausblick

Die Ribozym-vermittelte Expressionshemmung hat keine direkten Vorteile gegenüber den viel gängigeren siRNA-Konzepten. Sie verfolgt schlichtweg eine vollkommen andere Strategie, die technisch ähnlich aufwändig ist wie siRNA-Systeme und grundsätzlich genauso in Frage kommen könnte, um eine posttranskriptionelle Genexpressionshemmung zu erreichen. Wenn sehr kurze, sehr spezifische Sequenzen gehemmt werden sollen, die möglicherweise aufgrund ihrer Nukleotidfolgen - z.B. aus thermodynamischen Gründen - kein optimales siRNA-Ziel darstellen, wäre es jedoch von Vorteil, über eine alternativen Ansatz zur siRNA-Technologie zu verfügen, der möglicherweise zum Erfolg führen könnte. Ribozym-vermittelte Expressionshemmung

ist daher als alternatives und nicht als konkurrierendes Verfahren zu sehen. Lentiviral vermittelter Ribozymtransfer ist ein neues Feld. Es gibt bislang nur eine Handvoll Publikationen, die über eine erfolgreiche Anwendung dieser Methodik berichten. Diese Publikationen beschäftigen sich im Grunde überwiegend mit dem gleichen Vektor, der im Sinne einer Gentherapie gegen HIV-1 gerichtet ist und seine Zielzellen mit drei „anti-HIV-Genen“ kontransduziert. Das Ribozym ist gegen *CCR5* gerichtet. Außerdem enthält der Vektor eine siRNA gegen *tat-rev* und eine *transactivation response decoy* Sequenz¹³⁷. Darüber hinaus gibt es eine Publikation, die über lentiviral transferierte Ribozyme zur Therapie des Dengue-Fiebers berichtet. Die Ribozyme richteten sich in dieser Arbeit gegen das Hüllprotein des Dengue-Virus und waren in der Lage, die Viruslast in einem *in-vitro*-Zellkultursystem innerhalb von vier Tagen um zirka zwei log-Stufen zu reduzieren¹³⁸.

Die erzielten Ergebnisse stellen keinen Durchbruch bei dem Versuch dar, die Expression von *ETV6/RUNX1* suffizient zu hemmen und so neue Einblicke in den Wirkmechanismus der Translokation zu gewinnen. Allerdings geben die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse durchaus Anlass, das vorgestellte System weiter zu verfolgen.

Verschiedene Ansätze sind dafür geeignet. Zum einen könnten HT1080-TA1-Klone isoliert werden, die den Ribozym-Vektor besonders gut exprimieren, weil sie zum Beispiel mit überdurchschnittlich vielen Viruspartikeln transduziert worden sind.

Zum anderen ist eine Umklonierung des Basisvektors und die Verwendung eines Promotors, der in HT-1080 bzw. REH-Zellen potenziell aktiver ist, denkbar. Es wäre zum Beispiel möglich, die in HT-1080 und REH-Zellen hervorragend funktionierenden PR-Vektoren zu modifizieren. Eine Expression des Tetrazyklin-Regulationssystems unter der Kontrolle des SFFV-U3-Promotors sollte theoretisch gut funktionieren. Auch wäre ein Austausch des H1-Promotors gegen einen anderen Pol-III-Promotor vorstellbar. Letzteres dürfte technisch aber sehr anspruchsvoll, dabei aber nicht zwangsweise aussichtsreich sein.

In Zukunft müssen unbedingt systematisch alle Virustiter bestimmt werden und es muss untersucht werden, ob die verwendeten Viren möglicherweise in das Genom der Zielzellen integrieren, dort aber (teil-)inaktiviert werden. Auch sollte eine Transduktion von Zellen angestrebt werden, die ein „physiologisches“ *ETV6/RUNX1*-Expressionsniveau haben und nicht artifiziell ungewöhnlich große Mengen *ETV6/RUNX1* exprimieren. Für derartige Versuche bietet sich die Leukämie-Zelllinie REH an.

Letztlich ist noch viel Arbeit zu tun, aber es könnte sehr lohnend sein, den lentiviralen Ribozymtransfer als neue Strategie zur posttranskriptionellen Expressionshemmung von *ETV6/RUNX1* zu verfolgen.

6 Zusammenfassung

Die Transkriptionsfaktoren *ETV6* und *RUNX1* sind essenzielle Regulatoren der Hämatopoese. Durch die kryptische chromosomale Translokation t(12;21)(p13;q22), die bei ca. 25% der akuten lymphoblastischen Leukämien (ALL) im Kindesalter nachweisbar ist, entsteht das Fusionsgen *ETV6/RUNX1*, das zur Bildung eines aberranten Fusionsproteins führt. Essenzielle regulatorische Funktionen beider Transkriptionsfaktoren werden dadurch nachhaltig gestört. Die exakten Bedeutungen von *ETV6* und *RUNX1* in der Hämatopoese sind noch nicht abschließend geklärt. Ebenso ist die Rolle des Fusionsproteins in der Leukämogenese bislang unklar.

In verschiedenen Studien wurde versucht, die Expression des Fusionstranskriptes mit Hilfe von RNA-Interferenzstrategien posttranskriptionell zu unterdrücken. Dies gelang nur mit begrenztem Erfolg. Das liegt wahrscheinlich daran, dass siRNA-basierte Eingriffe in die Genregulation nur dann spezifisch sein können, wenn die verwendete siRNA exakt den *ETV6/RUNX1*-Fusionsbereich als Ziel hat. Alle anderen Sequenzen kommen nicht nur im Fusionsgen sondern auch im zweiten *ETV6*- bzw. im zweiten *RUNX1*-Allel vor. Im Fusionsbereich bietet sich aber kein optimales siRNA-Ziel.

Hammerhead-Ribozyme sind sehr kurze, katalytisch wirksame RNA-Moleküle, die in der Lage sind, definierte RNA-Sequenzen zu schneiden. Sie sind damit potenziell ebenso geeignet, die Expression von Genen posttranskriptionell zu regulieren wie interferierende RNA-Moleküle. Für Ribozyme gelten zwar grundsätzlich die gleichen Einschränkungen wie für siRNA. Aufgrund des gänzlich unterschiedlichen Wirkmechanismus gelang einer koreanischen Arbeitsgruppe aber dennoch ein Ribozym mit Wirksamkeit gegen *ETV6/RUNX1* zu identifizieren.

Das Einbringen regulatorisch wirksamer RNA-Entitäten durch lentivirale Transduktion hat den wesentlichen Vorteil, dass der entsprechende Nukleinsäureabschnitt stabil in das Genom der Zielzelle integriert wird und deswegen nicht in zukünftigen Zellteilungen verloren geht. Außerdem können zusätzliche Sequenzen in die Zielzellen eingebracht werden, die wiederum die Expression des regulatorisch wirksamen RNA-Moleküls beeinflussen. Dadurch lassen sich Regulationseffekte gewissermaßen an- und abschalten.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde das bekannte, die Expression von *ETV6/RUNX1* posttranskriptionell beeinflussende Hammerhead-Ribozym mit der Bezeichnung buRz28 lentiviral in eine selbst generierte *ETV6/RUNX1*-exprimierende Modellzelllinie

eingbracht und untersucht, ob das lentiviral transferierte Ribozym ebenso wirksam ist wie das episomal durch Transfektion eingebrachtes Ribozym.

Es konnte gezeigt werden,

- dass die Modellzelllinie HT-1080 nach Transduktion mit einem selbst klonierten lentiviralen Vektor stabil ETV6/RUNX1 exprimiert,
- dass sich die ETV6/RUNX1 exprimierenden HT-1080-Zellen lentiviral mit dem Ribozym buRz28 transduzieren ließen,
- und dass das lentiviral eingebrachte Ribozym buRz28 zu einer posttranskriptionellen Herabregulierung der Genexpression führt.

Die in dieser Arbeit verwendete Methodik ist sehr innovativ. Bislang gibt es kaum Publikationen zu lentiviral vermitteltem Ribozymtransfer. Diese Technik könnte sich als gute Alternative zur posttranskriptionellen Genexpressionshemmung erweisen, insbesondere dann, wenn die Zielsequenz kein geeignetes Ziel für siRNA bietet.

7 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

8 Publikationsliste

- Antonio Casado J, Callen E, Jacome A, Rio P, Castella M, **Lobitz S**, Ferro T, Munoz A, Sevilla J, Cantalejo A, Cela E, Cervera J, Sanchez-Calero J, Badell I, Estella J, Dasi A, Olive T, Jose Ortega J, Rodriguez-Villa A, Tapia M, Molines A, Madero L, Segovia JC, Neveling K, Kalb R, Schindler D, Hanenberg H, Surralles J, Bueren JA: A comprehensive strategy for the subtyping of patients with Fanconi anaemia: conclusions from the Spanish Fanconi Anemia Research Network. **J Med Genet** 2007;44:241-249. (IF=5,535)
- Auerbach AD, Greenbaum J, Pujara K, Batish SD, Bitencourt MA, Kokemohr I, Schneider H, **Lobitz S**, Pasquini R, Giampietro PF, Hanenberg H, Levran O: Spectrum of sequence variation in the FANCG gene: an International Fanconi Anemia Registry (IFAR) study. **Hum Mutat** 2003;21:158-168. (IF=6,328)
- Demuth I, Frappart PO, Hildebrand G, Melchers A, **Lobitz S**, Stockl L, Varon R, Herceg Z, Sperling K, Wang ZQ, Digweed M: An inducible null mutant murine model of Nijmegen breakage syndrome proves the essential function of NBS1 in chromosomal stability and cell viability. **Hum Mol Genet** 2004;13:2385-2397. (IF=8,597)
- Gross M, Hanenberg H, **Lobitz S**, Friedl R, Herterich S, Dietrich R, Gruhn B, Schindler D, Hoehn H: Reverse mosaicism in Fanconi anemia: natural gene therapy via molecular self-correction. **Cytogenet Genome Res** 2002;98:126-135. (IF= N/D)
- Hanenberg H, Batish SD, Pollok KE, Vieten L, Verlander PC, Leurs C, Cooper RJ, Gottsche K, Haneline L, Clapp DW, **Lobitz S**, Williams DA, Auerbach AD: Phenotypic correction of primary Fanconi anemia T cells with retroviral vectors as a diagnostic tool. **Exp Hematol** 2002;30:410-420. (IF=3,366)
- Lobitz S**, Velleuer E: Guido Fanconi (1892-1979): a jack of all trades. **Nat Rev Cancer** 2006;6:893-898. (IF=31,583)
- Popp H, Kalb R, Fischer A, **Lobitz S**, Kokemohr I, Hanenberg H, Schindler D: Screening Fanconi anemia lymphoid cell lines of non-A, C, D2, E, F, G subtypes for defects in BRCA2/FANCD1. **Cytogenet Genome Res** 2003;103:54-57. (IF=0,497)

- Seifert G, Jesse P, Laengler A, Reindl T, Luth M, **Lobitz S**, Henze G, Prokop A, Lode HN: Molecular mechanisms of mistletoe plant extract-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia in vivo and in vitro. **Cancer Lett** 2008. (IF=3,504)
- Seifert G, Reindl T, **Lobitz S**, Seeger K, Henze G: Fatal course after administration of rituximab in a boy with relapsed ALL: a case report and review of literature. **Hematologica** 2006;91:ECR23. (IF=5,034)
- Rohwer N, **Lobitz S**, Pfander D, Joens T, Sinn B, Vieth M, Kemmner W, Schlag P-M, Haugstetter A, Schmitt C, Wiedenmann B, Cramer C, Hoecker M: HIF-1alpha determines the malignant progression of gastric cancer. **Br J Cancer** 2009;100(5):772-81. (IF = 4,346)

9 Erklärung

Ich, Stephan Lobitz, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Posttranskriptionelle Expressionshemmung von *ETV6/RUNX1* durch lentivirale Transduktion mit dem Ribozym buRz28“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 4. April 2012

Unterschrift

10 Danksagung

Mein allererster und größter Dank gilt meiner Freundin Valeska und meiner Tochter Carla für alles Mögliche – vor allem aber für viel Verständnis und moralische Unterstützung.

Meinen Eltern möchte ich mich danken, weil sie meine Interessen und Begabungen mein ganzes Leben lang optimal gefördert und mich gerade während des Medizinstudiums stets großzügig finanziell unterstützt haben, so dass ich mich auf meine Arbeit konzentrieren konnte.

Ein ganz besonderes, riesengroßes Dankeschön geht an Katja und Thomas für eine exzellente Zusammenarbeit und viel intellektuelle und tatkräftige Unterstützung.

Bei Nadine und Thorsten möchte ich mich sehr für die unermüdliche Unterstützung und die außergewöhnlich angenehme und fruchtbare Kooperation bedanken.

Herrn Prof. Günter Henze und Herrn Prof. Karl Seeger danke ich für die Überlassung des Themas, unendliche Unterstützung an allen Fronten und das Vertrauen, das beide stets in mich gesetzt haben.

Herrn Prof. Helmut Hanenberg danke ich für eine schöne Zeit in seinem Labor und ein breites Wissen über die Fanconi-Anämie und Retroviren. Herrn Prof. Detlev Schindler danke ich für die hervorragende Kooperation während des damaligen Projektes.

Den Herren Prof. Karl Sperling und Prof. Martin Digweed danke ich dafür, dass ich in ihrem Institut die Fanconi-Anämie unter dem Aspekt „DNA-Reparaturdefekt“ näher kennen lernen durfte.

Zu guter Letzt danke ich allen Mitarbeitern der AG Seeger und der anderen auf „unserem Flur“ tätigen Arbeitsgruppen für eine schöne, gemeinsame Zeit und viel Hilfe.

11 Literaturverzeichnis

1. Golub, T.R., Barker, G.F., Stegmaier, K. & Gilliland, D.G. Involvement of the TEL gene in hematologic malignancy by diverse molecular genetic mechanisms. *Curr Top Microbiol Immunol* **211**, 279-288 (1996).
2. Golub, T.R., Barker, G.F., Bohlander, S.K., Hiebert, S.W., Ward, D.C., Bray-Ward, P., et al. Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4917-4921 (1995).
3. Lacronique, V., Boureux, A., Valle, V.D., Poirel, H., Quang, C.T., Mauchauffe, M., et al. A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science* **278**, 1309-1312 (1997).
4. Papadopoulos, P., Ridge, S.A., Boucher, C.A., Stocking, C. & Wiedemann, L.M. The novel activation of ABL by fusion to an ets-related gene, TEL. *Cancer Res* **55**, 34-38 (1995).
5. Leprince, D., Gegonne, A., Coll, J., de Taisne, C., Schneeberger, A., Lagrou, C., et al. A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. *Nature* **306**, 395-397 (1983).
6. Nunn, M., Weiher, H., Bullock, P. & Duesberg, P. Avian erythroblastosis virus E26: nucleotide sequence of the tripartite onc gene and of the LTR, and analysis of the cellular prototype of the viral ets sequence. *Virology* **139**, 330-339 (1984).
7. Boccuni, P., MacGrogan, D., Scandura, J.M. & Nimer, S.D. The human L(3)MBT polycomb group protein is a transcriptional repressor and interacts physically and functionally with TEL (ETV6). *J Biol Chem* **278**, 15412-15420 (2003).
8. Wang, L. & Hiebert, S.W. TEL contacts multiple co-repressors and specifically associates with histone deacetylase-3. *Oncogene* **20**, 3716-3725 (2001).
9. Lopez, R.G., Carron, C., Oury, C., Gardellin, P., Bernard, O. & Ghysdael, J. TEL is a sequence-specific transcriptional repressor. *J Biol Chem* **274**, 30132-30138 (1999).
10. Golub, T.R., Barker, G.F., Lovett, M. & Gilliland, D.G. Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell* **77**, 307-316 (1994).
11. Knezevich, S.R., Garnett, M.J., Pysher, T.J., Beckwith, J.B., Grundy, P.E. & Sorensen, P.H. ETV6-NTRK3 gene fusions and trisomy 11 establish a histogenetic link between mesoblastic nephroma and congenital fibrosarcoma. *Cancer Res* **58**, 5046-5048 (1998).
12. Buijs, A., Sherr, S., van Baal, S., van Bezouw, S., van der Plas, D., Geurts van Kessel, A., et al. Translocation (12;22) (p13;q11) in myeloproliferative disorders results in fusion of the ETS-like TEL gene on 12p13 to the MN1 gene on 22q11. *Oncogene* **10**, 1511-1519 (1995).
13. Wang, L.C., Swat, W., Fujiwara, Y., Davidson, L., Visvader, J., Kuo, F., et al. The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes Dev* **12**, 2392-2402 (1998).
14. Yamagata, T., Maki, K. & Mitani, K. Runx1/AML1 in Normal and Abnormal Hematopoiesis. *Int J Hematol* **82**, 1-8 (2005).
15. Meyers, S., Lenny, N. & Hiebert, S.W. The t(8;21) fusion protein interferes with AML-1B-dependent transcriptional activation. *Mol Cell Biol* **15**, 1974-1982 (1995).
16. Miyoshi, H., Ohira, M., Shimizu, K., Mitani, K., Hirai, H., Imai, T., et al. Alternative splicing and genomic structure of the AML1 gene involved in acute myeloid leukemia. *Nucleic Acids Res* **23**, 2762-2769 (1995).

17. Tanaka, T., Tanaka, K., Ogawa, S., Kurokawa, M., Mitani, K., Nishida, J., et al. An acute myeloid leukemia gene, AML1, regulates hemopoietic myeloid cell differentiation and transcriptional activation antagonistically by two alternative spliced forms. *EMBO J* **14**, 341-350 (1995).
18. Okada, H., Watanabe, T., Niki, M., Takano, H., Chiba, N., Yanai, N., et al. AML1(-/-) embryos do not express certain hematopoiesis-related gene transcripts including those of the PU.1 gene. *Oncogene* **17**, 2287-2293 (1998).
19. Okuda, T., van Deursen, J., Hiebert, S.W., Grosveld, G. & Downing, J.R. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* **84**, 321-330 (1996).
20. Wang, Q., Stacy, T., Binder, M., Marin Padilla, M., Sharpe, A.H. & Speck, N.A. Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 3444-3449 (1996).
21. Cockerill, P.N., Osborne, C.S., Bert, A.G. & Grotto, R.J. Regulation of GM-CSF gene transcription by core-binding factor. *Cell Growth Differ* **7**, 917-922 (1996).
22. Frank, R., Zhang, J., Uchida, H., Meyers, S., Hiebert, S.W. & Nimer, S.D. The AML1/ETO fusion protein blocks transactivation of the GM-CSF promoter by AML1B. *Oncogene* **11**, 2667-2674 (1995).
23. Hiebert, S., Sun, W., Davis, J., Golub, T., Shurtleff, S., Buijs, A., et al. The t(12;21) translocation converts AML-1B from an activator to a repressor of transcription. *Molecular and cellular biology* **16**, 1349-1355 (1996).
24. Zhang, D.E., Hohaus, S., Voso, M.T., Chen, H.M., Smith, L.T., Hetherington, C.J., et al. Function of PU.1 (Spi-1), C/EBP, and AML1 in early myelopoiesis: regulation of multiple myeloid CSF receptor promoters. *Curr Top Microbiol Immunol* **211**, 137-147 (1996).
25. Sabaawy, H.E., Azuma, M., Embree, L.J., Tsai, H.J., Starost, M.F. & Hickstein, D.D. TEL-AML1 transgenic zebrafish model of precursor B cell acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15166-15171 (2006).
26. Nuchprayoon, I., Meyers, S., Scott, L.M., Suzow, J., Hiebert, S. & Friedman, A.D. PEBP2/CBF, the murine homolog of the human myeloid AML1 and PEBP2 beta/CBF beta proto-oncoproteins, regulates the murine myeloperoxidase and neutrophil elastase genes in immature myeloid cells. *Mol Cell Biol* **14**, 5558-5568 (1994).
27. Okuda, T., Cai, Z., Yang, S., Lenny, N., Lyu, C.J., van Deursen, J.M., et al. Expression of a knocked-in AML1-ETO leukemia gene inhibits the establishment of normal definitive hematopoiesis and directly generates dysplastic hematopoietic progenitors. *Blood* **91**, 3134-3143 (1998).
28. Okuda, T., Takeda, K., Fujita, Y., Nishimura, M., Yagyu, S., Yoshida, M., et al. Biological characteristics of the leukemia-associated transcriptional factor AML1 disclosed by hematopoietic rescue of AML1-deficient embryonic stem cells by using a knock-in strategy. *Mol Cell Biol* **20**, 319-328 (2000).
29. Rhoades, K.L., Hetherington, C.J., Harakawa, N., Yergeau, D.A., Zhou, L., Liu, L.Q., et al. Analysis of the role of AML1-ETO in leukemogenesis, using an inducible transgenic mouse model. *Blood* **96**, 2108-2115 (2000).
30. Miyoshi, H., Shimizu, K., Kozu, T., Maseki, N., Kaneko, Y. & Ohki, M. 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* **88**, 10431-10434 (1991).

31. McLean, T.W., Ringold, S., Neuberg, D., Stegmaier, K., Tantravahi, R., Ritz, J., et al. TEL/AML-1 dimerizes and is associated with a favorable outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **88**, 4252-4258 (1996).
32. Rubnitz, J.E., Behm, F.G., Pui, C.H., Evans, W.E., Relling, M.V., Raimondi, S.C., et al. Genetic studies of childhood acute lymphoblastic leukemia with emphasis on p16, MLL, and ETV6 gene abnormalities: results of St Jude Total Therapy Study XII. *Leukemia* **11**, 1201-1206 (1997).
33. Seeger, K., Adams, H.P., Buchwald, D., Beyersmann, B., Kremens, B., Niemeyer, C., et al. TEL-AML1 fusion transcript in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. The Berlin-Frankfurt-Munster Study Group. *Blood* **91**, 1716-1722 (1998).
34. Shurtleff, S.A., Buijs, A., Behm, F.G., Rubnitz, J.E., Raimondi, S.C., Hancock, M.L., et al. TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia* **9**, 1985-1989 (1995).
35. Seeger, K., Buchwald, D., Peter, A., Taube, T., von Stackelberg, A., Schmitt, G., et al. TEL-AML1 fusion in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **94**, 374-376 (1999).
36. Rubnitz, J.E., Downing, J.R., Pui, C.H., Shurtleff, S.A., Raimondi, S.C., Evans, W.E., et al. TEL gene rearrangement in acute lymphoblastic leukemia: a new genetic marker with prognostic significance. *J Clin Oncol* **15**, 1150-1157 (1997).
37. Berger, R., Le Coniat, M., Romana, S.P. & Jonveaux, P. Secondary acute myeloblastic leukemia with t(16;21) (q24;q22) involving the AML1 gene. *Hematol Cell Ther* **38**, 183-186 (1996).
38. Stanulla, M., Wang, J., Chervinsky, D.S. & Aplan, P.D. Topoisomerase II inhibitors induce DNA double-strand breaks at a specific site within the AML1 locus. *Leukemia* **11**, 490-496 (1997).
39. Guerrier-Takada, C. & Altman, S. Catalytic activity of an RNA molecule prepared by transcription in vitro. *Science* **223**, 285-286 (1984).
40. Bass, B.L. & Cech, T.R. Specific interaction between the self-splicing RNA of Tetrahymena and its guanosine substrate: implications for biological catalysis by RNA. *Nature* **308**, 820-826 (1984).
41. Kruger, K., Grabowski, P.J., Zaug, A.J., Sands, J., Gottschling, D.E. & Cech, T.R. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell* **31**, 147-157 (1982).
42. Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N. & Altman, S. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* **35**, 849-857 (1983).
43. Moazed, D. & Noller, H.F. Interaction of tRNA with 23S rRNA in the ribosomal A, P, and E sites. *Cell* **57**, 585-597 (1989).
44. Johnston, W.K., Unrau, P.J., Lawrence, M.S., Glasner, M.E. & Bartel, D.P. RNA-catalyzed RNA polymerization: accurate and general RNA-templated primer extension. *Science* **292**, 1319-1325 (2001).
45. Scott, W.G. Ribozymes. *Curr Opin Struct Biol* **17**, 280-286 (2007).
46. Gilbert, W. Origin of life: The RNA world. *Nature* **319**(1986).
47. Prody, G.A., Bakos, J.T., Buzayan, J.M., Schneider, I.R. & Bruening, G. Autolytic Processing of Dimeric Plant Virus Satellite RNA. *Science* **231**, 1577-1580 (1986).
48. Symons, R.H. Small catalytic RNAs. *Annu Rev Biochem* **61**, 641-671 (1992).
49. Koizumi, M., Iwai, S. & Ohtsuka, E. Cleavage of specific sites of RNA by designed ribozymes. *FEBS Lett* **239**, 285-288 (1988).

50. Perriman, R., Delves, A. & Gerlach, W.L. Extended target-site specificity for a hammerhead ribozyme. *Gene* **113**, 157-163 (1992).
51. Uhlenbeck, O.C. A small catalytic oligoribonucleotide. *Nature* **328**, 596-600 (1987).
52. Haseloff, J. & Gerlach, W.L. Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature* **334**, 585-591 (1988).
53. Jarvis, T.C., Wincott, F.E., Alby, L.J., McSwiggen, J.A., Beigelman, L., Gustofson, J., et al. Optimizing the cell efficacy of synthetic ribozymes. Site selection and chemical modifications of ribozymes targeting the proto-oncogene c-myb. *J Biol Chem* **271**, 29107-29112 (1996).
54. Temin, H.M. & Mizutani, S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* **226**, 1211-1213 (1970).
55. Baltimore, D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* **226**, 1209-1211 (1970).
56. Coffin, J.M., Hughes, S.H. & Varmus, H.E. *Retroviruses*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1997).
57. *Retroviruses: Molecular Biology, Genomics and Pathogenesis*, (Caister Academic Press, Norfolk, UK, 2010).
58. Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Reitz, M.S., Kalyanaraman, V.S. & Gallo, R.C. Isolation of a new type C retrovirus (HTLV) in primary uncultured cells of a patient with Sezary T-cell leukaemia. *Nature* **294**, 268-271 (1981).
59. Kalyanaraman, V.S., Sarngadharan, M.G., Robert-Guroff, M., Miyoshi, I., Golde, D. & Gallo, R.C. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science* **218**, 571-573 (1982).
60. Gallo, R.C. The discovery of the first human retrovirus: HTLV-1 and HTLV-2. *Retrovirology* **2**, 17 (2005).
61. Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-871 (1983).
62. Gallo, R.C., Sarin, P.S., Gelmann, E.P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V.S., et al. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 865-867 (1983).
63. Broder, S. & Gallo, R.C. A pathogenic retrovirus (HTLV-III) linked to AIDS. *N Engl J Med* **311**, 1292-1297 (1984).
64. Clavel, F., Guyader, M., Guetard, D., Salle, M., Montagnier, L. & Alizon, M. Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature* **324**, 691-695 (1986).
65. Wain-Hobson, S., Alizon, M. & Montagnier, L. Relationship of AIDS to other retroviruses. *Nature* **313**, 743 (1985).
66. Brown, F. Human immunodeficiency virus. *Science* **232**, 1486 (1986).
67. Guyader, M., Emerman, M., Sonigo, P., Clavel, F., Montagnier, L. & Alizon, M. Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* **326**, 662-669 (1987).
68. Clavel, F., Klatzmann, D. & Montagnier, L. Deficient LAV1 neutralising capacity of sera from patients with AIDS or related syndromes. *Lancet* **1**, 879-880 (1985).
69. Paprotka, T., Delviks-Frankenberry, K.A., Cingoz, O., Martinez, A., Kung, H.J., Tepper, C.G., et al. Recombinant origin of the retrovirus XMRV. *Science* **333**, 97-101 (2011).

70. Wainberg, M.A. & Jeang, K.T. XMRV as a human pathogen? *Cell Host Microbe* **9**, 260-262 (2011).
71. Klein, H.G., Dodd, R.Y., Hollinger, F.B., Katz, L.M., Kleinman, S., McCleary, K.K., et al. Xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV) and blood transfusion: report of the AABB interorganizational XMRV task force. *Transfusion* **51**, 654-661 (2011).
72. Ellermann, V. & Bang, O. Experimentelle Leukämie bei Hühnern. *Zbl. Bakt. Abt. 1 Orig.* **46**, 595-609 (1908).
73. Rous, P. Landmark article (JAMA 1911;56:198). Transmission of a malignant new growth by means of a cell-free filtrate. By Peyton Rous. *JAMA* **250**, 1445-1449 (1983).
74. Bittner, J.J. Some Possible Effects of Nursing on the Mammary Gland Tumor Incidence in Mice. *Science* **84**, 162 (1936).
75. Maeda, N., Fan, H. & Yoshikai, Y. Oncogenesis by retroviruses: old and new paradigms. *Rev Med Virol* **18**, 387-405 (2008).
76. Szulc, J., Wiznerowicz, M., Sauvain, M.O., Trono, D. & Aebischer, P. A versatile tool for conditional gene expression and knockdown. *Nat Methods* **3**, 109-116 (2006).
77. Choi, W.H., Choi, B.R., Kim, J.H., Yeo, W.S., Oh, S. & Kim, D.E. Design and kinetic analysis of hammerhead ribozyme and DNAzyme that specifically cleave TEL-AML1 chimeric mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* **374**, 169-174 (2008).
78. Brummelkamp, T.R., Bernards, R. & Agami, R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* **2**, 243-247 (2002).
79. Brummelkamp, T.R., Bernards, R. & Agami, R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**, 550-553 (2002).
80. Lee, N.S., Dohjima, T., Bauer, G., Li, H., Li, M.J., Ehsani, A., et al. Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat Biotechnol* **20**, 500-505 (2002).
81. Paddison, P.J., Caudy, A.A., Bernstein, E., Hannon, G.J. & Conklin, D.S. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* **16**, 948-958 (2002).
82. Paul, C.P., Good, P.D., Winer, I. & Engelke, D.R. Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat Biotechnol* **20**, 505-508 (2002).
83. Boden, D., Pusch, O., Lee, F., Tucker, L., Shank, P.R. & Ramratnam, B. Promoter choice affects the potency of HIV-1 specific RNA interference. *Nucleic Acids Res* **31**, 5033-5038 (2003).
84. Tuschl, T. Expanding small RNA interference. *Nat Biotechnol* **20**, 446-448 (2002).
85. Kurreck, J. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem* **270**, 1628-1644 (2003).
86. Andersson, S., Davis, D.L., Dahlback, H., Jornvall, H. & Russell, D.W. Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme. *J Biol Chem* **264**, 8222-8229 (1989).
87. Jarmy, G., Heinkelein, M., Weissbrich, B., Jassoy, C. & Rethwilm, A. Phenotypic analysis of the sensitivity of HIV-1 to inhibitors of the reverse transcriptase, protease, and integrase using a self-inactivating virus vector system. *J Med Virol* **64**, 223-231 (2001).

88. Alexopoulou, A.N., Couchman, J.R. & Whiteford, J.R. The CMV early enhancer/chicken beta actin (CAG) promoter can be used to drive transgene expression during the differentiation of murine embryonic stem cells into vascular progenitors. *BMC Cell Biol* **9**, 2 (2008).
89. Zufferey, R., Donello, J.E., Trono, D. & Hope, T.J. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* **73**, 2886-2892 (1999).
90. Klein, R., Ruttkowski, B., Knapp, E., Salmons, B., Gunzburg, W.H. & Hohenadl, C. WPRE-mediated enhancement of gene expression is promoter and cell line specific. *Gene* **372**, 153-161 (2006).
91. DuBridge, R.B., Tang, P., Hsia, H.C., Leong, P.M., Miller, J.H. & Calos, M.P. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* **7**, 379-387 (1987).
92. Rasheed, S., Nelson-Rees, W.A., Toth, E.M., Arnstein, P. & Gardner, M.B. Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer* **33**, 1027-1033 (1974).
93. Rosenfeld, C., Goutner, A., Choquet, C., Venuat, A.M., Kayibanda, B., Pico, J.L., et al. Phenotypic characterisation of a unique non-T, non-B acute lymphoblastic leukaemia cell line. *Nature* **267**, 841-843 (1977).
94. Matsuo, Y. & Drexler, H.G. Establishment and characterization of human B cell precursor-leukemia cell lines. *Leuk Res* **22**, 567-579 (1998).
95. Sambrook, J. & Russell, D.W. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001).
96. *Short Protocols in Molecular Biology*, (John Wiley & Sons, Inc., Canada, 2002).
97. Szulc, J. & Aebischer, P. Conditional gene expression and knockdown using lentivirus vectors encoding shRNA. *Methods Mol Biol* **434**, 291-309 (2008).
98. Rohwer, N., Lobitz, S., Daskalow, K., Jons, T., Vieth, M., Schlag, P.M., et al. HIF-1alpha determines the metastatic potential of gastric cancer cells. *Br J Cancer* **100**, 772-781 (2009).
99. Andreasson, P., Schwaller, J., Anastasiadou, E., Aster, J. & Gilliland, D.G. The expression of ETV6/CBFA2 (TEL/AML1) is not sufficient for the transformation of hematopoietic cell lines in vitro or the induction of hematologic disease in vivo. *Cancer Genet Cytogenet* **130**, 93-104. (2001).
100. Fischer, M., Schwieger, M., Horn, S., Niebuhr, B., Ford, A., Roscher, S., et al. Defining the oncogenic function of the TEL/AML1 (ETV6/RUNX1) fusion protein in a mouse model. *Oncogene* (2005).
101. Bernardin, F., Yang, Y., Cleaves, R., Zahurak, M., Cheng, L., Civin, C.I., et al. TEL-AML1, expressed from t(12;21) in human acute lymphocytic leukemia, induces acute leukemia in mice. *Cancer Res* **62**, 3904-3908. (2002).
102. Hong, D., Gupta, R., Ancliff, P., Atzberger, A., Brown, J., Soneji, S., et al. Initiating and cancer-propagating cells in TEL-AML1-associated childhood leukemia. *Science* **319**, 336-339 (2008).
103. Nimer, S.D. & Moore, M.A. Effects of the leukemia-associated AML1-ETO protein on hematopoietic stem and progenitor cells. *Oncogene* **23**, 4249-4254 (2004).
104. Greaves, M.F., Maia, A.T., Wiemels, J.L. & Ford, A.M. Leukemia in twins: lessons in natural history. *Blood* **102**, 2321-2333. (2003).
105. Greaves, M.F. & Wiemel, J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer* **3**, 639-649. (2003).

106. Graf Einsiedel, H., Taube, T., Hartmann, R., Wellmann, S., Seifert, G., Henze, G., et al. Deletion analysis of p16(INKa) and p15(INKb) in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **99**, 4629-4631. (2002).
107. Cave, H., van der Werff ten Bosch, J., Suci, S., Guidal, C., Waterkeyn, C., Otten, J., et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer--Childhood Leukemia Cooperative Group [see comments]. *N Engl J Med* **339**, 591-598 (1998).
108. Seeger, K., von Stackelberg, A., Taube, T., Buchwald, D., Korner, G., Suttorp, M., et al. Relapse of TEL-AML1--positive acute lymphoblastic leukemia in childhood: a matched-pair analysis. *J Clin Oncol* **19**, 3188-3193 (2001).
109. Williams, D.A., Lemischka, I.R., Nathan, D.G. & Mulligan, R.C. Introduction of new genetic material into pluripotent haematopoietic stem cells of the mouse. *Nature* **310**, 476-480 (1984).
110. Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M.P., Wulffraat, N., Leboulch, P., et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* **302**, 415-419 (2003).
111. Hacein-Bey-Abina, S., von Kalle, C., Schmidt, M., Le Deist, F., Wulffraat, N., McIntyre, E., et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* **348**, 255-256 (2003).
112. Maier, P., von Kalle, C. & Laufs, S. Retroviral vectors for gene therapy. *Future Microbiol* **5**, 1507-1523 (2010).
113. Wade-Martins, R. Developing extrachromosomal gene expression vector technologies: an overview. *Methods Mol Biol* **738**, 1-17 (2011).
114. Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**, 263-267 (1996).
115. Miller, D.G., Adam, M.A. & Miller, A.D. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol Cell Biol* **10**, 4239-4242 (1990).
116. Schweizer, M. & Merten, O.W. Large-scale production means for the manufacturing of lentiviral vectors. *Curr Gene Ther* **10**, 474-486 (2010).
117. Miller, A.D. Retrovirus packaging cells. *Hum Gene Ther* **1**, 5-14 (1990).
118. Miller, A.D. Cell surface receptors for retroviruses and implications for gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11407-11413 (1996).
119. Emi, N., Friedmann, T. & Yee, J.K. Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatitis virus. *J Virol* **65**, 1202-1207 (1991).
120. Yee, J.K., Miyano, A., LaPorte, P., Bouic, K., Burns, J.C. & Friedmann, T. A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors: highly efficient infection of primary hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 9564-9568 (1994).
121. Yee, J.K., Friedmann, T. & Burns, J.C. Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods Cell Biol* **43 Pt A**, 99-112 (1994).
122. Burns, J.C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M. & Yee, J.K. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8033-8037 (1993).
123. von Laer, D., Corovic, A., Vogt, B., Herwig, U., Roscher, S., Fehse, B., et al. Amphotropic and VSV-G-pseudotyped retroviral vectors transduce human

- hematopoietic progenitor cells with similar efficiency. *Bone Marrow Transplant* **25 Suppl 2**, S75-79 (2000).
124. Naviaux, R.K., Costanzi, E., Haas, M. & Verma, I.M. The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. *J Virol* **70**, 5701-5705 (1996).
 125. Finer, M.H., Dull, T.J., Qin, L., Farson, D. & Roberts, M.R. kat: a high-efficiency retroviral transduction system for primary human T lymphocytes. *Blood* **83**, 43-50 (1994).
 126. Giry-Laterriere, M., Verhoeyen, E. & Salmon, P. Lentiviral vectors. *Methods Mol Biol* **737**, 183-209 (2011).
 127. Pauwels, K., Gijssbers, R., Toelen, J., Schambach, A., Willard-Gallo, K., Verheust, C., et al. State-of-the-art lentiviral vectors for research use: risk assessment and biosafety recommendations. *Curr Gene Ther* **9**, 459-474 (2009).
 128. Dropulic, B. Lentiviral vectors: their molecular design, safety, and use in laboratory and preclinical research. *Hum Gene Ther* **22**, 649-657 (2011).
 129. Diakos, C., Krapf, G., Gerner, C., Inthal, A., Lemberger, C., Ban, J., et al. RNAi-mediated silencing of TEL/AML1 reveals a heat-shock protein- and survivin-dependent mechanism for survival. *Blood* **109**, 2607-2610 (2007).
 130. Xia, X., Zhang, Y., Zieth, C.R. & Zhang, S.C. Transgenes delivered by lentiviral vector are suppressed in human embryonic stem cells in a promoter-dependent manner. *Stem Cells Dev* **16**, 167-176 (2007).
 131. Ramezani, A., Hawley, T.S. & Hawley, R.G. Lentiviral vectors for enhanced gene expression in human hematopoietic cells. *Mol Ther* **2**, 458-469 (2000).
 132. Tedeschi, L., Lande, C., Cecchettini, A. & Citti, L. Hammerhead ribozymes in therapeutic target discovery and validation. *Drug Discov Today* **14**, 776-783 (2009).
 133. Goodchild, J. Hammerhead ribozymes: biochemical and chemical considerations. *Curr Opin Mol Ther* **2**, 272-281 (2000).
 134. Wiznerowicz, M., Szulc, J. & Trono, D. Tuning silence: conditional systems for RNA interference. *Nat Methods* **3**, 682-688 (2006).
 135. Scherer, W.F., Syverton, J.T. & Gey, G.O. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* **97**, 695-710 (1953).
 136. Zaliouva, M., Madzo, J., Cario, G. & Trka, J. Revealing the role of TEL/AML1 for leukemic cell survival by RNAi-mediated silencing. *Leukemia* **25**, 313-320 (2011).
 137. Li, M., Li, H. & Rossi, J.J. RNAi in combination with a ribozyme and TAR decoy for treatment of HIV infection in hematopoietic cell gene therapy. *Ann N Y Acad Sci* **1082**, 172-179 (2006).
 138. Nawtaisong, P., Keith, J., Fraser, T., Balaraman, V., Kolokoltssov, A., Davey, R.A., et al. Effective suppression of Dengue fever virus in mosquito cell cultures using retroviral transduction of hammerhead ribozymes targeting the viral genome. *Virology* **6**, 73 (2009).