Expressionshemmung des humanen Onkogens *Bcr-Abl* durch RNA-Interferenz

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde eines Doktors
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

Lara Wohlbold

aus Böblingen

Hauptberichter:	Prof. Dr. P. Scheurich
Mitberichter:	Prof. Dr. W.E. Aulitzky
Tag der mündlichen Prüfung:	26. November 2004

Institut für Zellbiologie und Immunologie
und
Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut
für Klinische Pharmakologie

Stuttgart
2004

Der Großteil der vorliegenden Arbeit wurde am Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie (Stuttgart) unter der Anleitung von Prof. Dr. Walter E. Aulitzky und in Kooperation mit der Alnylam Europe AG (Kulmbach) durchgeführt. Teile der Arbeit wurden außerdem am Weizmann Institute of Science (Rehovot, Israel) unter der Betreuung von Prof. Dr. Moshe Oren erarbeitet.

Das Projekt wurde durch ein Stipendium der Robert Bosch Stiftung (Stuttgart) gefördert.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und der Ratschläge von jeweils namentlich aufgeführten Personen angefertigt habe.

Stuttgart, den 1. Oktober 2004
Lara Wohlbold

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis 6

2. Summary 9

3. Zusammenfassung 16

4. Einleitung 19

4.1 Bcr-Abl: humanes Onkogen 19

4.1.1 Das Philadelphia-Chromosom 19

4.1.2 Die Bcr-Abl-Tyrosinkinase 20

4.1.3 *Bcr-Abl*-Transkriptvarianten 21

4.2 Bcr-Abl und Leukämie 23

4.2.1 Chronisch Myeloische Leukämie 23

4.2.2 Akute Lymphatische Leukämie 24

4.2.3 Die Bcr-Abl-TK als therapeutischer Angriffspunkt 25

4.2.4 Imatinib mesylate 25

4.2.5 Ursachen der Imatinib-Resistenz 26

4.3 RNA-Interferenz 27

4.3.1 Mechanismus der RNAi 28

4.3.2 Anwendung der RNAi 29

4.4 Ziele der Arbeit 30

5. Material und Methoden 31

5.1 Zellkultur 31

5.1.1 Kulturmedium und Zusätze 31

5.1.2 Beschreibung der verwendeten Zelllinien 32

5.1.3 Kultivierung der Zellen 33

5.1.4 Trypan-Blau Ausschluss-Färbung 33

5.1.5 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen 34

5.1.6 Bestimmung der Zellvitalität über eine MTT-Analyse 34

5.2. Kultur von primärem Zellmaterial 35

5.2.1 Isolation mononukleärer Zellen über Ficoll-Dichtegradienten Zentrifugation 35

5.2.2 Isolation hämatopoetischer CD34-exprimierender MNC 36

5.2.3 Kultivierung von primärem Zellmaterial 36
5.3 Stabile Übertragung des humanen Onkogens Bcr-Abl in 32D-Zellen 36
5.3.1 Verwendete *Bcr-Abl*-Expressionsvektoren 37
5.4 Durchflusszytometrische Untersuchung der Zellen 39
5.4.1 Nachweis beginnender Apoptose über Annexin V-Färbung 39
5.4.2 Nachweis später Apoptose/Nekrose über Propidiumjodid-Färbung 40
5.4.3 Untersuchung der siRNA-Transfektionseffizienz 40
5.4.4 Untersuchung der *eGfp*-Expression in 32Dp210-wt Zellen 40
5.5 Untersuchung der eGfp-Expression am Fluoreszenzmikroskop 41
5.6 Protein-Analyse 41
5.6.1 Gesamtproteinextraktion aus hämatopoetischen Zelllinien 41
5.6.2 Extraktion von Proteinen aus primären hämatopoetischen Zellen 42
5.6.3 Proteinbestimmung nach Bradford 42
5.6.4 Auftrennung der Proteine über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese 43
5.6.5 Western-Blot-Analyse 44
5.7 RNA-Interferenz 46
5.7.1 RNAi durch direkte Übertragung von siRNA-Molekülen 46
5.7.2 RNAi durch Übertragung des pSUPER-shRNA-Expressionsvektors 51
5.8 Molekularbiologische Methoden 55
5.8.1 Isolation von Gesamt-RNA 55
5.8.2 Bestimmung der *Bcr-Abl*-Fusionsvariante über PCR 55
5.8.3 Quantifizierung des *Bcr-Abl*-Fusionstranskripts über LightCycler-PCR 57

6. Ergebnisse 58
6.1. Bcr-Abl-e14a2-RNAi 58
6.1.1 Charakterisierung der Zelllinien 32Dp210/e14a2 und M07p210/e14a2 58
6.1.2 *Bcr-Abl-e14a2*-RNAi durch direkte Transfektion von siRNA-Molekülen 60
6.1.3 Wirkung der *Bcr-Abl*-RNAi auf den zellulären Phänotyp 63
6.1.4 Bestimmung der Transfektionseffizienz 66
6.1.5 Kinetik der *Bcr-Abl*-RNAi 66
6.1.6 Eine längere siRNA-Exposition ist effizienter 67
6.1.7 Spezifität des RNAi-Effekts 69
6.1.8 Dosisabhängigkeit des RNAi-Effekts 70
6.1.9 Untersuchung des RNAi-Effekts mit Hilfe eines Reportergen-Systems 71
6.2. Bcr-Abl-e13a2-RNAi 74

6.3. Bcr-Abl-e1a2-RNAi *77*
6.4. Sensibilisierung Bcr-Abl$^+$-Zellen gegenüber klinischen Therapeutika durch RNAi *80*
6.5.1. Sensibilisierung gegenüber Imatinib und γ-Bestrahlung 80
6.5.2 Kompensation bestimmter Imatinib-Resistenz-vermittelnder *Bcr-Abl*-Mutationen 82
6.5 Untersuchung der Effizienz verschieden modifizierter siRNA-Moleküle *86*
6.6 Übertragung des RNAi-Protokolls auf humane leukämische Zellen *90*
6.7 Bcr-Abl-RNAi durch stabile ‚short hairpin RNA'-Expression *93*
7. Diskussion 96
7.1 Charakterisierung der Bcr-Abl-RNAi *98*
7.1.1 Nachweis des RNAi-Effekts 98
7.1.2 Dauer der RNAi in Säugerzellen 99
7.1.3 Sequenzspezifität der siRNA-Wirkung 100
7.1.4 Die anti-leukämische Wirkung der *Bcr-Abl*-RNAi ist Bcr-Abl-abhängig 103
7.2 Bestimmung effektiver anti-Bcr-Abl-siRNAs *103*
7.2.1 Voraussetzung für die Effektivität von siRNAs 104
7.3 Die Bcr-Abl-RNAi sensitiviert Bcr-Abl$^+$-Zellen gegenüber Imatinib *106*
7.4 Untersuchung stabilisierender siRNA-Modifikationen *109*
7.5 Stabile Expression von anti-Bcr-Abl-shRNAs in K562-Zellen *111*
7.7 Fazit und Ausblick *113*
8. Literaturverzeichnis 116
9. Eigene Veröffentlichungen 128
10. Danksagung 129
11. Lebenslauf 130

1. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin und Ampere
Abb.	Abbildung
Abl	Abelson-Genprodukt
AML	Akute Myeloische Leukämie
ALCL	Anaplastisches Großzelliges Lymphom
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
ARG	‚Abelson-related'-Genprodukt
AS	Aminosäure
as	‚antisense'
ATP	Adenosintriphosphat
BA	*Bcr-Abl*
BAF	*Bcr-Abl* Fusionsstelle
BC	Blasten-Krise (‚blast crisis')
Bcr	Genprodukt der ‚breakpoint cluster region'
Bcr-Abl^{+}	*Bcr-Abl* exprimierend
BD	Binde-Domäne
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
Ca	Calcium
CCD	‚charged couple devices'
°C	Grad Celsius
CD	‚cluster of differentiation'
CHR	‚complete hematologic response'
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
CMML	Chronisch Myelomonocytäre Leukämie
CP	chronische Phase
Da	Dalton
DFS	‚Disease free survival'
DNA	Desoxyribonukleinsäure

ds	doppelsträngig
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	‚enhanced green fluorescent protein‘
EP	Elektroporation
EPC	Elektroporations-Kontrolle
F	Farad
FACS	‚fluorescence activated cell sorter‘
FCS	‚fetal calf serum‘
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
G	Guanin oder Glycin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gy	Gray
h	Stunde
H	Histidin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl-)1-piperazinethan-sulfonsäure
I	Isoleucin
IC_{50}	‚inhibitory concentration‘; Konzentration, die zu einer 50%-igen Hemmung der Zellproliferation führt
IRES	‚internal ribosomal entry site‘
K	Lysin
kb	Kilobase(n)
LPF	Lipofektion
LTR	‚long terminal repeat‘
m	Milli-
M	Molar (mol/l)
mIL-3	murines Interleukin-3
min	Minute
miRNA	‚micro RNA‘
MNC	mononukleäre Zellen
mRNA	‚messenger RNA‘
µ	Mikro-
ODN	Oligo-Desoxynukleotid
Ω	Ohm

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	‚phosphate buffered saline‘
PCR	‚polymerase chain reaction‘
PDGFβR	‚platelet derived growth factor β receptor‘
PI	Propidiumjodid
PK	Proteinkinase
Pol III	Polymerase III
pS	pSUPER-Vektor
Q	Glutamin
RISC	‚RNA induced silencing complex’
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkription
s	Sekunde oder ‚sense‘
SD	‚standard deviation‘
SEM	‚standard error of the mean‘
siRNA	‚short interfering RNA‘
ss	einzelsträngig
T	Thymin oder Threonin
TBS	‚tris buffered saline‘
TBST	‚tris buffered saline plus Tween‘
TEL	‚translocation ETS like leukemia‘-Genprodukt
TK	Tyrosinkinase
TKD	Tyrosinkinase-Domäne
U	Uracil
u.a.	unter anderem
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen/Volumen
W	Watt
wt	Wildtyp
w/v	Masse/Volumen
Y	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel

2. Summary

The discovery of the Philadelphia (Ph) chromosome represented the first consistent chromosomal abnormality causing a specific human cancer (Nowell *et al.*, 1960). The Ph chromosome is generated by a reciprocal translocation between the long arms of chromosome 9 and chromosome 22 (Rowley, 1973). It occurs in almost all patients with chronic myelogenous leukemia (CML) and in about 10-20% of the adults with acute lymphoblastic leukemia (ALL) (Westbrook *et al.*, 1992).

The t(9;22) translocation fuses the *Bcr* gene from chromosome 22 and the *Abl* gene from chromosome 9, resulting in the oncogenic *Bcr-Abl* fusion gene (Heisterkamp *et al.*, 1983). Variable breakpoints within the *Bcr* gene on chromosome 22 lead to the formation of different *Bcr-Abl* fusion gene variants which encode for different proteins: $p190^{Bcr\text{-}Abl}$ (M_r 190,000), $p210^{Bcr\text{-}Abl}$ (M_r 210,000), and $p230^{Bcr\text{-}Abl}$ (M_r 230,000). In about 95% of the CML patients the *Bcr-Abl* fusion transcripts *e14a2* (former *b3a2*) and *e13a2* (former *b2a2*) can be detected (reviewed in Barnes *et al.*, 2002). The translated product is in each case a p210 kD Bcr-Abl protein. In patients with Ph^+ ALL a shorter transcript version called *Bcr-Abl-e1a2,* predominates (reviewed in Faderl *et al.*, 2003). Translation of this variant results in the somewhat lighter $p190^{Bcr\text{-}Abl}$ protein.

Both Bcr-Abl proteins $p190^{Bcr\text{-}Abl}$ and $p210^{Bcr\text{-}Abl}$ are characterized by a dramatically increased tyrosine-kinase activity, as compared to that of normal Abl protein, leading to aberrant phosphorylation of downstream target molecules. This abnormal Bcr-Abl kinase activity is assumed to be sufficient and necessary to initiate CML (for review: Wong *et al.*, 2004).

Imatinib mesylate (STI571, Gleevec™, Glivec®), a potent tyrosine kinase inhibitor has been recently approved by the american 'Food and Drug Administration' (FDA) for clinical treatment of Ph^+ leukemia. This small molecular drug specifically inhibits the kinase activity of c-Abl, ARG (Abelson related gene product), PDGFRβ (platelet derived growth factor receptor β), and c-KIT (stem cell factor receptor). Inhibition of the tyrosine kinase activity of Bcr-Abl by imatinib mesylate proved to be very effective for treatment of Ph^+ leukemia (reviewed in Kurzrock *et al.*, 2003). Nevertheless, both ALL and advanced CML patients frequently develop drug resistance after initial response, predominantly caused by genetic abnormalities such as point mutations leading to a single amino acid exchange in the Bcr-Abl kinase domain or overexpression of *Bcr-Abl* (for review: Rothberg, 2003; Cowan-Jacob *et al.*,

2004). Furthermore, it is not clear so far if the concomitant inhibition of the four other tyrosine kinases (c-Abl, ARG, PDGFR-β, c-KIT) during Imatinib treatment will have any long term side-effects. Therefore the development of alternative strategies to inhibit *Bcr-Abl* becomes increasingly important.

RNA interference (RNAi) is a cellular mechanism that utilizes the ability of double-stranded RNA (dsRNA) to interfere with homologous gene expression at the RNA or DNA level. As crucial step for the RNAi silencing mechanism it is described, that cytoplasmic dsRNA is cut in 21-23 nt small interfering RNAs (siRNA) by an RNAse III-like enzyme called Dicer. Then, the antisense strand of the siRNA guides the RNA induced silencing complex (RISC) to the targeted mRNA by complementary base-pairing leading to sequence-specific degradation of this mRNA. Recent developments in the use of siRNA to inhibit specific protein expression in mammalian cells have highlighted the potential use of these molecules as a therapeutic agent (reviewed in Mittal, 2004).

The exact fusion site of the *Bcr* and *Abl* sequences on the *Bcr-Abl* mRNA represents a leukemia specific nucleotide sequence. Such fusion transcripts encoding disease specific proteins are ideal targets for a tumor-specific RNAi approach. The aim of the present study was to develop an optimized *in vitro Bcr-Abl* RNAi protocol. Therefore, several chemically synthesized asymmetric siRNAs, as well as stable expressed shRNAs targeting the fusion site of the clinically relevant *Bcr-Abl* transcript variants (*e14a2, e13a2* or *e1a2)* were evaluated. RNAi efficiency was determined mainly by Western blot analysis of the Bcr-Abl protein level and by assessing the impact on the leukemic growth of the treated cells.
Generally, prolonged exposure to inhibitory RNA (≥ 48 h) proved to be necessary to achieve a significant downregulation of Bcr-Abl protein levels:
The results of this work show that repeated transfection with chemically synthesized 21 nt (sense strand) -23 nt (antisense strand) siRNAs at intervals of 24 h was much more effective for both, downregulation of the Bcr-Abl protein and induction of cell death: A single treatment of 32Dp210/e14a2 with the *Bcr-Abl-e14a2* specific siRNA BAF7 resulted in a notable reduction of Bcr-Abl protein levels followed by a decrease in the viability of 32Dp210/e14a2 cells to approximately 59% relative to electroporation control cells (EPC, 100%). In contrast, four consecutive treatments of cells with BAF7 reduced the amount of Bcr-Abl protein to the detection limit and led to a virtual loss of viability. Similar conclusions were reached by determination of total cell numbers 48 h following last treatment: whereas

the number of cells transfected with mismatched control siRNA (BAF8) increased from 2.5 Mio cells to more than 25 Mio cells within 48 h, a single transfection with BAF7 was sufficient to reduce proliferation by approximately 40% and repeating the treatment four times with the *Bcr-Abl* specific BAF7 siRNA, resulted in a greater than 90% inhibition of the increase in cell number.

Another possibility to overcome the transient nature of the RNAi response is by stable transfection of cells with an expression vector directing the production of short hairpin RNA (shRNA). The constitutive expression of plasmid-based shRNAs by the RNA polymerase III (pol III)-promotors U6 and H1 has been used successfully to obtain stable suppression of target genes also in mammalian cells (reviewed in Wilson *et al.*, 2003). Until recently it was believed that many shRNAs targeting fusion sites of chimeric mRNAs are not suitable to be expressed from the pol III-system since they carry stretches of four or more thymidines or adenines in their sequences. Polythymidine stretches are the termination signals for RNA pol III. Therefore, some of the most common fusion sites found in leukemia's like *Bcr-Abl-e14a2*, *MLL/AF9, PLM/E2A, NUP98/HOXA9*, and *MLL/AF4* were thought to be inappropriate for targeting (Damm-Welk, 2003).

The present work could confirm data also published by Li and colleagues (Li *et al.*, 2003), where a stretch of four thymidines in the target sequence did not represent a limiting obstacle for successful application of pol III directed expression of shRNAs. Thus, expression of *Bcr-Abl-e14a2* specific shRNA directed by the Pol III-promotor H1 resulted in significant silencing of *Bcr-Abl-e14a2* gene expression. Furthermore, successful knock down of *Bcr-Abl* gene expression by expression of shRNAs led to specific inhibition of proliferation of K562 cells.

One reason for the phenomenon, that prolonged siRNA exposure led to better results may be the long half life of Bcr-Abl. Spiller and colleagues (1998) determined the half life of $p210^{Bcr-Abl}$ (e13a2) in human KYO-1 cells as > 48 h. Target protein half life has been shown to be important for the effectiveness of conventional antisense (as)-Oligodesoxynucleotides (ODN). $p210^{Bcr-Abl}$ (e13a2) protein level was unaffected by as-ODN targeted to the *Bcr-Abl-e13a2* mRNA even though the mRNA levels at early times were substantially reduced.

A second problem seems to be that the siRNA effect achieved in mammalian cells is transient (for review: Mittal, 2004). Accordingly, Bcr-Abl protein levels recovered within 48 h after the last siRNA treatment in the cell lines used in this work.

But the results of the present work show, that this limitation could be overcome, either by repeated treatment with chemically synthesized siRNA at intervals of 24 h or by stable shRNA expression. With this optimized protocol the decrease in Bcr-Abl protein levels achieved was up to 86%, accompanied by a loss of viability of up to 96.4%.

To asses whether RNAi dependent inactivation of *Bcr-Abl* leads to sensitization of *Bcr-Abl* expressing cells to clinical therapeutics, the sensitivity to imatinib and γ-irradiation was determined following repeated treatment of 32Dp210/e14a2 cells with anti-*Bcr-Abl* siRNA. It could be shown that interference with *Bcr-Abl* expression is capable to enhance the sensitivity of the cells for both γ-irradiation, and imatinib:

The γ-irradiation dose causing a 50% cell kill was 2.5 Gy in 32Dp210/e14a2 cells treated with *Bcr-Abl* homologous siRNA, whereas cells treated with mismatch control tolerated approximately 2.5 times higher doses (6 Gy). The quantity of Bcr-Abl protein also determined the sensitivity of these cells to imatinib. After reduction of the Bcr-Abl protein level with siRNA a 3.4fold drop of the IC_{50} of imatinib was observed in 32Dp210/e14a2 cells when compared to controls. This phenomenon was also observed in human M07p210/e14a2 cells: 0.05 µM imatinib caused a significant induction of apoptosis in BAF7-treated cells whereas the same concentration had no considerable effect on electroporation control cells.

Additionally, RNAi restored imatinib sensitivity in cells expressing the imatinib resistance conferring Bcr-Abl variant H396P: Two of the imatinib resistance causing Bcr-Abl variants found in leukemia patients who relapsed after initial response to imatinib are Bcr-Abl-T315I and Bcr-Abl-H396P. These proteins display a single amino acid change in their kinase domain compared to Bcr-Abl (wt) rendering them less accessible to imatinib. Accordingly, expression of Bcr-Abl-T315I in 32D cells conferred complete resistance to imatinib and expression of Bcr-Abl-H396P rendered the respective cells ~ 4.7fold less sensitive to imatinib when compared to 32Dp210-wt. Downregulation of Bcr-Abl protein levels using RNAi resulted in a 4fold sensitization of 32Dp210-H396P to imatinib. In contrast, imatinib sensitivity of 32Dp210-T315I cells highly resistant to imatinib was not affected by siRNA treatment. These results are quite the opposite of previously published data, where no additive effect of imatinib and *Bcr-Abl* RNAi-treatment on induction of apoptosis in K562 cells was observed (Wilda *et al.*, 2002). These K562 cells, however, exhibited a high level of resistance to imatinib because of the fact that only 8% underwent apoptosis after a 48 h treatment. Therefore, this relatively resistant cell system may be suboptimal for evaluating possible additive effects with other potential inhibitors. Confirming results have been published

recently by Chen and colleagues (2004), illustrating that the downregulation of the fusion-protein TEL-PDGFβR by RNAi sensitizes TEL-PDGFβR expessing cells for imatinib and Rapamycine thereby antagonizing drug-resistance.

As breakpoint specific siRNAs have to overlap the breakpoint on either side, only a limited number of approximately 10 different potential siRNA sequences may be chosen for RNAi directed silencing of fusion sequences. In the experiments described in this work testing 1-4 siRNA molecules was sufficient to identify a sequence with significant capacity to silence the respective *Bcr-Abl* oncogene. In addition, other groups also reported on silencing of leukemia related oncogenes caused by translocations. AML1/ETO, the fusion gene underlying the translocation t(8;21), which is among the most frequent aberrations in AML was silenced by specific siRNAs (Heidenreich *et al.*, 2003). NPM/ALK the fusion gene created by the translocation t(2;5) in anaplastic large cell lymphoma (ALCL) was effectively targeted by RNAi (Ritter *et al.*, 2003) and finally TEL-PDGFβR was knocked down successfully in transfected cells (Chen *et al.*, 2004). These findings in conjunction with the relatively high frequency of effective siRNA sequences observed in the present work makes it likely that RNAi can be used as a general approach for targeting oncogenic translocations.
Any off-target siRNA effects leading to concomitant downregulation of the physiological *c-Abl* and *Bcr* gene expression could be excluded. The great specificity of the RNAi effect was confirmed by the fact that even a single point mutation in the siRNA sequence led to significant loss of siRNA efficacy. Also, siRNAs targeting the breakpoint variants *e13a2* and *e14a2* affected only their respective target RNAs but not other breakpoint variants sharing the same *a2* portion. This strongly supports the view that fusion genes resulting from translocations can be specifically targeted by RNAi.

Still, predicting the effectiveness of siRNA molecules appears to be difficult. The target regions of the different siRNAs used in this work exhibited considerable overlap. However, siRNA's efficiency varied extremely. For example, the target sequence of the *Bcr-Abl-e13a2* specific siRNA BAF3 was shifted only 2 nt downstream into the *Abl* part of the fusion site compared to BAF15. Nevertheless, in contrast to BAF15, BAF3 was completely ineffective. The same was true for the *Bcr-Abl-e1a2* specific siRNAs BAF22 and BAF24. The sequence of BAF24 was quite similar to that of BAF22, shifted only by 3 nt further into the *Abl* region of the fusion transcript. BAF22 actively silenced *Bcr-Abl-e1a2* gene expression whereas BAF24 did not. This might be due to secondary structures in the mRNA which limit the

accessibility of the siRNAs to their target, as has been described previously for the *Bcr-Abl-e14a2* fusion sequence (Kronenwett *et al.*, 1996). Overall there was a tendency recognizable that those siRNAs whose sequences reached further into the *Abl*-part of the *Bcr-Abl* fusion sequence than position +12 (downstream of the exact fusion point) were ineffective.

Recently the influence of the thermodynamic stability of siRNA ends on silencing activity was described in two independent publications (Schwarz *et al.*, 2003; Khvorova *et al.*, 2003). siRNAs with the 5´-end of the antisense strand being "weaker" than the 5´-end of the sense strand were shown to be more active. In addition the thermodynamic stability (ΔG [kcal/mol]) of the 5´-end of the antisense strand should be low to have active siRNAs. Thus the most effective siRNAs would typically have an A-U base pair (two hydrogen bonds) at the start of the antisense strand, while the sense strand would have a G-C base pair (three hydrogen bonds) at its 5'end.

In this work, three different shRNA sequences directed to *Bcr-Abl-e14a2* (BA1, BA2, and BA3) have been evaluated for their activity to inactivate *Bcr-Abl* in leukemic K562 cells. Whereas BA1 and BA2 proved to be effective in terms of gene silencing, the activity of BA3 was very weak. One possible reason for this discrepancy might be the design of the shRNA used. BA1 as well as BA2 follow the rules determined by Schwarz *et al.,* (2003) and Khvorova *et al.*, (2003). Both, exhibit a lower thermodynamic stability at the 5'end of the antisense strand (ΔG_{BA1}: -9,6 kcal/mol and ΔG_{BA2}: -8,1 kcal/mol) than at the 3'end (ΔG_{BA1}: -11,2 kcal/mol and ΔG_{BA2}: -8,9 kcal/mol). In contrast the thermodynamic values of the shRNA BA3 are opposing to this published rule, being $\Delta G_{5'antisense}$: -11,2 kcal/mol and $\Delta G_{5'sense}$: -7,7 kcal/mol. Thus, the results of this work are in conformity with these observations.

Unmodified siRNAs reveal an unexpected high stability in cell culture and *in vivo* as compared to conventional as-ODNs (for review: Kurreck, 2003). Despite of this, as a basis for a further development of this technique towards clinical application it is still desirable to increase siRNA serum stability. 2'-O-methyl modifications at the 3'end of the antisense strand or alternatively adaptation of a more stable sequence motive at the 3'end of the antisense strand ('stacking interactions' motive) of the siRNA could be shown to improve the serum stability (data: Alnylam Europe AG). In this work, such modified siRNAs were evaluated for their silencing capacity in comparison to their unmodified counterparts *in vitro*. The results of this work showed clearly that these modification types do not interfere with the activity of the siRNA molecules.

As a result of this work, it was possible to determine effective siRNAs, which led to significant downregulation of all clinically relevant $p210^{Bcr\text{-}Abl}$ and $p190^{Bcr\text{-}Abl}$ fusion proteins in *Bcr-Abl* expressing cell lines (32D-, M07-) as well as in Ph^+ leukemic cell systems (K562 cells, MEG-01 cells and primary $Ph^+/CD34^+$-cells). Inactivation of *Bcr-Abl* caused a reversion of Bcr-Abl-dependent effects on cell cycle regulatory and antiapoptotic proteins resulting in a selective inhibition of cell growth. This further supports the idea that translocations in leukemias are suitable targets for strategies applying RNAi.
In addition, the results demonstrate that the biological phenotype of *Bcr-Abl* positive cells and their response to imatinib can be effectively modulated by breakpoint specific siRNAs. Accordingly, two major mechanisms of imatinib resistance: overexpression of the protein and a proportion of point mutations in the ATP binding site, are antagonized by decreasing the quantity of the Bcr-Abl protein using siRNA treatment.

It can be concluded that breakpoint specific siRNAs represent a promising principle for modulating transforming genes and should be further developed towards clinical application.

3. Zusammenfassung

Die Aktivität der Bcr-Abl-Tyrosinkinase (Bcr-Abl-TK) ist die molekulare Ursache für die Entwicklung der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML) (zur Übersicht: Wong *et al.*, 2004). Bei der Akuten Lymphatischen Leukämie (ALL) bedeutet das Vorhandensein des Philadelphia-Chromosoms und damit die Expression des *Bcr-Abl*-Onkogens eine erhebliche Verschlechterung der klinischen Prognose (Westbrook *et al.*, 1992). Da Bcr-Abl nur in den malignen Zellen präsent ist und darüber hinaus kausal zur Entstehung des leukämischen Phänotyps beiträgt, stellt es ein ideales Ziel für eine pharmakologische Inhibition dar.
Seit 2001 ist ein effektiver Inhibitor der Bcr-Abl-TK-Aktivität (Imatinib mesylate, Glivec®, Gleevec™, Novartis, Schweiz) von der amerikanischen ‚Food and Drug Administration' (FDA) für die Therapie Ph^+-Leukämie-Patienten zugelassen. Trotz beeindruckender Resultate dieses Bcr-Abl-TK-Inhibitors bei der Behandlung von Leukämie-Patienten ist die Wirkung des Medikaments limitiert. So sprechen Patienten mit CML im fortgeschrittenen Stadium und Patienten mit Ph^+-ALL im Allgemeinen schlecht auf eine Imatinib-Behandlung an, da es hier häufig zur Entwicklung von Resistenzen gegen den Inhibitor kommt.
Um einem derartigen, durch Selektion therapieresistenter Zellklone verursachten Wirkungsverlust vorzubeugen, ist es notwendig, mehrere alternative Therapiestrategien zu kombinieren.

‚RNA-Interferenz' (RNAi) beschreibt einen durch ‚short interfering RNAs' (siRNA) ausgelösten, hoch konservierten Mechanismus zur sequenzspezifischen Stilllegung von Genen. Jüngste Fortschritte im Bereich der Anwendung von sequenzhomologen siRNA-Molekülen für die gezielte Inaktivierung von Genen in Säugerzellen wecken die Hoffnung auf eine klinische Nutzung dieser neuen Technik (zur Übersicht: McManus *et al.,* 2002).
Der Sequenzbereich an der Fusionsstelle der *Abl*- und *Bcr*-Sequenzen des *Bcr-Abl*-Fusionstranskripts ist charakteristisch für leukämische Zellen. Solche Fusionstranskripte, die für krankheitsspezifische Proteine codieren, stellen daher ideale Angriffspunkte für eine zielgerichtete ‚antisense'-Strategie dar.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation gelang es am Beispiel des humanen Onkogens *Bcr-Abl* zu zeigen, dass es möglich ist, die Expression dieses chimären Gens durch *in vitro*-Applikation sequenzhomologer siRNA-Moleküle effektiv und hoch spezifisch zu hemmen.

Man unterscheidet drei klinisch relevante *Bcr-Abl*-Transkriptvarianten (*Bcr-Abl-e1a2*, *-e13a2* und *-e14a2*), die durch Fusion des immer konstanten *Abl*-Anteils (*a2*) an unterschiedliche Bereiche der *Bcr*-Sequenz (*e1/e13/e14*) entstehen (zur Übersicht: Wong *et al.*, 2004). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmalig, dass es trotz der Beschränkung der Zielsequenz auf die Bruchpunktregion möglich war, für alle drei Bcr-Abl-Proteinvarianten $p210^{Bcr\text{-}Abl}$ (e13a2 und e14a2) und $p190^{Bcr\text{-}Abl}$ (e1a2) siRNAs zu bestimmen, die die Expression des jeweiligen Onkogens effektiv hemmten. Der siRNA-vermittelte Abfall des Bcr-Abl-Proteinspiegels war dabei immer mit einer Abnahme der Bioaktivität von Bcr-Abl verbunden.
Des Weiteren konnte die Serumstabilität der RNA-Doppelstränge durch verschiedene Modifikationen erhöht werden, ohne deren Effizienz zu beeinträchtigen. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für eine mögliche klinische Anwendung dieser Technik.

Auf Grund der hohen Stabilität des Bcr-Abl-Onkogenprodukts und der transienten Natur der RNAi in Säugerzellen erwies sich eine siRNA-Expositionsdauer von mind. 48 h als notwendig, um einen signifikanten anti-leukämischen Effekt zu erzielen. Diese verlängerte Exposition gelang zum einen durch wiederholte Transfektion von chemisch synthetisierten siRNAs oder durch stabile intrazelluläre siRNA-Expression unter Verwendung entsprechender Expressionsvektoren. Dieses optimierte siRNA-Behandlungsprotokoll bewirkte sowohl bei den humanen als auch bei den murinen hämatopoetischen Zelllinien eine Reduktion des Bcr-Abl-Proteinspiegels um bis zu 86%. Der Verlust der transformierenden Eigenschaften des Onkogens führte dabei in allen Fällen auch zu einem Rückgang der malignen Proliferation bzw. zum Absterben der behandelten Zellen. So wurde beispielsweise in 32Dp210-Zellen ein Viabilitätsverlust um bis zu 96,4% im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen erzielt. Die Effizienz dieses optimierten Protokolls übertraf deutlich die Resultate, die bislang von anderen Arbeitsgruppen erzielt werden konnten (Wilda *et al.*, 2002; Scherr *et al.*, 2003).

Die im Rahmen dieser Dissertation gelungene Übertragung des in *Bcr-Abl*-transfizierten Zelllinien-Modellen entwickelten RNAi-Protokolls auf leukämische Ph^{+}-Zellen lieferte einen ersten Hinweis auf eine Eignung der RNAi-Strategie auch für die klinische Anwendung. Interessant im Hinblick auf eine zukünftige klinische Anwendung dieser Technik ist außerdem die Beobachtung, dass mit Hilfe der *Bcr-Abl*-RNAi *Bcr-Abl*-positive Zellen gegenüber klinischen Therapie-Ansätzen, wie z.B. der Imatinib mesylate-Behandlung oder der γ-Bestrahlung sensibilisiert werden konnten. In diesem Zusammenhang konnte weiterhin erstmalig gezeigt werden, dass durch diese Sensibilisierung auch verschiedenen zellulären

Mechanismen einer Imatinib-Resistenz (z.B. *Bcr-Abl*-Überexpression und die Expression bestimmter *Bcr-Abl*-Mutationen) entgegengewirkt werden konnte.

Obwohl die effiziente Übertragung von siRNA-Molekülen in die ‚Target'-Zellen *in vivo* noch einen großen Teil an Forschungsarbeit erfordern wird, zeigen die Resultate dieser Arbeit, dass die *Bcr-Abl*-RNAi allein oder in Kombination mit anderen Therapieansätzen von therapeutischem Wert sein kann.

4. Einleitung

4.1 *Bcr-Abl*: humanes Onkogen

4.1.1 Das Philadelphia-Chromosom

1960 entdeckten Nowell und Hungerford eine Chromosomen-Abnormalität in Knochenmark-Zellen von Patienten mit Chronisch Myeloischer Leukämie (CML). Dieser Karyotyp-Marker wurde nach dem Ort seiner Entdeckung als Philadelphia (Ph)-Chromosom bezeichnet. Es war die erste chromosomale Aberration beim Menschen, die direkt mit einer spezifischen malignen Erkrankung, nämlich der CML, in Verbindung gebracht werden konnte. Bei dem Ph-Chromosom handelt es sich um eine verkürzte Variante des Chromosoms 22. Es entsteht durch eine balancierte reziproke Translokation t(9;22) (q34;q11) (Rowley, 1973). Bei diesem Ereignis werden Sequenzabschnitte des *Breakpoint cluster region (Bcr)*-Gens auf dem Chromosom 22 mit Teilen des *Abelson leukemia virus (Abl)*-Gens von Chromosom 9 fusioniert (Bartram *et al.,* 1983; Groffen *et al.,* 1984). Diese Mutation führt zur Bildung des Hybridgens *Bcr-Abl*, das auf dem Ph-Chromosom lokalisiert ist (siehe Abb.1.1). Der verantwortliche Mechanismus für diese illegitime Translokation ist nicht bekannt. Vermutlich ist die physikalische Nähe beider Translokationspartner Voraussetzung für die Mutation.

Das Ph-Chromosom und damit das *Bcr-Abl*-Fusionsgen findet sich bei etwa 95% aller CML-Patienten (Sheperd *et al*., 1995). Die t(9;22) wird daher als Kennzeichen der CML betrachtet. Des Weiteren lässt sich diese Mutation aber auch in 15-30% aller Patienten mit Akuter Lymphatischer Leukämie (ALL) nachweisen und in etwa 2% der Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie (AML) (Kalidas *et al.,* 2001).

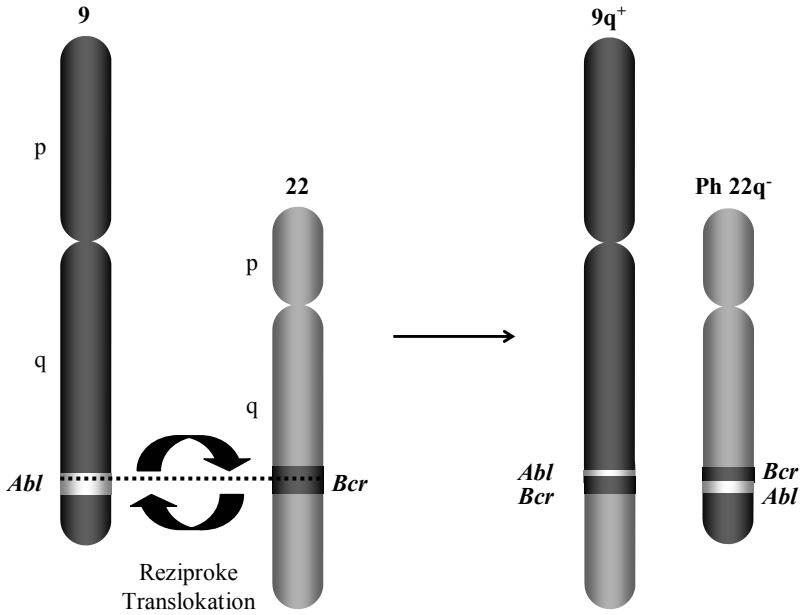


Abb.1.1: Die reziproke Translokation t(9;22) führt zur Entstehung eines verkürzten Chromosoms 22, dem Philadelphia (Ph) Chromosom. Das Ph-Chromosom ist Träger des *Bcr-Abl*-Fusionsgens. Verändert nach Barnes *et al.*, 2002.

4.1.2 Die Bcr-Abl-Tyrosinkinase

Bcr-Abl ist ein humanes Onkogen, das aus der Fusion von Teilen des *Bcr*- und des *Abl*-Gens hervorgeht. Das zelluläre *Abl*-Gen *(c-Abl)* codiert für eine 145 kD große, streng regulierte, freie Tyrosin Kinase (TK) mit vielfältigen und komplexen Funktionen (zur Übersicht: van Etten, 1999). Im Kern spielt c-Abl als Induktor des G1-Zellzyklus Arrest nach genotoxischem Stress eine wichtige Rolle bei der Überwachung des Zellwachstums (Kipreos *et al.,* 1992; Sawyers *et al.,* 1994). Cytoplasmatisches Abl ist dagegen in die Integrin-Signaltransduktion involviert (Lewis *et al.,* 1998). Der zweite Fusionspartner, das *Bcr*-Gen, codiert für ein 160 kD Protein, das vor allem cytoplasmatisch lokalisiert ist. Man nimmt an, dass es sich bei Bcr um ein Signaltransduktions-Protein handelt. Es besitzt mehrere funktionelle Domänen, u.a. eine Serin/Threonin-Kinase-Domäne (zur Übersicht: Laurent *et al.,* 2001). Die genauen Funktionen des Proteins sind jedoch noch nicht aufgeklärt.

Das durch die t(9;22) verursachte Fusionsgen *Bcr-Abl* codiert für eine deregulierte TK. Die Bcr-Abl-TK besitzt eine im Vergleich zu c-Abl 100fach erhöhte Enzymaktivität (Lugo *et al.,*

1990). Das Bcr-Abl-Protein ist vorwiegend cytoplasmatisch lokalisiert. Die konstitutiv aktivierte TK induziert zahlreiche Signal-Transduktionswege, u.a. mitogene Pfade wie den Ras- (Sawyers *et al*., 1995), den MAPK- (Cortez *et al*., 1997), den Jak-STAT- (Shuai *et al*., 1996) und den PI-3K/AKT-Signalweg (Varticovski *et al*., 1991; Skorski *et al*., 1995). Bcr-Abl bewirkt durch Aufhebung der Proliferations-Kontrolle, durch Hemmung des apoptotischen Zelltods und durch Veränderung des Adhäsionsverhaltens die maligne Transformation der betroffenen Zellen (zur Übersicht: Wang *et al.*, 2004).

Die Größe des *Bcr-Abl*-Onkogenprodukts kann 190 kD, 210 kD oder 230 kD betragen, wobei jede dieser drei Bcr-Abl-Proteinvarianten einem bestimmten Krankheitstyp zugeordnet ist. Während $p210^{Bcr\text{-}Abl}$ vor allem Charakteristikum der CML ist, dominiert bei Patienten mit ALL die $p190^{Bcr\text{-}Abl}$-Variante (Faderl *et al.*, 2003). Dabei scheint die kleine $p190^{Bcr\text{-}Abl}$-Variante im Vergleich die stärkste TK-Aktivität aufzuweisen (Sawyers, 1999). Die größte Bcr-Abl-Variante $p230^{Bcr\text{-}Abl}$ ist dagegen weniger verbreitet und wurde teilweise in Zusammenhang mit einem milder verlaufenden leukämischen Krankheitsbild gebracht, der Chronischen Neutrophilen Leukämie (CNL) (Pane *et al.,* 1996).

Es gibt inzwischen zahlreiche Berichte, die dem humanen Onkogen *Bcr-Abl* bei der Pathogenese Ph-positiver-Leukämien eine zentrale Rolle zuweisen. Beispielsweise wurde bislang von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt, dass die Expression von $p190^{Bcr\text{-}Abl}$ oder $p210^{Bcr\text{-}Abl}$ in transgenen Mäusen zur Entstehung einer ALL- oder CML- ähnlichen Erkrankung führt (Heisterkamp *et al.,* 1990; Honda *et al.*, 1998; Salloukh *et al.,* 2000).

4.1.3 *Bcr-Abl*-Transkriptvarianten

Auch wenn das Endprodukt der t(9;22) immer ein onkogenes Bcr-Abl-Protein ist, gibt es, abhängig vom genauen Bruchpunkt innerhalb des *Bcr*- und des *Abl*-Gens Unterschiede in der exakten Zusammensetzung des Proteins und dessen transformierender Eigenschaft. Bei der Fusion von *Bcr* und *Abl* auf dem Ph-Chromosom wird stets das 3‘-Ende von *Bcr* an das 5‘-Ende von *Abl* angefügt. Das entstehende Fusionsgen steht somit unter Kontrolle des *Bcr*-Promotors.

Im Bereich des *Abl*-Gens auf Chromosom 9 kann der Chromosomen-Bruch, der der Translokation vorangeht, innerhalb eines weiten Bereichs von etwa 300 kb erfolgen (zur

Übersicht: Melo, 1997). Unabhängig von der exakten Lokalisation des Bruchpunkts entsteht fast immer ein chimäres mRNA-Molekül bei dem die *Bcr*-Sequenzen direkt an das *Abl*-Exon 2 (a2) angrenzen (siehe Abb.1.2).

Im Gegensatz dazu kann man innerhalb des *Bcr*-Gens drei Bereiche unterscheiden, in denen der Bruch stattfindet. Diese Regionen werden als ‚breakpoint cluster regions' (bcr's) bezeichnet (Groffen *et al.,* 1984). Bei etwa 95% der Patienten mit CML (Shepherd *et al.,* 1995) und ungefähr einem Drittel der Patienten mit Ph^+-ALL erfolgt der Bruch innerhalb eines Bereichs, der die *Bcr-Exons 12-16* (*e12-e16*, frühere Bezeichnung: *b1-b5*) umfasst. Diese Bruchpunkt-Region wird als ‚Major breakpoint cluster region' (M-bcr) bezeichnet. Transkription und alternatives Spleißen führt zur Bildung von 8,5 kb großen Fusionstranskripten mit entweder einer *e13a2*- oder einer *e14a2*-Bruchpunkt-Konfiguration. Beide Transkriptvarianten codieren für das $p210^{Bcr\text{-}Abl}$-Protein. Bei den übrigen zwei Drittel der Patienten mit Ph^+-ALL liegt der Bruchpunkt weiter stromaufwärts innerhalb des ersten Introns von *Bcr*. Dieser Bereich wird als ‚minor breakpoint cluster region' (m-bcr) bezeichnet. Das aus einem Bruch in der m-bcr resultierende Fusionsgen codiert für eine 7 kb große Fusions-mRNA mit der Bruchpunkt-Konfiguration *e1a2*. Diese wird zu einem $p190^{Bcr\text{-}Abl}$-Protein translatiert (Ravandi *et al.,* 1999).

Eine dritte ‚breakpoint cluster region', die sogenannte µ-bcr, befindet sich stromabwärts von *Bcr-Exon 19* (*e19*). Ist die µ-bcr an der Translokation beteiligt, führt die Expression des entstehenden *Bcr-Abl*-Fusionsgens über die Transkription einer *e19a2*-Fusions-mRNA zur Entstehung der $p230^{Bcr\text{-}Abl}$ Protein-Variante.

Alle drei beschriebenen molekularen Formen des chimären Bcr-Abl-Proteins besitzen also identische Abl-C-Termini. Die Unterschiede in der Proteingröße lassen sich daher auf unterschiedlich große Anteile der N-terminalen Bcr-Sequenz zurückführen (siehe Abb.1.2).

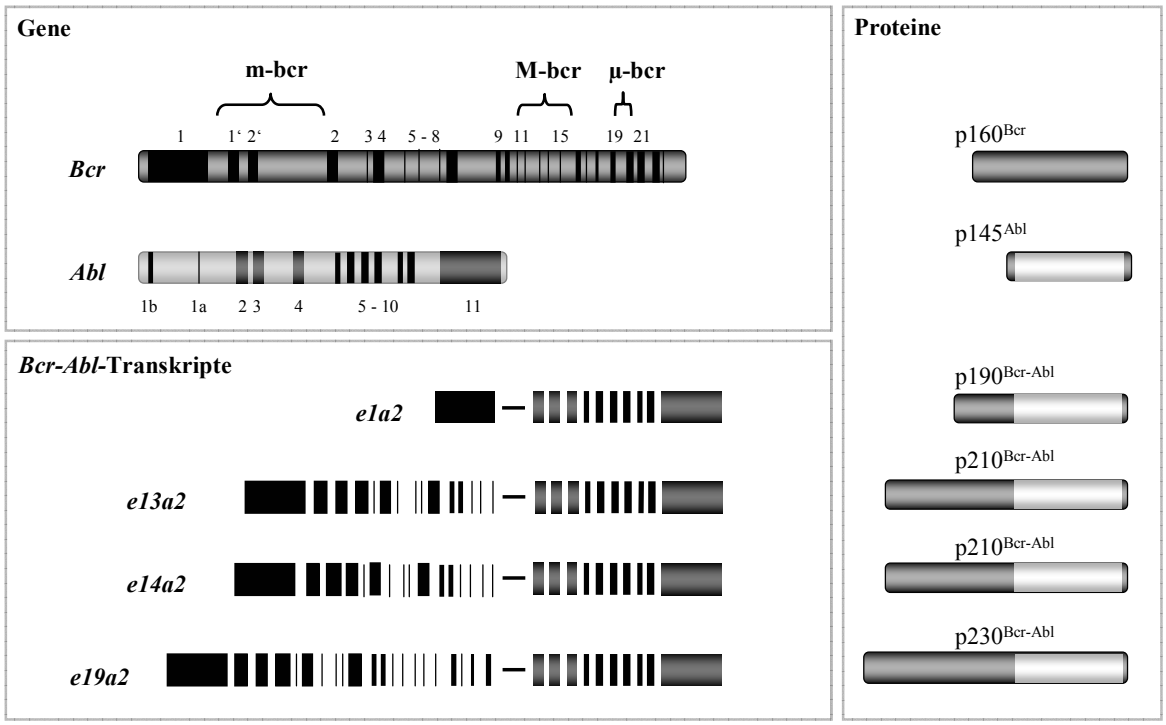


Abb.1.2: Schematische Übersicht über das *Bcr*- und *Abl*-Gen, die *Bcr-Abl*-Transkriptvarianten und die zugehörigen Proteine. Verändert nach Laurent *et al.*, 2001.

4.2 *Bcr-Abl* und Leukämie

4.2.1 Chronisch Myeloische Leukämie

Das Ph-Chromosom und damit Bcr-Abl sind allgemeine Kennzeichen der Chronisch Myeloische Leukämie (CML). Diese Leukämie ist durch eine Fehlfunktion der hämatopoetischen Stammzellen gekennzeichnet, die mit einer starken Expansion der myeloischen Vorläuferzellen verbunden ist. Die Erkrankung macht unter den Leukämien im Erwachsenenalter einen Anteil von etwa 15% aus. Generell können Personen jeden Alters betroffen sein, dennoch tritt die CML vor allem bei älteren Menschen (Lebensalter: ∅ 66) auf. Nach Einsetzen der Symptome beträgt die durchschnittliche Lebenserwartung drei Jahre. Typisch für die CML ist der phasenhafte Krankheitsverlauf. Der Beginn verläuft chronisch. Die Patienten weisen zu diesem Zeitpunkt einen Überschuss myeloischer Zellen im peripheren Blut auf. Diese Zellen besitzen jedoch noch die Fähigkeit zur Differenzierung (zur Übersicht: Pasternak *et al.,* 1998). Das cytogenetische Kennzeichen der CML, *Bcr-Abl*, kann bereits in

der chronischen Phase in den Knochenmarkzellen von nahezu allen Patienten nachgewiesen werden. Nach 3-5 Jahren schreitet die Krankheit dann, teilweise über eine sogenannte ‚beschleunigte Phase', zur tödlichen Blastenkrise fort. Die Blastenkrise ist verbunden mit einem Differenzierungs-Block betroffener Zellen und einer Resistenz gegenüber Chemotherapie. Auffällig während dieses Stadiums ist außerdem die Anhäufung zusätzlicher genetischer Schädigungen wie chromosomaler Translokationen und Deletionen (Ahuja *et al.,* 1989; Griesshammer *et al.,* 1997).
Eine Heilung der CML ist derzeit nur durch eine allogenetische Knochenmark-Transplantation möglich. Diese ist jedoch mit einer hohen Sterblichkeitsrate verbunden. Außerdem kommen auf Grund des oft hohen Alters der betroffenen Patienten und des Fehlens passender Spender nur etwa 30% aller CML-Patienten für eine Transplantation in Frage.

4.2.2 Akute Lymphatische Leukämie

Der Begriff ‚Akute Lymphatische Leukämie' (ALL) beschreibt eine heterogene Erkrankungsgruppe. Betroffen sind von dieser Erkrankung vor allem sehr junge Menschen (2-4 Jahre) und außerdem ältere Personen (> 50 Jahre). Unter den pädiatrischen akuten Leukämien macht die ALL mit 25% den Hauptanteil aus. Bei den akuten Leukämien der Erwachsenen dagegen dominieren andere Krankheitsbilder, die ALL stellt hier nur einen Anteil von 20% (Greenlee *et al.,* 2001; Cortes *et al.,* 1995).
Kennzeichen der ALL sind eine maligne Proliferation der lymphatischen Zellen und eine Anreicherung dieser entarteten Zellen in Knochenmark, Blut und dem lymphatischen System. Ein weiteres Charakteristikum dieser Leukämie ist das Auftreten eines abnormalen Karyotyps. Die möglichen Veränderungen umfassen dabei Polyploidie ebenso wie Chromosomen-Mutationen (Translokationen, Inversionen oder Deletionen). 20% der erwachsenen ALL-Patienten sind Träger des Ph-Chromosoms. Damit stellt diese Translokation t(9;22) die häufigste karyotypische Veränderung der adulten ALL dar. Bei den Kindern hingegen findet sie sich nur in etwa 5% der Fälle (zur Übersicht: Kurzrock *et al.*, 2003). Im Gegensatz zur CML, bei der nahezu ausschließlich die $p210^{Bcr\text{-}Abl}$-Proteinvariante auftritt, dominiert bei der Ph^{+}-ALL insgesamt die kleinere $p190^{Bcr\text{-}Abl}$-Variante.
Man kann heute mit Hilfe von Chemotherapie oder Transplantation von Stammzellen etwa 80% der Kinder mit ALL heilen, dagegen erreichen nur etwa 30-40% der Erwachsenen ein sogenanntes Stadium des ‚leukämiefreien langfristigen Überlebens' (‚disease-free survival' (DFS)) (zur Übersicht: Faderl *et al.*, 2003). Das Vorliegen des Ph-Chromosoms wirkt sich

grundsätzlich negativ auf die Prognose aus (Westbrook *et al.*, 1992). So erreichen weniger als 10% der Patienten mit Ph^+-ALL ein dauerhaftes DFS-Stadium (Goekbuget *et al.,* 2001).

4.2.3 Die Bcr-Abl-TK als therapeutischer Angriffspunkt

Die Entstehung von Bcr-Abl wird allgemein als ursächliches Ereignis für die Entwicklung der CML angesehen. Tatsächlich kann die Überexpression von rekombinantem *Bcr-Abl* in Tier-Modellen eine CML-ähnliche Erkrankung hervorrufen (Daley *et al.,* 1990; Kelliher *et al.*, 1990; Pear *et al.,* 1998) und in Zellkultur-Systemen eine Unabhängigkeit von externen Wachstumsfaktoren vermitteln (Sirard *et al.,* 1994; Berman *et al.,* 2000). Man hat außerdem festgestellt, dass das transformierende Potential von $p210^{Bcr\text{-}Abl}$ abhängig ist von der TK-Aktivität (Pendergast *et al.,* 1993). Die TK-Aktivität von Bcr-Abl stellt also einen legitimen Angriffspunkt für eine pharmakologische Inhibiton dar.

4.2.4 Imatinib mesylate

Seit Mai 2001 ist ein von Novartis (Basel, Schweiz) entwickelter Inhibitor der Bcr-Abl-TK von der amerikanischen ‚Food and Drug Administration' (FDA) zur Therapie Bcr-Abl-positiver Leukämien zugelassen: Imatinib mesylate (STI571, Glivec®, Gleevec™). Es handelt sich hierbei um ein 2-Phenylaminopyrimidin-Derivat, das als spezifischer Inhibitor von vier bekannten Protein-TK fungiert. Außer der Abl-TK werden auch ARG, cKIT und die PDGF-Rezeptor-TK mit der gleichen Wirkung gehemmt (zur Übersicht: Cowan-Jacob *et al.*, 2004). Imatinib mesylate bindet Bcr-Abl im Bereich der ATP-Binde Domäne und stabilisiert das Onkoprotein in seiner inaktiven Form. In dieser inaktiven Konformation kann es ATP nicht binden, wodurch die Phosphorylierung von Substraten verhindert wird (Schindler *et al.,* 2001, Gambacorti-Passerini *et al.,* 2003, Nagar *et al.,* 2002).
Die therapeutische Anwendung von Imatinib hat beachtliche Erfolge sowohl bei Patienten mit CML in chronischer und akuter Phase als auch bei Patienten mit Ph^+-ALL erzielt (Druker *et al.,* 2001-A/B). Zusammenfassend zeigen die klinischen und molekularen Daten, dass durch die alleinige Behandlung mit Imatinib sehr viel häufiger ein Stadium der ‚kompletten cyto-genetischen Remission', also ein vollständiger Rückgang Ph^+-Zellen, erzielt wird als durch jeden anderen Therapieansatz (abgesehen von der allogenetischen Transplantation; Branford *et al.,* 2001, Goldman, 2004). Dennoch kann man beobachten, dass die Imatinib-Wirkung bei

Patienten mit CML in der Blastenkrise oder mit Ph^+-ALL nur von kurzer Dauer ist. Häufig werden diese Patienten trotz fortgesetzter Einnahme rückfällig (Druker *et al*., 2001-B; Sawyers *et al*. 2002; Talpaz *et al*., 2002; Kantarjian *et al*., 2002-A/B).
Es ist überdies auch noch unklar, inwieweit die Wirkung von Imatinib mesylate bei Patienten mit CML in der chronischen Phase anhaltend ist. Man weiß, dass das *Bcr-Abl*-Transkript auch noch bei Patienten nachweisbar ist, die sich in einem Stadium ‚kompletter cytogenetischer Remission' befinden. Eine so genannte ‚molekulare Response', also das Absinken der *Bcr-Abl*-Transkriptmenge unter die molekulare Nachweisgrenze, ist sehr selten (Branford *et al.,* 2001, Hughes *et al.*, 2002). Zwar ist die Anzahl von Rückfällen bei Patienten mit chronischer Phase-Erkrankung gering, aber es gibt noch wenige Langzeit-Studien.
Auch die Gefahr unerwünschter Nebenwirkungen durch die zusätzliche Hemmung der zellulären TK c-Abl, ARG, c-KIT und PDGF-Rezeptor bei einer Langzeit-Imatinib-Therapie ist bislang nicht geklärt.

4.2.5 Ursachen der Imatinib-Resistenz

Man kennt mehrere Faktoren, die eine Resistenz gegenüber dem TK-Inhibitor Imatinib mesylate verursachen können. In Zellkultur-Experimenten führte beispielsweise eine Amplifikation oder Überexpression von *Bcr-Abl* zu einer verringerten Sensitivität gegenüber dem Inhibitor (Le Coultre *et al.,* 2000). Es gibt außerdem Hinweise, dass auch eine verstärkte Produktion des Transporterproteins p-Glykoprotein (Pgp) (Illmer *et al.,* 2004) oder die Bindung von Imatinib an das saure α1-Glykoprotein zu einer Imatinib-Resistenz beitragen können, indem sie die Verfügbarkeit des Inhibitors reduzieren (Gambacorti-Passerini *et al.,* 2002; Jorgensen *et al*., 2002).
Untersuchungen von Leukämie-Patienten mit primärer und erworbener Imatinib-Resistenz zeigen, dass der Wirkungsverlust sowohl Bcr-Abl-abhängig entstehen kann, z.B. durch *Bcr-Abl*-Überexpression, *Bcr-Abl*-Amplifikation oder klonale Selektion von Blasten mit Veränderungen in der Bcr-Abl-TK-Domäne, aber auch Bcr-Abl-unabhängig wie beispielsweise durch zytogenetische oder molekulare Zusatzaberrationen (Barthe *et al.*, 2001; Gorre *et al.*, 2001; Hochhaus *et al.*, 2001; Kreil *et al.*, 2001).
Als Hauptursache für die erworbene Imatinib-Resistenz von Patienten mit Ph^+-Leukämie haben sich aber die *Bcr-Abl*-Amplifikation (Gorre *et al.,* 2001; Hochhaus *et al.,* 2001) und vor allem Punktmutationen im *Bcr-Abl*-Gen herauskristallisiert (zur Übersicht: Rothberg, 2003). Die Resistenz-vermittelnden Punktmutationen sind mit einem Aminosäure-Austausch verbun-

den und beeinträchtigen dadurch die Bindungsaffinität von Imatinib an die ATP-BD von Bcr-Abl. Bislang sind bereits gut 30 unterschiedliche Mutationen durch Sequenzierung von Blut- oder Knochenmarkproben aus Leukämie-Patienten entdeckt worden, die als Verursacher für eine Imatinib-Resistenz in Frage kommen (zur Übersicht: Cowan-Jacob *et al*., 2004). Dabei ist das Ausmaß der vermittelten Resistenz abhängig von der genauen Lokalisation der Mutation (Corbin *et al.,* 2003, Shah *et al.* 2002).
Aufgrund dieser Erkenntnisse ist es derzeit trotz der unbestrittenen Effizienz des Bcr-Abl-Inhibitors Imatinib mesylate von großem klinischem Interesse, zusätzliche alternative Therapie-Ansätze zu entwickeln, mit deren Hilfe man dem Problem auftretender Resistenzen begegnen kann.

4.3 RNA-Interferenz

‚RNA-Interferenz' (RNAi) beschreibt einen durch doppelsträngige RNA (dsRNA) ausgelösten hoch konservierten Mechanismus zur sequenzspezifischen Stilllegung von Genen. Man geht davon aus, dass die RNAi einen Prozess zum Schutz des Genoms vor der Invasion mobiler genetischer Elemente wie z.B. viraler Nukleinsäuren, Transposons oder Transgene darstellt (Waterhouse *et al.,* 2001, Tabara *et al.,* 1999, Montgomery *et al.,* 1998). Der Begriff der ‚RNAi' wurde erstmals in einer bahnbrechenden Arbeit 1998 von Andrew Fire und Craig Mellow am Modell von *Caenorhabditis elegans* geprägt. Die Arbeitsgruppe konnte damals zeigen, dass eine zu einer endogenen mRNA homologe dsRNA, die in eine Zelle eingebracht wird, zum Abbau der entsprechenden mRNA und damit zur sequenzspezifischen Stilllegung des Gens führt. Mittlerweile wurde dieses Ereignis bei zahlreichen weiteren Organismen, von Trypanosomen bis hin zur Maus reproduziert.
Aktuelle Berichte zeigen, dass die RNAi nicht nur posttrankriptionell auf RNA-Ebene, sondern zumindest bei einigen Organismen auch transkriptionell, also über die DNA-Ebene, auf die Genexpression Einfluss nimmt (zur Übersicht: Nelson *et al.,* 2003). Derzeit betrachtet man die RNAi als Teil eines übergeordneten ‚RNA silencing'-Prozesses, dem eine fundamentale Rolle bei der zellulären Genregulation zugewiesen wird. Hauptakteure sind dabei 21-28 nt lange RNA Spezies, so genannte ‚microRNAs' (miRNA), die über eine mRNA-Degradation, Translations-Inhibition und eine Chromatin-Modifikation auf die Genexpression regulierend einwirken können.

4.3.1 Mechanismus der RNAi

Der Mechanismus der RNAi ist inzwischen teilweise aufgeklärt. Als Schlüsselenzym wurde die so genannte ‚Dicer RNase III' identifiziert (siehe Abb.1.3). Diese Nuklease spaltet cytoplasmatische, doppelsträngige RNA (dsRNA) in 21-23 nt lange dsRNA-Fragmente (zur Übersicht: McManus *et al.,* 2002), welche die eigentlichen Effektoren der RNAi darstellen. Sie werden als ‚short interfering RNAs' (siRNA) bezeichnet. Eine anschließende Phosphorylierung der 5'-Enden der siRNA-Duplex führt zur Aufnahme dieser in den ‚RNA induced silencing complex' (RISC). Der RISC ist ein Protein-Nuklease Komplex, der mit Hilfe des as-Strangs der siRNA über komplementäre Basenpaarung an die korrespondierende mRNA-Sequenz herangeführt wird. Die Spaltung der Ziel-mRNA erfolgt endonukleolytisch in der Mitte des von der siRNA überspannten Sequenzabschnitts.

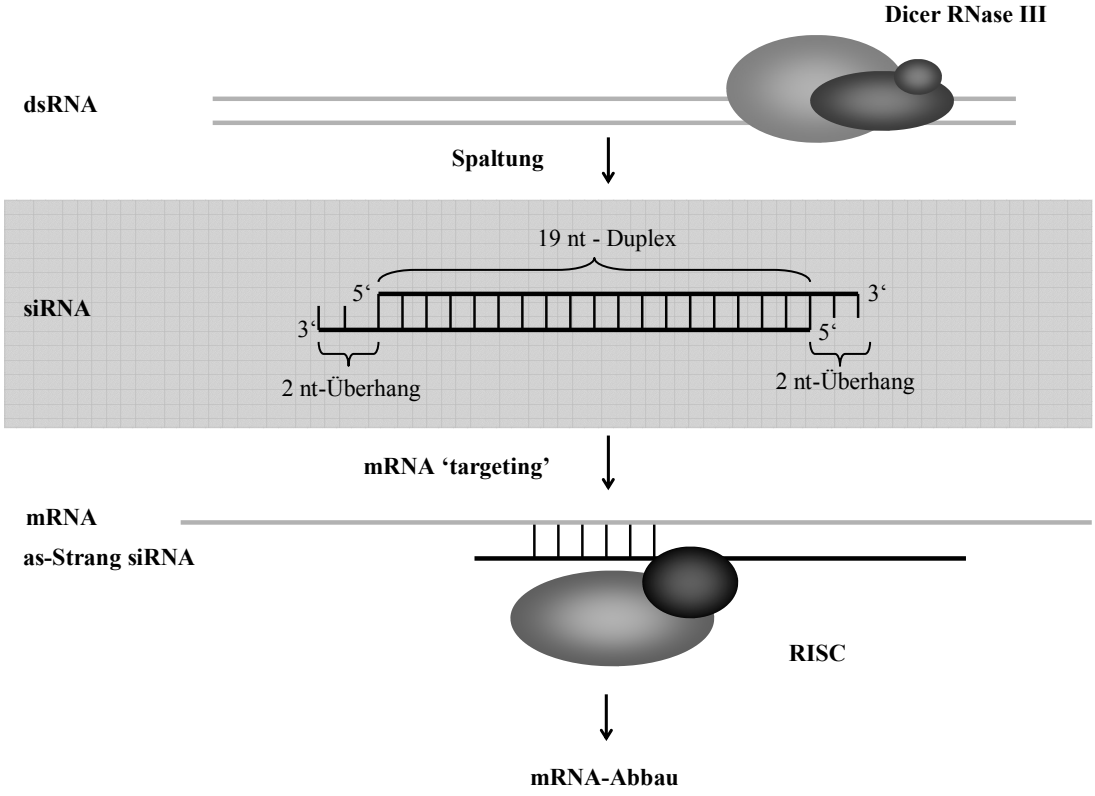


Abb.1.3: Modell für die RNA-Interferenz in Säugerzellen. Verändert nach McManus *et al.*, 2002.

4.3.2 Anwendung der RNAi

Seit ihrer Entdeckung wird die RNAi im Forschungslabor routinemäßig zur gezielten Inaktivierung von Genen verwendet. Dabei zeigen zahlreiche Berichte, dass die RNAi in ihrer Effektivität konventionellen Antisense-Techniken überlegen ist (Caplen *et al.,* 2001, Fire *et al.,* 1998). Dennoch war die experimentelle Nutzung dieser Methode bei Säugerzellen zunächst nicht möglich, da lange dsRNA (> 30 bp) im Cytoplasma von Säugerzellen verschiedene antivirale Signalwege aktiviert, die zum Absterben der Zelle führen (Stark *et al.,* 1998; Gil *et al.,* 2000). Thomas Tuschls Arbeitsgruppe fand jedoch heraus, dass diese Abwehrreaktion durch die direkte Transfektion synthetischer 21 nt-langer siRNAs umgangen, und so eine hoch selektive und sequenzspezifische Gen-Inaktivierung erzielt werden kann (Elbashir *et al.,* 2001). Nach dem Nachweis der RNAi in humanen Zellen und der Etablierung der RNAi als Technik zur gezielten Stilllegung von humanen Genen *in vitro* folgten wenig später erste Berichte von der Anwendung der RNAi im Maus-Modell (McCaffrey *et al.,* 2002; Lewis *et al.,* 2002). Durch Übertragung sequenzhomologer siRNA über eine hydrodynamische Injektion in die Schwanzvene von Mäusen konnte die Expression von Reportergenen gehemmt werden. 2003 gelang es dann Song *et al.* erstmals, durch Infusion von siRNAs in ein Tier, eine Erkrankung zu bekämpfen. Mäuse, die mit siRNA gegen den Fas-Todesrezeptor behandelt wurden, konnten nach experimentell induzierter ‚Akuter Leberschädigung' (‚acute liver failure' (ALF)) ihre Leberfunktion wiedererlangen.
Diese Ergebnisse wecken nun die Hoffnung, dass die RNAi auch Anwendung in der humanen Gentherapie finden könnte.

4.4 Ziele der Arbeit

- Etablieren eines *in vitro*-Versuchsprotokolls zur selektiven Hemmung der Expression des humanen Onkogens *Bcr-Abl-e14a2* durch direkte Übertragung synthetischer siRNA-Moleküle in hämatopoetischen humanen und murinen Zelllinien.
- Untersuchung des Effekts der *Bcr-Abl*-RNAi auf den leukämischen Phänotyp der behandelten Zellen.
- Charakterisierung der Spezifität und Kinetik der erzielten Gen-Inaktivierung am Beispiel eines Versuchssystems (32Dp210/e14a2).
- Evaluierung effizienter Zielsequenzen für die Hemmung der übrigen für das Krankheitsbild der Leukämie bedeutenden *Bcr-Abl*-Transkriptvarianten (*Bcr-Abl-e1a2,-e13a2*)
- Beantwortung der Frage, ob eine Hemmung der *Bcr-Abl*-Expression therapieresistente Zellen gegenüber Therapeutika wie Imatinib mesylate resensitivieren kann.
- Übertragung des in Zelllinien etablierten RNAi-Protokolls auf humane leukämische Zellen.
- Untersuchung von verschiedenen stabilisierenden siRNA-Modifikationen im Hinblick auf die Effizienz und Persistenz der erzielten Gen-Stilllegung.
- Überprüfung der Möglichkeit, durch stabile Expression spezifischer ‚short hairpin RNAs' (shRNAs) eine dauerhafte *Bcr-Abl*-Inaktivierung in humanen leukämischen Zellen zu erreichen.

5. Material und Methoden

5.1 Zellkultur

5.1.1 Kulturmedium und Zusätze

Für die Kultivierung sämtlicher Zellen wurde in dieser Arbeit RPMI 1640 Medium mit den unten aufgeführten Supplementen verwendet.

RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin
500 ml wurden supplementiert mit:	
10%-20% (v/v) FCS (‚Foetal Bovine Serum')	Gibco, Karlsruhe
0,1 g/l Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
10 mM HEPES (2-(4-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethanolsulfonsäure), pH 7,4	Merck, Darmstadt
2 mM L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin
0,13 mM L-Asparagin	Serva, Heidelberg
0,05 mM β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
1 mM Natriumpyruvat	Gibco, Karlsruhe
3 ml 100 x nicht-essentielle Aminosäuren	Biochrom AG, Berlin

Der Zusatz von Zytokinen zum Kulturmedium erfolgte generell bei der Kultivierung von Primärzellen (siehe 5.2.3) und der Kultivierung der *Bcr-Abl*-negativen murinen Zelllinie 32D (mIL-3, 1 ng/ml).

Außerdem wurden Wachstumsfaktoren bei Versuchsansätzen zur *Bcr-Abl*-RNAi (siehe 5.7.1) eingesetzt.

Verwendete Zytokine	
Recombinant Murine Interleukin-3 (mIL-3)	Strathmann Biotech AG, Hannover
Humanes GM-CSF (‚Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor'), LEUCOMAX® 150	Novartis Pharma GmbH, Nürnberg
Humanes G-CSF	Roche, Mannheim

(‚Granulocyte Colony Stimulating Factor'), Neupogen	
Humanes Interleukin-3	Novartis Pharma GmbH, Nürnberg
FLT3-Ligand	RDI Research Diagnostics, Inc., USA

5.1.2 Beschreibung der verwendeten Zelllinien

Tabelle 5.1: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien

Name	**Beschreibung, Herkunft**	***Bcr-Abl*-Status**
32D	murines Knochenmark; DSMZ-Nr.: ACC 411	-
32Dp210-wt bzw. 32Dp210/e14a2	durch Transfektion von 32D-Zellen mit dem retroviralen Vektor Migp210-wt[a] hergestellt	+ *(e14a2)*
32Dp210-T315I	durch Transfektion von 32D-Zellen mit dem retroviralen Vektor Migp210-T315I[a] hergestellt	+ *(e14a2)*
32Dp210-H396P	durch Transfektion von 32D-Zellen mit dem retroviralen Vektor Migp210-H396P[a] hergestellt	+ *(e14a2)*
32Dp210/e13a2	durch Transfektion von 32D-Zellen mit dem retroviralen Vektor pSRαMSVtkneo-p210/e13a2[b] hergestellt	+ *(e13a2)*
32Dp190/e1a2	durch Transfektion von 32D-Zellen mit dem retroviralen Vektor pSRαMSVtkneo-p190/e1a2[d] hergestellt	+ *(e1a2)*
M07p210/e14a2	durch Elektroporation von M07-Zellen (humane megakaryozytäre Leukämiezellen) mit pGD210 (Daley *et al.*,1990)[c] hergestellt	+ *(e14a2)*
K562	humane CML-Blasten, DSMZ-Nr.: ACC 10	Ph^+ *(e14a2)*
MEG-01	humane CML-Blasten (megakaryozytär), DSMZ-Nr.: ACC 364	Ph^+ *(e13a2)*

[a] Dr. J. Duyster, Technische Universität München (siehe 5.3.1)

[b] B. J. Druker, M.D, Howard Hughes Medical Institute, Portland, USA (siehe 5.3.1)

[c] Dr. M. Hallek, Klinikum Innenstadt, München

[d] Dr. T. Skorski, Temple University, Philadelphia, USA

5.1.3 Kultivierung der Zellen

Die Anzucht der Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen bei 37°C, einer wassergesättigten Atmosphäre von Luft und 5% CO_2. Alle Arbeiten mit den Zellkulturen wurden an einer sterilen Werkbank, unter Verwendung steriler Gerätschaften durchgeführt.
Alle 2-3 Tage wurden die verwendeten Zelllinien subkultiviert. Die semi-adhärenten Zellen (MEG-01) mussten für die Subkultivierung zunächst mittels Trypsin/EDTA von der Kultur-Flasche abgelöst werden.

Sterile Werkbank	Heraeus, Hanau
25-, 75-, 150 cm^2 Zellkultur-Flaschen	Corning, USA
25-, 10-, 5 ml Stripette®-Costar®	Corning, USA
Gewebekulturplatte 6-, 24-, 96-well	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
50 ml Polypropylen Röhrchen, konisch; BLUE MAX™; FALCON	Becton Dickinson, USA
15 ml Polypropylen Röhrchen, steril	Greiner bio-one, Frickenhausen
CO_2-Inkubator	Heraeus, Hanau
Trypsin/EDTA	Gibco, Karlsruhe

5.1.4 Trypan-Blau Ausschluss-Färbung

Zur Bestimmung der Zellzahl und Viabilität der Zellen wurden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl einer Trypan-Blau-Färbelösung (Trypan-Blau 1:10 in PBS) vermischt. Trypan-Blau ist ein Vitalfarbstoff, der über aktiven Transport aus dem Zellinneren lebender Zellen ausgeschlossen wird und daher nur tote Zellen anfärbt. Ein Aliquot dieser Mischung wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Zahl der ungefärbten Zellen wurde dann zur Bestimmung der Vital-Konzentration herangezogen (siehe Abb.5.1).

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{Anzahl der ausgezählten Großquadrate}} \times \text{Verdünnung} \times 10^4 = \frac{\textbf{Zellzahl}}{\textbf{ml}}$$

Abb.5.1: Formel zur Ermittlung der Zellkonzentration mit Hilfe eines Neubauer-Hämatocytometers.

Trypan Blau 0,5% (w/v)	Biochrom AG, Berlin
Neubauer-Zählkammer	Roth, Karlsruhe
Mikroskop	Zeiss, Jena

5.1.5 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Die verwendeten Zellkulturen wurden durchschnittlich zwei Monate in Kultur gehalten, und dann durch zu Beginn der Kultur eingelagerte Zellen ersetzt. Die Konservierung erfolgte bei -196°C in flüssigem Stickstoff. Um die Vitalität der Zellen nach dem Einfriervorgang zu erhalten, wurden diese für die Lagerung in einer Konzentration von 1-5 x 10^6 /ml in einer eiskalten Lösung aus DMSO:FCS (1:10) aufgenommen und sofort in Kryo-Röhrchen überführt. Eine spezielle Einfrierbox gewährleistete eine graduelle Abkühlung auf -80°C über Nacht. Im Anschluss wurden die Kryo-Röhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert.
Das Zurückführen konservierter Zellen in Kultur gelang durch zügiges Auftauen im Wasserbad bei 37°C und sofortiges Überführen der angetauten Suspension in 15 ml RPMI 1640 Medium. Direkt im Anschluss wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 300 g) pelletiert, und in frischem Medium aufgenommen. Die Zellen wurden über Nacht im CO_2-Inkubator kultiviert und am darauf folgenden Tag noch einmal mit frischem Medium versorgt.

Dimethyl Sulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen
1,8 ml CryoTube™	Nalgene Nunc International
5100 Cryo 1°C Einfrierbox ‚Mr. Frosty'	Nalgene Nunc International

5.1.6 Bestimmung der Zellvitalität über eine MTT-Analyse

Die Vitalität der Zellen kann über den MTT-Assay bestimmt werden (Mosmann, 1983; Hansen *et al*., 1989). Dabei wird durch eine, in den Mitochondrien stoffwechselaktiver also vitaler Zellen vorkommende Dehydrogenase das Tetrazoliumsalz MTT zu einem violetten Formazan-Produkt (1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl-) 3,5-diphenylformazan) reduziert. Für diesen Assay wurden die Zellen in einer 96-well Platte kultiviert, pro well wurden 10 µl einer MTT-Gebrauchslösung (10 mg/ml MTT in PBS) zugegeben und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Dann wurden je 90 µl eines MTT-Lysepuffers (15% SDS in DMF-Wasser (1:1) gelöst; pH 4,5 mit HCl) zugegeben, und die 96well-Platte mindestens über Nacht bei

Raumtemperatur unter Lichtabschluss geschüttelt. Die Färbung wurde dann photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm quantifiziert.
Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Statistik Programms ‚GraphPad Prism 3.0'.

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid))	Sigma, Taufkirchen
ELISA-Reader ‚Wallac'	SLT Labinstruments, Crailsheim
GraphPad Prism 3.0 Software	GraphPad Software, USA

5.2. Kultur von primärem Zellmaterial

5.2.1 Isolation mononukleärer Zellen über Ficoll-Dichtegradienten Zentrifugation

Frisch aus Patienten entnommene Knochenmark- oder Blut-Proben wurde zunächst mit sterilem PBS verdünnt. In ein 50 ml Polypropylene Röhrchen (FALCON) wurden 25 ml Ficoll-Separierlösung vorgelegt und mit dem entsprechenden Volumen der verdünnten Zellsuspension vorsichtig überschichtet. Die Trennung der mononukleären Zellen (MNC) von den roten Blutzellen und den polynukleären Zellen mit einer Dichte von > 1,077 g/cm^3 gelang durch 25minütige Zentrifugation bei 300 g (RT, ohne Bremse). Die MNC sammeln sich als Interphase direkt über der Ficoll-Schicht an. Diese Interphase wurde abgenommen, in ein frisches 50 ml Polypropylene Röhrchen überführt und erneut mit PBS verdünnt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (10 min, 300 g). Die Zellen wurden nun gezählt und konnten dann für weitere Anwendungen herangezogen werden.

‚BIOCOLL Separating Solution' (Ficoll)	Biochrom AG, Berlin
50 ml Polypropylen Röhrchen, konisch; BLUE MAX^{TM}; FALCON	Becton Dickinson, USA
Rottana/S Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen
PBS (0,27M NaCl, 0,005 M KCl, 0,015 M Na_2HPO_4 x H_2O, 0,003 M KH_2PO_4)	Biochrom AG, Berlin

5.2.2 Isolation hämatopoetischer CD34-exprimierender MNC

Die Isolation von CD34-exprimierender ($CD34^+$)-Zellen aus aufgereinigten MNC schloss sich direkt an die Ficoll-Dichtegradienten Zentrifugation an. Verwendet wurde hierzu der ‚MACS-Cell Isolation Kit'. Das System beruht auf einer positiven Selektion $CD34^+$- Zellen. Diese werden über einen Hapten-konjugierten Primärantikörper und einen mit ‚Micro-Beats' gekoppelten Anti-Hapten Antikörper indirekt magnetisch markiert, und können dadurch über ein magnetisches Feld von den übrigen Zellen getrennt werden. Die Separation wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

‚MACS CD34 Progenitor Cell Isolation Kit'	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
‚Magnetic Cell Separator VarioMACS'	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
‚MACS positive selection columns'	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

5.2.3 Kultivierung von primärem Zellmaterial

Die aus Patientenmaterial isolierten hämatopoetischen $CD34^+$-MNC wurden in einer Dichte von 0,5 x 10^6 /ml in RPMI 1640 Medium (20% FCS), unter Zugabe von IL-3 (10 ng/ml), G-CSF (20 ng/ml) und FLT3 (100 ng/ml) kultiviert.

5.3 Stabile Übertragung des humanen Onkogens *Bcr-Abl* in 32D-Zellen

Die Etablierung der stabil *Bcr-Abl*-exprimierenden Zelllinien 32Dp210/e14a2-wt/T315I/H396P, 32Dp210/e13a2 und 32Dp190/e1a2 gelang durch Elektroporation der parentalen, *Bcr-Abl*-negativen 32D-Zellen mit den jeweiligen *Bcr-Abl*-Expressionsvektoren: Migp210-wt/T315I/H396P (Pear *et al.*, 1998; von Bubnoff *et al.*, 2002), pSRαMSVtkneo-p210/e13a2 (Muller *et al.*, 1991), pSRαMSVtkneo-p190/e1a2. Hierzu wurden je 5 x 10^6 Zellen in 400-800 µl Medium (RPMI 1640 + 25% FCS) in einer 4 mm Elektroporationsküvette mit 20 µg des entsprechenden Plasmids vermischt. Es folgte eine Elektroporation von 2 x 0,005 Sekunden mit 400 V. Nach zwei Tagen Kultur unter nicht selektiven Bedingungen (RPMI 1640 + 10% FCS + mIL-3 (1 ng/ml)) wurde der Wachstumsfaktor mIL-3 durch wiederholtes Waschen entzogen. Die Zellen wurden nun ohne mIL-3-Zusatz weiterkultiviert. Die Ex-

pression von *Bcr-Abl* ermöglicht den Zellen die Proliferation unabhängig vom Vorhandensein von Zytokinen. Die überlebenden, weiterhin teilungsfähigen Zellen wurden über eine Western-Blot-Analyse des Bcr-Abl-Proteinspiegels charakterisiert.

‚EasyJect' Elektroporator	Peqlab, Erlangen
4 mm-Elektroporationsküvette	Peqlab, Erlangen

5.3.1 Verwendete *Bcr-Abl*-Expressionsvektoren

Migp210- wt/T315I/H396P

Der in dieser Arbeit verwendete *Bcr-Abl*-Expressionsvektor Migp210-wt (Pear *et al*., 1998) sowie die beiden Varianten Migp210-T315I/H396P (von Bubnoff *et al*., 2002) wurden unserem Labor von Dr. J. Duyster (Technische Universität München) zur Verfügung gestellt.
Es handelt sich um einen retroviralen Expressionsvektor (siehe Abb.5.2). Dieser trägt eingebettet zwischen zwei viralen ‚long terminal repeat' (LTR)-Sequenzen das humane *Bcr-Abl-e14a2*-Onkogen, das für die 210 kD-Variante des Bcr-Abl-Proteins codiert. Zusätzlich zum humanen *Bcr-Abl*-Gen enthält der Vektor ein *‚enhanced green fluorescent protein'* (*eGfp)*-Reportergen. Beide Gene bilden eine Transkriptionseinheit. Das heißt, *Bcr-Abl* und *eGfp* werden ausgehend von retroviralen Promotorsequenzen in der 5'-LTR Region über eine gemeinsame mRNA transkribiert. Die Translation erfolgt dagegen getrennt. Die Translation von *Bcr-Abl* wird von der 5'-Cap Struktur der mRNA aus eingeleitet, während für das *eGfp* eine ‚internal ribosomal entry site'-Sequenz (IRES) als ribosomale Eintrittsstelle dient. Die Expression beider Gene resultiert also in der Bildung zweier unabhängiger Proteine.
Die Vektorvarianten Migp210-T315I/H396P entsprechen dem oben beschriebenen Ausgangsvektor, enthalten aber je eine Punktmutation, die mit dem Austausch einer Aminosäure im Bereich der Bcr-Abl-Tyrosin-Kinasedomäne verbunden ist (siehe Tabelle 5.2). Die mutierten *Bcr-Abl*-Sequenzen wurden aus Leukämie-Patienten mit erworbener Resistenz gegen den Bcr-Abl-Kinase-Inhibitor ‚Imatinib mesylate' subkloniert (von Bubnoff *et al*., 2002).

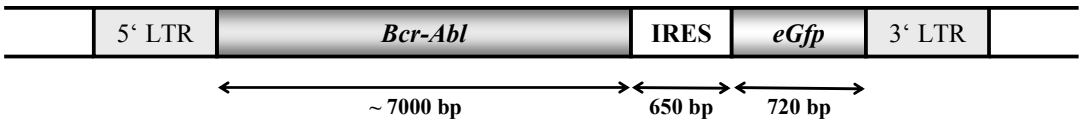


Abb.5.2: schematische Darstellung der im Vektor Migp210 enthaltenen eukaryontischen Expressionskassette. LTR = ‚long terminal repeat‘, IRES = ‚internal ribosomal entry site‘.

Tabelle 5.2: Übersicht über die Punktmutationen im *Bcr-Abl*-Gen der *Bcr-Abl*-Expressionsvektoren Migp210-T315I/H396P (von Bubnoff *et al.*, 2002)

Migp210 -	Punktmutation	Aminosäureaustausch
T315I	1091 C ⇒ T	Threonin 315 ⇒ Isoleucin
H396P	1334 A ⇒ C	Histidin 396 ⇒ Prolin

pSRαMSVtkneo-p210/e13a2

Der Vektor pSRαMSVtkneo-p210/e13a2 (Muller *et al.*, 1991) wurde unserer Arbeitsgruppe von B. J. Druker, M.D. (Howard Hughes Medical Institute, USA) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um ein retrovirales *Bcr-Abl*-Expressionsplasmid. Das Plasmid trägt eingebettet zwischen zwei LTR-Sequenzen das *Bcr-Abl* Fusionsgen *e13a2*. Dieses codiert für die 210 kD Form des Bcr-Abl-Proteins.

pSRαMSVtkneo-p190/e1a2

Der Vektor pSRαMSVtkneo-p190/e1a2 (Muller *et al.*, 1991) wurde unserer Arbeitsgruppe von T. Skorski, M.D, Ph.D, D.Sc. (Temple University, Philadelphia, USA) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um ein retrovirales *Bcr-Abl*-Expressionsplasmid. Das Plasmid trägt eingebettet zwischen zwei LTR-Sequenzen das *Bcr-Abl*-Fusionsgen *e1a2*. Dieses codiert für die 190 kD Form des Bcr-Abl-Proteins.

5.4 Durchflusszytometrische Untersuchung der Zellen

Das in dieser Arbeit verwendete Durchflusszytometer kann 5 optische Parameter gleichzeitig messen: Vorwärtsstreulicht (FSC), Seitwärtsstreulicht (SSC) und drei verschiedene Fluoreszenzspektralbereiche.

Fluorescense Activated Cell Analyzer ‚FACScan'	Becton Dickinson, USA
Laser:	
15 mW, 488 nm, luftgekühlter Argon-Ionen Laser	
Detektoren/Filter:	
530 nm (FITC)	
585 nm (PE/PI)	
650 nm (rote Fluoreszenz)	
CELLQuest™ Software	Becton Dickinson, USA

5.4.1 Nachweis beginnender Apoptose über Annexin V-Färbung

Zellen im frühen Stadium der Apoptose weisen bereits charakteristische Veränderungen der Zellmembran auf. Unter anderem kommt es zur Exposition des Membranphospholipids Phosphatidylserin an der Zelloberfläche. Diese Eigenschaft apoptotischer Zellen wird bei der Annexin V-Färbung ausgenutzt. Annexin V ist ein ~ 35 kD großes Ca^{2+}-abhängiges Phospholipid-Bindeprotein mit einer hohen Affinität für Phosphatidylserin, und stellt daher in fluoreszenzmarkierter Form (z.B. Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)) eine geeignete Sonde für apoptotische Zellen dar. Der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen in der zu untersuchenden Population kann dann durchflusszytometrisch über die Bestimmung der FITC-positiven Zellen ermittelt werden.
Die Färbung der Zellen erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Annexin V-FITC	BD PharMingen, USA
Annexin V Bindepuffer (10 x)	BD PharMingen, USA

5.4.2 Nachweis später Apoptose/Nekrose über Propidiumjodid-Färbung

In Kombination mit der Annexin V-FITC-Färbung wurde bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zusätzlich eine Färbung mit dem Vitalfarbstoff Propidiumjodid (PI) (pro Test: 2,5 µl einer 50 µg/ml PI-Färbelösung) angewendet. Propidiumjodid kann nur von Zellen mit stark geschädigten Membranen, das heißt spät-apoptotischen oder nekrotischen Zellen passiv aufgenommen werden. Diese können dann über die rote Fluoreszenz im Durchflusszytometer von den vitalen Zellen bzw. von Zellen im frühen Apoptosestadium unterschieden werden.

Propidiumjodid Stammlösung (1 mg/ml)	Sigma, Taufkirchen

5.4.3 Untersuchung der siRNA-Transfektionseffizienz

Die Bestimmung der Effizienz des in dieser Arbeit verwendeten Elektroporationsprotokolls erfolgte durch Elektroporation von 32D-Zellen mit einer fluoreszenzmarkierten siRNA (Fluoresceinisothiocyanat, FITC) in der üblicherweise eingesetzten Konzentration von 800 nM (nähere Angaben zum Transfektionsprotokoll siehe 5.7.1). Direkt im Anschluss an die Elektroporation wurden die 2,5 Mio. Zellen in 20 ml RPMI-Medium überführt. Dieser Zellsuspension wurden 4 ml entnommen, durch Zentrifugation sedimentiert, in 500 µl PBS resuspendiert und direkt durchflusszytometrisch untersucht (verwendeter Filter: 530 nm).

5.4.4 Untersuchung der *eGfp*-Expression in 32Dp210-wt Zellen

Die in dieser Arbeit etablierten Zelllinien 32Dp210-wt/T315I/H396P exprimieren stabil eine humanisierte Variante des *Gfp*-Reportergens (*enhanced-GFP = eGfp)*. Für die Quantifizierung der durch das eGfp bedingten Grünfluoreszenz der Zellen wurden diese direkt im Durchflusszytometer untersucht (verwendeter Filter: 530 nm).

5.5 Untersuchung der *eGfp*-Expression am Fluoreszenzmikroskop

Für den Nachweis der Expression des *eGfp*-Reportergens in den murinen hämatopoetischen 32Dp210-wt-Zellen wurden diese auf einen Objektträger aufgetropft, mit einem Deckglas abgedeckt und dann am Fluoreszenzmikroskop untersucht.
Um die durch die *Bcr-Abl*-RNAi verursachten Unterschiede in der Grünfluoreszenz zu detektieren wurden zunächst die BAF8 behandelten Kontrollen ausgewertet und danach, unter Verwendung derselben Einstellungen, die BAF7 behandelten Zellen analysiert. Die Aufnahme der Fluoreszenzbilder erfolgte unter Verwendung einer speziellen Software.

Fluoreszenz Mikroskop DMRA/RXA	Leica Microsystems, Wetzlar
Leica ‚QFluoro' Imaging Solution Software Version V1.0a	Leica Microsystems, Wetzlar

5.6 Protein-Analyse

5.6.1 Gesamtproteinextraktion aus hämatopoetischen Zelllinien

Für die Extraktion nukleärer und cytoplasmatischer Proteine wurden die entsprechenden Zellen zunächst durch Zentrifugation bei 300 g sedimentiert und anschließend mit PBS resuspendiert. Dieser Waschschritt erfolgte zweimal, wobei die Zellen in 1,5 ml Eppendorf Gefäße überführt wurden. Die gewaschenen Zellpellets wurden nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Zugabe von 40-100 µl Gesamtlysepuffer (50 mM Tris-HCl, pH7, 6; 250 mM NaCl, 0,1% (w/v) Triton X-100, 5 mM EDTA, Protease-Inhibitoren Cocktail) unter ständigem vortexen zu den gefrorenen Zellpellets. Anschließend wurde die Zellsupension 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte eine 30minütige Zentrifugation (4°C, 8000 g). Die löslichen Proteine befanden sich nun im Überstand. Dieser wurde abgenommen und konnte, nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff, bei -80°C gelagert werden.

‚Complete' Protease-Inhibitoren Cocktail	Roche, Mannheim

5.6.2 Extraktion von Proteinen aus primären hämatopoetischen Zellen

Aufgrund der sehr hohen Proteaseaktivität in den aus Patientenmaterial isolierten hämatopoetischen Zellen (Nishimura *et al.*, 1991) wurden diese für die Proteinextraktion direkt in 2 x Lämmlipuffer (125 mM Tris-HCl, 40% Glycerol, 4% SDS, 2% Bromphenolblau, 10% β-Mercaptoethanol, pH 6,8) aufgenommen und nach kräftigem vortexen 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Anschließend folgte der Aufschluss der Zellen unter Verwendung eines Ultraschall-Homogenisators. Die homogenisierten Proben wurden dann kurz abzentrifugiert und direkt auf ein SDS-Acrylamidgel aufgetragen.
Da dieses Verfahren eine anschließende Bestimmung der Proteinkonzentration nicht zulässt wurden bei zu vergleichenden Proben gleiche Zellmengen für die Extraktion verwendet.

Ultraschall Homogenisator ‚Sonopuls HD200'; MS72 Mikrospitze aus Titan	Bandelin Elektronik, Berlin

5.6.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung des Gesamtproteingehalts der hergestellten Lysate erfolgte über den kolorimetrischen Bradford-Test (Bradford, 1976). Dieser basiert auf der Bindung von Coomassie Brilliant Blau an Protein.
1 µl des zu untersuchenden Lysats wurde in 20%-Bradfordlösung aufgenommen und anschließend die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Die Proteinkonzentration [µg/µl] wurde dann rechnerisch anhand einer zuvor unter entsprechenden Bedingungen gemessenen BSA-Standardreihe (Konzentrationsbereich von 2-24 µg/µl) abgeleitet.

Bradford Reagenz	Bio-Rad, München
BSA (bovine serum albumin)	Sigma, Taufkirchen
Spektralphotometer Novaspec II	Biochrom AG, Berlin

5.6.4 Auftrennung der Proteine über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht die Auftrennung isolierter Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Für die Elektrophorese wurden diskontinuierliche Gele (siehe Tabelle 5.3) in Kombination mit einer vertikalen Elektrophoresekammer verwendet (Sambrook *et al.,* 1998). Die aufzutrennenden Proteinextrakte wurden im Verhältnis 1:1 mit 2 x Lämmlipuffer (125 mM Tris-HCl, 40% Glycerol, 4% SDS, 2% Bromphenolblau, 10% β-Mercaptoethanol, pH 6,8) vermischt und 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Aufgetragen wurden Probenvolumina von 40 µl, wobei für jedes Gel ein Molekulargewicht-Marker mitgeführt wurde. Die Auftrennung erfolgte in der mit Ladepuffer (25 mM Tris-Base, 0,2 M Glycin, 1% SDS) gefüllten Kammer bei einer konstanten Stromstärke von 8 mA pro Gel über Nacht.

Tabelle 5.3: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele

	4%-Sammelgel	10%-Trenngel (für kleine Proteine)	7,5%-Trenngel (für große Proteine)
H_2O	6,1 ml	9,95 ml	12 ml
30% Acrylamid/Bis-Lösung	1,35 ml	8,3 ml	6,25 ml
1,5 M Tris pH 8,8	-	6,22 ml	6,22 ml
0,5 M Tris pH 6,8	2,5 ml	-	-
10% SDS	100 µl	250 µl	250 µl
10% APS	100 µl	250 µl	250 µl
Temed	10 µl	25 µl	25 µl

Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad, München
Temed	Roth, Karlsruhe
Vertikal-Elektrophoresekammer ‚Protean® II xi Cell‘	Bio-Rad, München
30% Acrylamid/Bis-Lösung (37, 5:1)	Bio-Rad, München
Molekulargewicht-Marker, Rainbow™‘	Amersham Biosciences, Freiburg

5.6.5 Western-Blot-Analyse

Die auf dem SDS-Gel aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe einer Trans-Blot® Semi-Dry Transferkammer elektrophoretisch auf eine hydrophobe Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran übertragen. Hierzu wurde das Gel luftblasenfrei auf die nach Angaben des Herstellers vorbehandelte Membran aufgelegt. Gel und Membran wurden zwischen je drei Lagen mit Transferpuffer (0,025 M Tris-Base, 0,192 M Glycin, 20% Methanol, 0,1% SDS) getränktem Filterpapier platziert. Der Transfer erfolgte bei 14 V über 1,5 h.
Nach dem Transfer wurde die Membran kurz in Tris-Puffer (10 x TBS: 400 g NaCl, 10 g KCl, 150 g Tris-HCl, pH 7,4, ad. 5000 ml Aqua dest.) gewaschen. Die Blockierung der Membran gelang durch eine einstündige Inkubation in ‚Western Blocking Reagent' (1:10 in TBS) bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte, wenn nicht anders vom Hersteller angegeben, in ‚Western Blocking Reagent' (1:20 in TBS) bei 4°C über Nacht. Im Anschluss wurde die Membran 2 x 10 min in TBST (0,1% Tween-20 in TBS) gewaschen und 2 x 10 min in ‚Western Blocking Reagent' (1:20 in TBS) blockiert. Abhängig vom Herkunftsorganismus des eingesetzten primären Antikörpers (Maus, Kaninchen, etc.) wurde nun ein entsprechender Peroxidase (POD)-konjugierter Sekundär-antikörper (Anti-Maus, -Kaninchen, etc.) zugegeben. Die Inkubation des sekundären Antikörpers wurde eine Stunde bei Raumtempteratur in ‚Western Blocking Reagent' (1:20 in TBS) durchgeführt. Daran schloss sich ein Waschritt von 4 x 15 min in TBST an. Die in dieser Arbeit verwendeten Primär- und Sekundär-Antikörper sind in Tabelle 5.4 aufgelistet.
Die Antikörper-Detektion erfolgte nicht-radioaktiv über eine Chemilumineszenz-Reaktion. Hierfür wurden sowohl ‚ECL Plus Western Detection' Reagenz als auch ‚SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate' jeweils nach Anleitung des Herstellers verwendet. Die Intensität des Fluoreszenzsignals wurde dann über eine Exposition der Membran gegen einen speziellen Röntgenfilm bzw. eine CCD-Kamera ausgewertet. Bildbearbeitung und densitometrische Auswertungen der Signale wurden mit Hilfe des Programms AIDA 2.3.1 durchgeführt.
Durch 10-20minütige Inkubation bei 52°C mit einer SDS-Mercaptoethanol-Strippinglösung (62,5 mM Tris-HCl, 2% w/v SDS, 100 mM Mercaptoethanol; pH 6,7) wurde die Membran wieder von primärem und sekundärem Antikörper befreit. Die gesäuberte Membran konnte dann für die Untersuchung weiterer Proteine wie zum Beispiel der Glycerinaldehydphosphat-

Dehydrogenase (GAPDH) einem so genannten Haushaltsgen, das als Beladungskontrolle diente herangezogen werden.

PVDF Membran	Boehringer Mannheim, Mannheim
Trans-Blot® Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, München
Filterpapier ‚Gel-Blotting Papier‘	Schleicher & Schuell, Dassel
‚ECL-Plus‘ Western Blotting Detection Reagent	Amersham Biosciences, Freiburg
‚Western Blocking Reagent‘	Roche, Mannheim
Autoradiographie Kassette	Amersham Biosciences, Freiburg
‚Lumi-Film‘, Chemiluminescent Detection Film	Roche, Mannheim
‚SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate‘	Pierce Biotechnology, USA
‚LAS-1000‘, Luminescent imager Analyzer with electronically cooled CCD camera System	Fujifilm, Medical Systems, USA
Advanced image data analyzer (AIDA 2.3.1)	Raytest, Straubenhardt

Tabelle 5.4: Übersicht über die, für die Western-Blot-Analyse verwendeten Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Eingesetzte Konzentration	Herkunft
Anti-Abl	Maus, IgG1, 8E9	1-2 µg/ml	BD PharMingen, USA
Anti-Bcl-X	Maus, IgG2a, 2H12	0,4 µg/ml	BD PharMingen, USA
Anti-$p27^{Kip1}$	Maus, IgG1, G173-524	2 µg/ml	BD PharMingen, USA
Anti-Bcr (N-20)	Kaninchen, polyklonal	0,8 µg/ml	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-GAPDH	Maus, IgG, monoklonal, 6C5	0,018 µg/ml	Biodesign, USA
Anti-Kaninchen IgG-POD	Ziege, IgG (H+L)	0,08 µg/ml	Jackson Immunoresearch, USA
Anti-Maus IgG-POD	Ziege, IgG (H+L)	0,08 µg/ml	Jackson Immunoresearch, USA

5.7 RNA-Interferenz

Das Phänomen der RNA-Interferenz (RNAi) beschreibt einen hochspezifischen Mechanismus zur Stilllegung von Genen ausgelöst durch dsRNA. Es konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass durch eine Übertragung oder Expression so genannter ‚short interfering RNA'-Moleküle (siRNA) eine gezielte Inaktivierung von Genen in Säugerzellen erreicht werden kann (zur Übersicht: Mittal *et al.*, 2004).

5.7.1 RNAi durch direkte Übertragung von siRNA-Molekülen

Design der verwendeten siRNA-Moleküle

Die in dieser Arbeit verwendeten siRNA-Moleküle wurden von der Alnylam Europe AG (Kulmbach) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um 21-23 nt lange asymmetrische dsRNA Moleküle. Die Asymmetrie entsteht durch einen zwei Basen langen 3'-Überhang des ‚antisense'-Strangs. In von Alnylam durchgeführten Vorversuchen hat sich diese asymmetrische siRNA als sehr effizient erwiesen. Die siRNA (20-100 µM) wurde in einem speziellen ‚Annealing'-Puffer (20 mM $NaPO_4$, 100 mM NaCl; pH 6,9) geliefert und unverdünnt für die Transfektion eingesetzt.
Zur Verbesserung der Serumstabilität wurden einige der siRNA-Moleküle modifiziert. Insgesamt wurden zwei verschiedene Stabilisierungs-Varianten angewandt: Die O-Methyl-Modifikation und eine Modifikation durch Anpassung der Basensequenz im Bereich des 3'-Endes des as-Strangs.
Die O-Methylierung der siRNA erfolgte an Position C2 des Pentosezuckers zweier Nukleotide am 3'-Ende des as-Stranges.
Bei der Sequenzanpassung wurde die Nukleotidsequenz am 3'-Ende des as-Stranges so verändert, dass durch das Entstehen zusätzlicher sog. Stapelwechselwirkungen (‚stacking interactions') zwischen ummittelbar benachbarten Basenpaaren eine Stabilisierung des RNA-Moleküls erreicht wurde (siehe Abb.5.3).

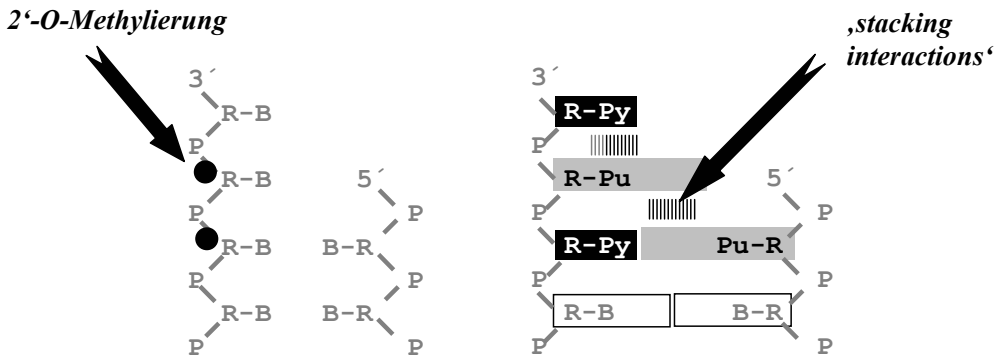


Abb.5.3: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten siRNA-Stabilitätsmotive; verändert nach Vornlocher HP, Alnylam Europe AG. Dargestellt ist das Ende der siRNA mit dem 2-nt-Überhang am 3'-Ende des as-Strangs. R = Ribose, B = Nukleotid-Base, P = Phosphatrest, Py = Pyrimidin-Base, Pu = Purin-Base.

Wahl der Zielsequenz

Bei etwa 95% aller CML-Patienten entsteht das Fusionsgen *Bcr-Abl* durch Bruch innerhalb der so genannten ‚major breakpoint cluster region' (M-*bcr*) des zellulären *Bcr*-Gens. Daraus resultiert entweder das Fusionstranskript-*e13a2* oder -*e14a2* (frühere Bezeichnung: b2a2 und b3a2). Beide codieren für ein Bcr-Abl-Protein mit dem Molekulargewicht M_r 210,000 (p210). Erfolgt die Translokation dagegen durch Bruch innerhalb der ‚minor breakpoint cluster region' (m-*bcr*) resultiert daraus meist ein *Bcr-Abl*-Gen mit dem Bruchpunkt *e1a2*. Dieses Gen codiert für ein Bcr-Abl-Protein mit einem Molekulargewicht von M_r 190,000 (p190). Die *e1a2-Bcr-Abl*-Genvariante findet man bei etwa 66% der Ph^+-ALL Patienten (Shepherd *et al.,* 1995).

Als Zielsequenz für die spezifische Hemmung der *Bcr-Abl*-Expression über RNAi wurde die Sequenz am Fusionspunkt des jeweiligen *Bcr-Abl*-Transkripts verwendet (siehe Tab.5.5). Dadurch sollte eine gleichzeitige Beeinträchtigung der Expression des zellulären *Abl*- bzw. *Bcr*-Gens verhindert werden. In Tabelle 5.6, Tabelle 5.7 und Tabelle 5.8 sind alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten synthetischen siRNAs aufgelistet.

Tabelle 5.5: Sequenzen der *Bcr-Abl*-Transkriptvarianten im Bereich der Fusionsstelle[a]

Bcr-Abl-e14a2-mRNA (AJ131466)	358 UUUAAGCAGAGUUCAA|AAGCCCUUCAGCG 386
Bcr-Abl-e13a2-mRNA (AJ13467)	282 GACCAUCAAUAAGGAAG|AAGCCCUUCAGCGG 312
Bcr-Abl-e1a2-mRNA (AF113911)	438 CUUCCAUGGAGACGCAG|AAGCCCUUCAGCGG 469

[a] genaue Fusionsstelle der *Bcr* und *c-Abl* Sequenz mit Querstrich gekennzeichnet

Tabelle 5.6: Beschreibung der für die *Bcr-Abl-e14a2*-RNAi verwendeten siRNA-Moleküle

Name		Sequenz	Beschreibung
BAF7	s	5‘-CAGAGUUCAA|AAGCCCUUCAG-3‘	sequenzhomolog zu *Bcr-Abl*[a]*-e14a2*
	as	3‘-UCGUCUCAAGUU|UUCGGGAAGUC-5‘	
BAF8	s	5’-CAG*U*GUUCA*U*|AAGCC*G*UUCAG-3’	3 x ‚mismatch’[b]-Kontrolle zu BAF7
	as	3‘-UCGUC*A*CAAGU*A*|UUCGG*C*AAGUC-5‘	
BAF9	s	5‘-AGAGUUCAA|AAGCCCUUCAGC-3‘	sequenzhomolog zu *Bcr-Abl*[a]*-e14a2*
	as	3‘-CGUCUCAAGUU|UUCGGGAAGUCG-5‘	
BAF13	s	5‘-AGA*C*UUCAA|*U*AGCCC*A*UCAGC-3‘	3 x ‚mismatch’[b]-Kontrolle zu BAF9
	as	3‘-CGUCU*G*AAGUU|*A*UCGGG*U*AGUCG-5‘	
BAF12	s	5‘-AGAGUUCAA|AAGCCCUUCAGC-3‘	sequenzhomolog zu BAF9, modifiziert[c]
	as	3‘-C**GU**CUCAAGUU|UUCGGGAAGUCG-5‘	
BAF14	s	5’-AGA*C*UUCAA|*U*AGCCC*A*UCAGC-3‘	sequenzhomolog zu BAF13, modifiziert[c]
	as	3‘-C**GU**CU*G*AAGUU|*A*UCGGG*U*AGUCG-5‘	
BAF1	s	5‘-CAGAGUU*G*AA|AAGCCCUUCAG-3‘	1 x ‚mismatch’[b] zu BAF7
	as	3‘-UCGUCUCAA*C*UU|UUCGGGAAGUC-5‘	

[a] genaue Fusionsstelle der Bcr- und c-Abl-Sequenz mit Querstrich gekennzeichnet; b ‚mismatch‘-Basen kursiv und unterstrichen; c 2‘-O-methylierte Basen fettgedruckt

Tabelle 5.7: Beschreibung der für die *Bcr-Abl-e13a2*-RNAi verwendeten siRNA-Moleküle

Name	Sequenz		Beschreibung
BAF3	s	5‘-UAAGGAAG|AAGCCCUUCAGCG-3‘	sequenzhomolog zu
	as	3‘-UUAUUCCUUC|UUCGGGAAGUCGC-5‘	*Bcr-Abl*[a]*-e13a2*
BAF15	s	5‘-AAUAAGGAAG|AAGCCCUUCAG-3‘	sequenzhomolog zu
	as	3‘-AGUUAUUCCUUC|UUCGGGAAGUC-5‘	*Bcr-Abl*[a]*-e13a2*
BAF16	s	5‘-AAUAAGGAAG|AAGCCCUUCAG-3‘	sequenzhomolog zu
	as	3‘-CGUUAUUCCUUC|UUCGGGAAGUC-5‘	BAF15; modifiziert[b]
BAF17	s	5‘-GGAAG|AAGCCCUUCAGCGGCC-3‘	sequenzhomolog zu
	as	3‘-UUCCUUC|UUCGGGAAGUCGCCGG-5‘	*Bcr-Abl*[a]*-e13a2*
BAF18	s	5‘-GGAAG|AAGCCCUUCAGCGGCC-3‘	sequenzhomolog zu
	as	3‘-CGCCUUC|UUCGGGAAGUCGCCGG-5‘	BAF17; modifiziert[b]
BAF19	s	5‘-AUCAAUAAGGAAG|AAGCCCUU-3‘	sequenzhomolog zu
	as	3‘-GGUAGUUAUUCCUUC|UUCGGGAA-5‘	*Bcr-Abl*[a]*-e13a2*
BAF20	s	5‘-AUCAAUAAGGAAG|AAGCCCUU-3‘	sequenzhomolog zu
	as	3‘-CGUAGUUAUUCCUUC|UUCGGGAA-5‘	BAF19; modifiziert[b]
BAF28	s	5‘-AUC*U*AUAAG*C*AAG|AA*C*CCCUU-3‘	3 x ‚mismatch‘[c] zu
	as	3‘-GGUAG*A*UAUUC*G*UUC|UU*G*GGGAA-5‘	BAF19

[a] genaue Fusionsstelle der *Bcr*- und *c-Abl*-Sequenz mit Querstrich gekennzeichnet, [b] modifizierte (= sequenz-veränderte) Nukleotide grau unterlegt; [c] ‚mismatch‘-Basen kursiv und unterstrichen. s= sense; as= antisense

Tabelle 5.8: Beschreibung der für die *Bcr-Abl-e1a2*-RNAi verwendeten siRNA-Moleküle

Name	Sequenz		Beschreibung
BAF22	s	5‘-GGAGACGCAG|AAGCCCUUCAG-3‘	sequenzhomolog zu
	as	3‘-UACCUCUGCGUC|UUCGGGAAGUC-5‘	*Bcr-Abl*[a]*-e1a2*
BAF24	s	5‘-GACGCAG|AAGCCCUUCAGCGG-3‘	sequenzhomolog zu
	as	3‘-CUCUGCGUC|UUCGGGAAGUCGCC-5‘	*Bcr-Abl*[a]*-e1a2*

[a] genaue Fusionsstelle der *Bcr*- und *c-Abl*-Sequenz mit Querstrich gekennzeichnet

siRNA-Übertragung in *Bcr-Abl*-positive Zelllinien mittels Elektroporation

Die siRNA-Transfektion der *Bcr-Abl*-exprimierenden hämatopoetischen Zelllinien 32Dp210-wt/T315I/H396P, 32Dp210/e13a2, 32Dp190/e1a2, M07p210/e14a2 und MEG-01 erfolgte mittels Elektroporation. Dabei wurden 2,5-5 x 10^6 Zellen in 800 µl RPMI 1640 Medium in einer 4 mm-Elektroporationsküvette mit der jeweiligen siRNA (200-800 nM) gemischt und 30 sec inkubiert. Für die Elektroporation wurde ein Einzelpuls-Programm (250 V, 1800 µF, ∞ Ω) verwendet. Als Kontrolle dienten Zellen die mit einer entsprechenden ‚mismatch'-siRNA behandelt wurden und Zellen die nur elektroporiert wurden, ohne mit siRNA versetzt zu werden (Elektroporationskontrolle (EPC)). Nach der Elektroporation wurden die Zellen sofort in frisches Medium ausgesät und in den CO_2-Inkubator überführt. Aufgrund der hohen Stabilität des Onkoproteins Bcr-Abl wurde die Behandlung z.T. mehrfach im Abstand von ~ 24 h durchgeführt. Alle verwendeten *Bcr-Abl*-positiven Zellen sind in ihrem Wachstum vollständig von Bcr-Abl abhängig. Ein Verlust von Bcr-Abl führt daher zum Zelltod. Bei den 32Dp210-Zelllinien kann dieser aber durch Zugabe exogener Wachstumsfaktoren verhindert werden. Um eine Anreicherung ineffizient transfizierter Zellen während der mehrtägigen Behandlung zu vermeiden wurde daher bei diesen Zelllinien (32Dp210-wt/T315I/H396P, 32D p210/e13a2, 32Dp190/e1a2) während der gesamten Dauer der Behandlung, d.h. von der ersten bis kurz vor der letzten Elektroporation dem Medium Wachstumsfaktoren (mIL-3; 1 ng/ml) zugesetzt. Im Verlauf der letzten Elektroporation wurden die Zellen gewaschen und dann in Medium ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren überführt. Im Anschluss folgten die verschiedenen Untersuchungen.

siRNA-Übertragung in primäre hämatopoetische Ph^+-MNC

Die aus Patientenmaterial isolierten hämatopoetischen $CD34^+$-MNC wurden aus der Kryokonservierung (siehe 5.1.5) frisch in Kultur überführt und sofort am Folgetag mit der siRNA behandelt. Dabei wurden bis zu 2,5 x 10^6 Zellen in 800 µl Medium in einer 4 mm Elektroporationsküvette mit 800 nM siRNA gemischt und eine Minute inkubiert. Für die Elektroporation wurde ein Einzelpuls-Programm (250 V, 1800 µF, ∞ Ω) verwendet. Als Kontrolle wurde die entsprechende ‚mismatch'-siRNA verwendet. Die Zellen wurden direkt nach erfolgter Elektroporation in vorgewärmtes Medium mit zugesetzten Wachstumsfaktoren (siehe

5.2.3) überführt. Wie oben für die hämatopoetischen Zelllinien beschrieben wurde auch hier die Behandlung nach 24 h wiederholt. Bei der zweiten siRNA-Transfektion wurden die Zellen gewaschen und in RPMI 1640 Medium + 20% FCS ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren überführt.

‚EasyJect' Elektroporator	Peqlab, Erlangen
4 mm Elektroporationsküvette	Peqlab, Erlangen

siRNA-Übertragung in K562-Zellen mittels Lipofektion

Die Übertragung von siRNA-Molekülen in die leukämische Zelllinie-K562 erfolgte mittels Lipofektamin™ 2000 nach dem Protokoll des Herstellers. Die Transfektion wurde im 6well-Maßstab durchgeführt wobei 1,5 Mio. Zellen pro well in 1,5 ml Medium ausgesät wurden. Die eingesetzte Menge an siRNA lag bei etwa 5,7 µg/ml.

Lipofectamin™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe
OPTI-MEM® I Reduced Serum Medium	Gibco, Karlsruhe

5.7.2 RNAi durch Übertragung des pSUPER-shRNA-Expressionsvektors

Das pSUPER-RNAi System™ (Brummelkamp *et al.*, 2002) wurde unserem Labor von R. Agami, ph.D (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam) zur Verfügung gestellt. Die im pSUPER-Vektor enthaltene siRNA-Expressionskassette (siehe Abb.5.4) besteht aus einem H1-Polymerase III Promotor, gefolgt von der genspezifischen siRNA-Sequenz. Diese setzt sich aus einer 19 nt-langen Sequenz zusammen, die homolog ist zur Zielsequenz und von einem 9 nt-langen Zwischenstück vom reversen Komplement derselben Sequenz getrennt wird. Das Terminationssignal besteht aus fünf aufeinander folgenden Thymidin-Nukleotiden. Das entstehende Transkript faltet sich auf sich selbst zurück, dadurch bildet sich eine kurze Haarnadelstruktur-RNA (short hairpin RNA = shRNA), die durch das Dicer-Enzym zur funktionstüchtigen siRNA prozessiert wird.

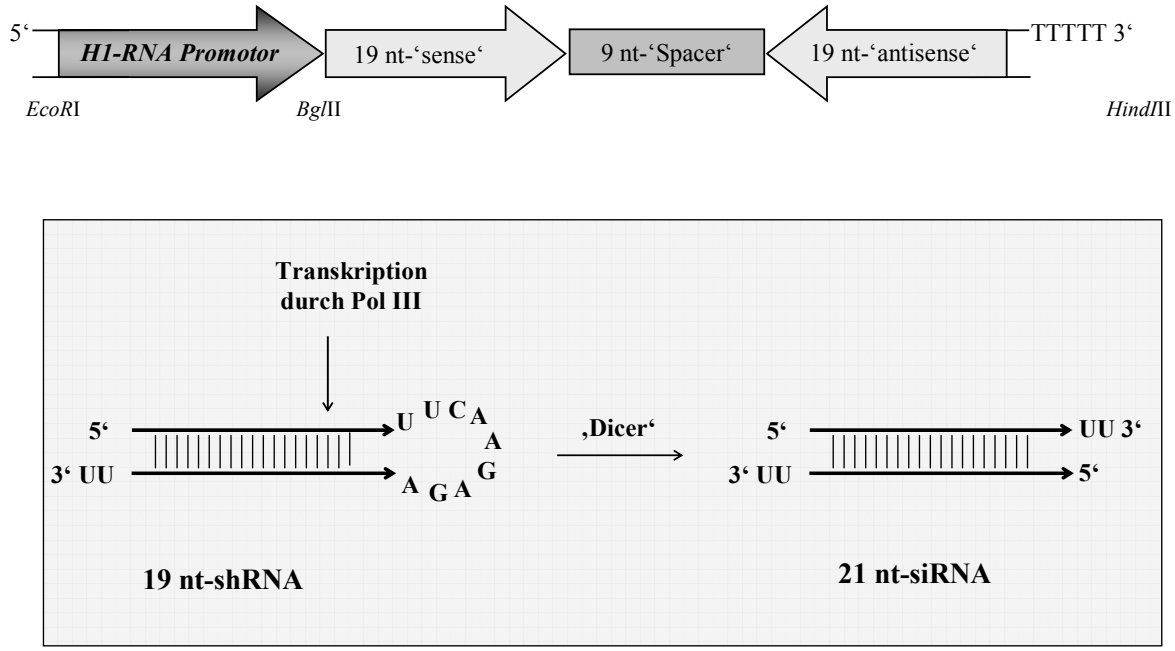


Abb.5.4: Schematische Übersicht über das pSUPER RNAi System™.

Konstruktion von pSUPER-*Bcr-Abl*-siRNA Expressionsvektoren (pS-BA)

Insgesamt wurden vier pSUPER-*Bcr-Abl*-siRNA Expressionsvektoren hergestellt. Drei davon (pS-BA1-3) enthalten genspezifische Abschnitte homolog zur mRNA der *Bcr-Abl*-Variante *e14a2* ein weiterer Vektor (pS-BA4) enthält eine homologe Sequenz zur mRNA der *Bcr-Abl*-Variante *e13a2* (siehe Tab.5.9).

Die *Bcr-Abl*-spezifischen Sequenzabschnitte wurden als 64 bp lange Oligonukleotid-Paare synthetisiert (Weizmann Institute of Science; internal Oligo-Synthesis; 30 nmol/ml) und unter Berücksichtigung des von den Autoren publizierten Protokolls in das Plasmid pSUPER eingebaut (http://www.oligoengine.com).

Tabelle 5.9: Übersicht über das Design der *Bcr-Abl*-spezifischen ‚Oligonukleotid-Inserts' (64 bp) der hergestellten pSUPER-Vektoren (pS-BA1-4).
pS-BA1-3: codieren für eine shRNA gegen *Bcr-Abl-e14a2*. pS-BA4: codiert für eine shRNA gegen *Bcr-Abl-e13a2.*

N	*Bgl*II	‚sense'	loop	‚antisense'	T	*Hind*III
BA1	5'-gatcccc 3'-ggg	**gcagagttcaaaagccctt** **cgtctcaagttttcgggaa**	ttcaagaga aagttctct	**aagggcttttgaactctgc** **ttcccgaaaacttgagacg**	ttttt aaaaa	ggaaa-3' ccttttcga-5'
BA2	5'-gatcccc 3'-ggg	**agagttcaaaagcccttca** **tctcaagttttcgggaagt**	ttcaagaga aagttctct	**tgaagggcttttgaactct** **acttcccgaaaacttgaga**	ttttt aaaaa	ggaaa-3' ccttttcga-5'
BA3	5'-gatcccc 3'-ggg	**agttcaaaagccttcagc** **tcaagttttcggaagtcg**	ttcaagaga aagttctct	**gctgaaggcttttgaact** **cgacttccgaaaacttga**	ttttt aaaaa	ggaaa-3' ccttttcga-5'

N	*Bgl*II	‚sense'	loop	‚antisense'	T	*Hind*III
BA4	5'-gatcccc 3'-ggg	**atcaataaggaagaagccc** **tagttgttccttcttcggg**	ttcaagaga aagttctct	**gggcttcttccttattgat** **cccgaagaaggaataacta**	ttttt aaaaa	ggaaa-3' ccttttcga-5'

N: Name, T: Terminator, *Bgl*II/*Hind*II: Schnittstellen für die entsprechenden Restriktionsendonukleasen.

Bestimmung der thermodynamischen Eigenschaften der siRNAs BA1-3

Die freie Enthalpie ΔG [kcal/mol] kann als Maß für die thermodynamische Stabilität einer siRNA herangezogen werden. Diese setzt sich aus:

$$\Delta G = \Delta H - T\,\Delta S \qquad \text{(Gibbs-Helmholtz)},$$

also aus einem enthalpischen (ΔH) und einem entropischen (ΔS) Beitrag zusammen. In den entropischen Term geht die Zunahme von ungebundenen Molekülen beim Schmelzen in zwei Einzelstränge ein. Zum enthalpischen Term tragen nahezu ausschließlich die Stapelwechselwirkungen (‚stacking interactions') und die Wasserstoffbrückenbindungen bei. Nach neuen Erkenntnissen, gibt die thermodynamische Stabilität der Enden der siRNA-Doppelhelix Auskunft über die siRNA-Effizienz (Schwartz *et al.*, 2004; Khvorova *et al.*, 2004). Die entsprechend relevanten Stabilitätswerte ($\Delta G_{5'sense}$, $\Delta G_{5'antisense}$ und $\Delta\Delta G = \Delta G_{5'sense} - \Delta G_{5'antisense}$)

wurden mit Hilfe des ‚siRNA Selection Server' des Whitehead Institute for Biomedical Research, USA, berechnet (Yuan *et al*., 2004; http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNA).

Transfektion leukämischer K562 Zellen mit pS-BA1-4

Die Übertragung der *Bcr-Abl*-siRNA-Expressionsvektoren (pS-BA1-4) in die leukämischen K562-Zellen erfolgte unter Verwendung des kationischen Polymer-Transfektionsreagenz Jet-PEI™ nach Anleitung des Herstellers. Die eingesetzte Zellzahl variierte zwischen 0,1 und 0,2 Mio/ml. Für einen Transfektionsansatz wurde eine DNA-Menge von 1-3 µg pro Milliliter Zellsuspension eingesetzt. Eine Co-Transfektion mit dem *GFP*- Expressionsvektor pGFP-C1 (eingesetzte Menge: ~ 1/15 der eingesetzten Gesamt-DNA Menge) ermöglichte eine Überprüfung der Transfektionseffizienz im Fluoreszenzmikroskop. Aufgrund der niedrigen Transfektionseffizienz (~ 10%) wurde zusätzlich mit dem Expressionsvektor pBABE-Puro (Morgenstern *et al.*, 1990) co-transfiziert (eingesetzte Menge: ~ 1/10 der eingesetzten Gesamt-DNA Menge). Dieser enthält ein Puromycinresistenzgen das transfizierte Zellen gegenüber dem Antibiotikum Puromycin desensitiviert. Dadurch wird das Abtöten der nicht transfizierten Zellen durch eine anschließende Puromycin-Behandlung ermöglicht. Für eine solche Selektion wurden ~ 24 h nach Transfektion 1,5 µg/ml des Antibiotikums Puromycin zur Zellsuspension gegeben. 96 h nach Transfektion wurden die Zellen für Proteinexpressionsanalysen geerntet (vgl. 5.6).

jetPEI™	PolyPlus-transfection, Frankreich
pGFP-C1 Vector	BD Bioscience, Heidelberg

5.8 Molekularbiologische Methoden

5.8.1 Isolation von Gesamt-RNA

Die Isolation von Gesamt-RNA aus hämatopoetischen Zelllinien und humanen hämatopoetischen MNC erfolgte unter Verwendung des RNeasy®-Minikits, nach Anleitung des Herstellers.

RNeasy®-Minikit	Quiagen, Hilden

5.8.2 Bestimmung der *Bcr-Abl*-Fusionsvariante über PCR

In 95% aller CML-Patienten findet sich die Bcr-Abl-Proteinvariante mit dem Molekulargewicht M_r 210,000 (p210) (Shepherd *et al.*, 1995). Diese wird sowohl durch das *Bcr-Abl*-Fusionsgen *e13a2* als auch durch das *Bcr-Abl*-Fusionsgen *e14a2* codiert. Bei etwa 20% der Patienten finden sich beide genannten Genvarianten gleichzeitig (Melo, 1996). Um zu bestimmen welche Fusionsform von *Bcr-Abl* in den aus CML-Patienten isolierten $CD34^+$-MNC vorliegt, wurde eine Reverse Transkription mit anschließender PCR-Analyse durchgeführt. Die aus den Zellen isolierte Gesamt-RNA wurde hierfür über eine RT-PCR (siehe Tab.5.10) in cDNA umgeschrieben (Durchführung nach Anleitung des Herstellers).

Tabelle 5.10: Thermocycler-Programm für die RT-PCR

25°C	10 min
48°C	60 min
95°C	5 min
4°C	‚for ever‘

40-400 ng der erhaltenen cDNA wurden dann als Matrize für eine anschließende PCR-Analyse eingesetzt (siehe Tab.5.11, Tab.5.12). Verwendet wurden Primer die an eine Sequenz

im Exon e13 (5‘-Primer) und eine Sequenz im Exon a3 (3‘-Primer) binden, also die *Bcr-Abl*-Fusionsstelle umspannen. Je nach Fusionstyp unterschieden sich die entstehenden Amplifikate in ihrer Länge um ~100 bp (siehe Abb.5.5 und Tab.5.13). Über eine elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte in einem 2%-Agarosegel (Sambrook *et al.,* 1998) wurde deren Länge bestimmt.

Tabelle 5.11: PCR-Reaktionsmix

10 x Reaktionspuffer (15 mM $MgCl_2$)	2,5 µl
dNTP-Mix (1,25 mM)	2,5 µl
5‘-*Bcr-Abl* (M-bcr)-Primer (100 pMol/µl)	0,2 µl
3‘-*Bcr-Abl* (M-bcr)-Primer (100 pMol/µl)	0,2 µl
Taq DNA Polymerase	0,5 µl
cDNA (Template)	40-400 ng
H_20	add. 25µl

Tabelle 5.12: Thermocycler-Programm für die PCR

94°C	5 min
94°C	30 sec
60°C	30 sec
70°C	30 sec ⇒ 35 Zyklen
70°C	7 min

Tabelle 5.13: Verwendete Primer für die Bestimmung der *Bcr-Abl*-Fusionsform mittels PCR

5‘-*Bcr-Abl* (M-bcr)	5‘-CTGACATCCGTGGAGCTG-3‘
3‘-*Bcr-Abl* (M-bcr)	5‘-CATTGTGATTATAGCCTAAGA-3‘

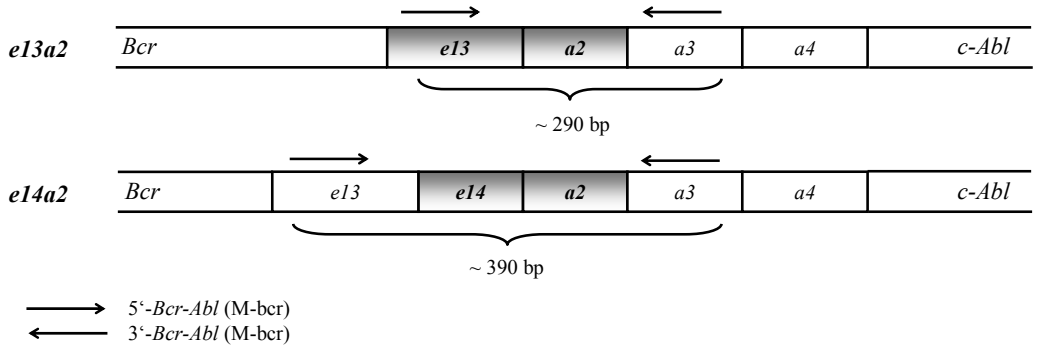


Abb.5.5: schematische Darstellung der Primer-Lokalisation und der Länge des entstehenden PCR-Produkts für die Bestimmung der Bcr-Abl-Bruchpunktvariante über PCR.

‚TaqMan Reverse Transcription Reagents Kit'	Applied Biosystems, USA
Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
dCTP; dATP; dGTP, dTTP (je 100 mM)	Amersham Biosciences, Freiburg
10 x PCR Puffer ohne Mg	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesium Chlorid (50 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose, ultra-pur	Gibco, Karlsruhe
‚PTC-225' Peltier Thermal Cycler	MJ Research, USA

5.8.3 Quantifizierung des *Bcr-Abl*-Fusionstranskripts über LightCycler-PCR

Die quantitative Bestimmung des Gehalts an *Bcr-Abl*-Fusionstranskripten in hämatopoetischen Zelllinien erfolgte unter Verwendung des ‚LightCycler t(9;22) Quantification Kit' nach Anleitung des Herstellers.

‚LightCycler t(9;22) Quantification Kit'	Roche, Mannheim
LightCycler	Roche, Mannheim
LightCycler Capillaries	Roche, Mannheim

6. Ergebnisse

Das humane Onkogen *Bcr-Abl* ist eines der Kennzeichen der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML) und wird allgemein als Ursache für die Induktion des leukämischen Phänotyps angesehen. Als nicht physiologisches, chimäres Gen stellt *Bcr-Abl* einen idealen Angriffspunkt für eine Inhibition durch die RNA-Interferenz (RNAi) dar. RNAi bezeichnet einen durch dsRNA-Moleküle ausgelösten Mechanismus zur Stilllegung von Genen. In Säugerzellen kann dieses Phänomen experimentell durch Übertragung oder Expression so genannter ‚short interfering RNAs' (siRNAs) ausgelöst werden. siRNAs sind in ihrer Sequenz homolog zu der ‚Target'-mRNA und bewirken selektiv deren Degradation. Im Hinblick auf eine zukünftige therapeutische Anwendung dieser Technik war das Ziel dieser Arbeit zu überprüfen, ob es grundsätzlich möglich ist, die Expression des *Bcr-Abl*-Onkogens mit Hilfe der RNAi zu blockieren.

6.1. *Bcr-Abl-e14a2*-RNAi

6.1.1 Charakterisierung der Zelllinien 32Dp210/e14a2 und M07p210/e14a2

Für die *Bcr-Abl*-RNAi-Versuche wurde zunächst die murine hämatopoetische Zelllinie 32D mit dem humanen *Bcr-Abl-e14a2*-Gen stabil transfiziert. Die entstandenen 32Dp210/e14a2 Zellen wuchsen aufgrund der transformierenden Eigenschaften von Bcr-Abl im Gegensatz zur parentalen Linie unabhängig von externen Wachstumsfaktoren. Ein Verlust der Bcr-Abl-Aktivität z.B. durch Behandlung mit dem Bcr-Abl-Kinase-Inhibitor Imatinib mesylate führte zum Absterben der Zellen, dies konnte aber durch Zugabe von mIL-3 zum Kulturmedium verhindert werden (vgl. Abb.6.1). Generell handelte es sich um schnell wachsende Zellen mit einer Proliferationsrate von ~ 2,5 Zyklen pro Tag.

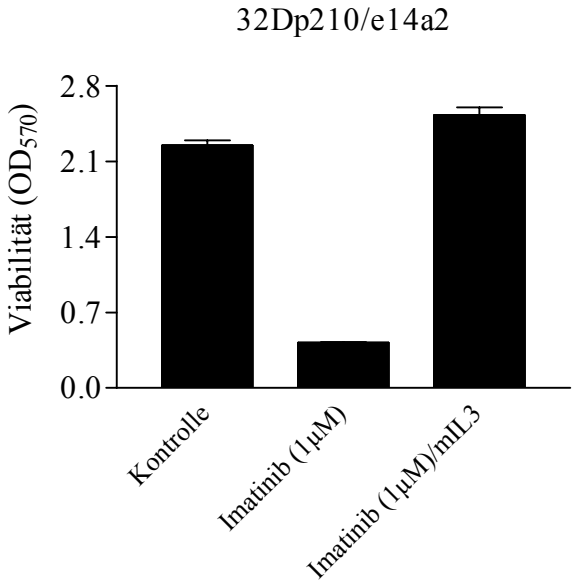


Abb.6.1: 32Dp210/e14a2-Zellen proliferieren in Abwesenheit externer Wachstumsfaktoren abhängig von Bcr-Abl. 10000 32Dp210/e14a2-Zellen wurden ~ 48 h entweder mit Imatinib mesylate (1 µM)/ohne mIL-3, mit Imatinib mesylate (1µM)/+ mIL-3 oder ohne beide Zusätze (Kontrolle) inkubiert. Anschließend wurde die Viabilität der Zellen mit Hilfe einer MTT-Analyse bestimmt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte ± SD von Dreifach-Ansätzen.

Als zweites Versuchssystem wurde die humane megakaryozytäre Zelllinie M07p210/e14a2 ausgewählt. Auch diese Zelllinie exprimiert stabil exogenes *Bcr-Abl-e14a2* (Hallek *et al.*, 1996). Die Onkogenaktivität verleiht den Zellen die Fähigkeit, unabhängig von externen Wachstumsfaktoren zu proliferieren. Abb. 6.2-B zeigt deutlich, dass eine Hemmung der Bcr-Abl-TK-Aktivität durch den Inhibitor Imatinib mesylate zum Absterben der Zellen führt. Als eine frühe Begleiterscheinung der Apoptoseinduktion konnte in diesen Zellen ein Rückgang der Bcr-Abl-, Bcr- und Abl- Proteinmenge (siehe Abb.6.2-A) beobachtet werden.

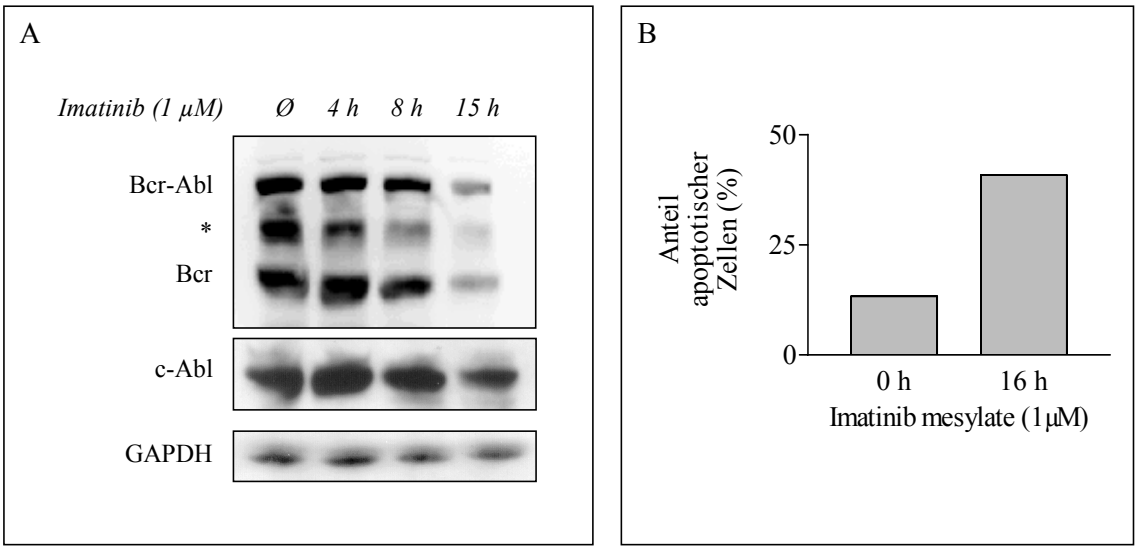


Abb.6.2: Behandlung von M07p210/e14a2-Zellen mit Imatinib mesylate führt zum Zelltod und parallel zu einer Abnahme des Abl-und Bcr-Proteinspiegels. Jeweils 4 Mio. M07p210/e14a2-Zellen pro Ansatz wurden mit Imatinib mesylate (1 µM) inkubiert. 0, 4 h, 8 h und 15 h nach Inhibitor-Zugabe wurden die Zellen geerntet und lysiert. **A**: Nachweis von Bcr-Abl, Bcr und c-Abl über eine Western-Blot-Analyse. Pro Ansatz wurden 100 µg Proteinlysat auf ein 7,5% SDS-Acrylamidgel aufgetragen. Für den Nachweis von Bcr-Abl und Bcr wurde der polyklonale Antikörper N-20 verwendet, der Nachweis von c-Abl erfolgte unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 8E9. Als Beladungskontrolle diente GAPDH. * Bcr-Abl-Degradationsprodukt. **B**: Durchflusszytometrische Untersuchung des Anteils apoptotischer Zellen mittels Annexin V-FITC-Färbung 0 h und 16 h nach Imatinib-Gabe.

6.1.2 *Bcr-Abl-e14a2*-RNAi durch direkte Transfektion von siRNA-Molekülen

Für die Ausarbeitung eines *in vitro*-Protokolls zur Induktion einer *Bcr-Abl*-RNAi mit Hilfe synthetischer siRNA-Moleküle wurden zwei verschiedene 21 nt (‚sense'-Strang)-23 nt (‚anti-sense'-Strang) lange asymmetrische siRNA-Moleküle (BAF7 und BAF9) verwendet. Die Zielsequenz beider siRNAs überspannte den Fusionsbereich der *Bcr*- und *Abl*-Sequenzen der *Bcr-Abl-e14a2*-mRNA (siehe Abb.6.3). Die siRNA BAF9 unterschied sich von der siRNA BAF7 nur darin, dass die *Bcr-Abl*-Zielsequenz der letzteren um eine Position in Richtung der *Bcr*-Sequenz versetzt war.

e14a2 - UUUAAGCAGAGUUCAA|AAGCCCUUCAGCGGCC -

BAF7

BAF9

Abb.6.3: Übersicht über die Zielsequenzen der gegen das humane Fusionsgen *Bcr-Abl-e14a2* gerichteten siRNAs. Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt der Nukleotidsequenz der *Bcr-Abl-e14a2*-mRNA im Bereich des Bruchpunkts. Die exakte Fusionsstelle zwischen *Abl*- und *Bcr*-Sequenz ist durch einen Längsstrich markiert. Der zum sense-Strang (21 nt) der jeweiligen siRNA homologe Sequenzbereich der *Bcr-Abl*-mRNA ist durch einen Pfeil markiert.

Die Übertragung der siRNA-Moleküle gelang durch Elektroporation der Zellen. Aufgrund der hohen Halbwertszeit von Bcr-Abl wurde die Behandlung mehrfach im Abstand von 24 h durchgeführt (vgl. 6.1.6). Mit *Bcr-Abl*-spezifischer siRNA (BAF7/BAF9) behandelte 32Dp210/e14a2-Zellen zeigten deutlich eine selektive Absenkung des Bcr-Abl-Proteingehalts unter das Niveau der Kontrollansätze (siehe Abbildung 6.4). Als Kontrolle wurden jeweils entsprechende siRNAs, aber mit drei Basenabweichungen zur Zielsequenz, verwendet (BAF8: 3 x ‚mismatch'-Kontrolle zu BAF7; BAF13: 3 x ‚mismatch'-Kontrolle zu BAF9). Eine Elektroporationskontrolle, die ohne siRNA elektroporierte Zellen umfasste, sollte eine Einflussnahme der Transfektionsmethode auf die Proteinexpression ausschließen. Mit Hilfe der Western-Blot-Analyse konnte außerdem sichergestellt werden, dass im Gegensatz zur *Bcr-Abl*-Expression sowohl die *Bcr*- als auch die *Abl*-Expression durch die siRNA-Behandlung unverändert blieb.

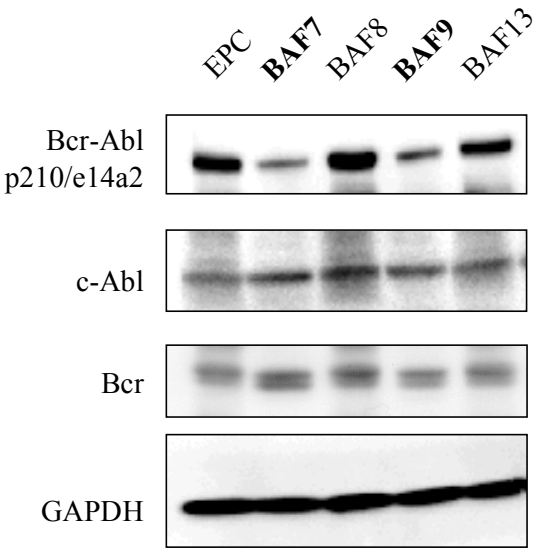


Abb.6.4: Die *Bcr-Abl*-RNAi führt zu einer signifikanten Abnahme des Bcr-Abl-Proteinspiegels in 32Dp210/e14a2-Zellen. Ergebnis einer Western-Blot-Analyse. 2,5 Mio. 32Dp210/e14a2-Zellen wurden zweimal im Abstand von 24 h mit 800 nM der angegebenen siRNA elektroporiert. BAF7/BAF9: *Bcr-Abl-e14a2*-spezifische siRNAs, fett gedruckt; BAF8/BAF13: jeweilige 3 x ‚mismatch'-Kontrolle. EPC: Elektroporationskontrolle. Bis zur zweiten Elektroporation wurde dem Medium mIL-3 beigesetzt, um eine Selektion zu verhindern. Nach weiteren 24 h ohne mIL-3-Zugabe wurden die Zellen geerntet und lysiert. Pro Ansatz wurden 100 µg Proteinlysat auf ein 7,5%-SDS-Acrylamidgel aufgetragen. Für den Nachweis von Bcr-Abl und c-Abl wurde der monoklonalen Antikörper 8E9 verwendet, der Nachweis von Bcr erfolgte unter Verwendung des polyklonalen Antikörpers N-20. Als Beladungskontrolle diente GAPDH.

Dieses Resultat konnte auch in der humanen Zelllinie M07p210/e14a2 reproduziert werden. Bereits 5 h nach einer ersten Übertragung *Bcr-Abl*-spezifischer siRNA-Moleküle (BAF7) in die Zellen konnte über eine quantitative ‚Light Cycler PCR' ein deutlicher Rückgang der *Bcr-Abl*-Transkriptmenge nachgewiesen werden (siehe Abb.6.5-A). 24 h nach zweimaliger siRNA-Transfektion, also drei Tage nach Beginn der siRNA-Behandlung, war die RNAi-Wirkung auch auf Proteinebene deutlich nachweisbar. Der Western-Blot zeigte eine starke Abnahme des Bcr-Abl-Proteinspiegels im Vergleich zu den Kontroll-Ansätzen (Abb.6.5-B). Begleitend war ein Rückgang der c-Abl-und Bcr-Proteinmenge erkennbar, wie er auch nach Behandlung von M07p210/e14a2-Zellen mit dem Bcr-Abl-spezifischen TK-Inhibitor Imatinib mesylate beobachtet werden konnte (siehe Abb.6.2).

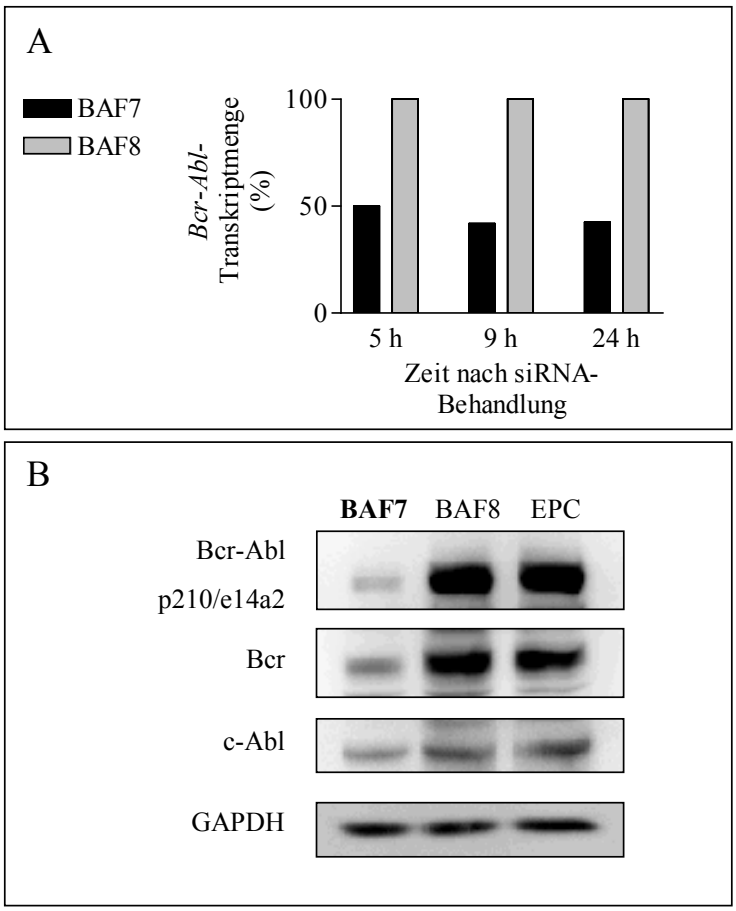


Abb.6.5: Die *Bcr-Abl*-RNAi führt zu einer Reduktion der *Bcr-Abl*-mRNA und -Proteinmenge in humanen M07p210/e14a2 Zellen. 4 Mio. M07p210/e14a2-Zellen wurden mit 800 nM siRNA elektroporiert. BAF7: *Bcr-Abl-e14a2*-spezifische siRNA, fett gedruckt; BAF8: entsprechende Kontroll-siRNA mit drei Basenabweichungen zur Zielsequenz. EPC: Elektroporationskontrolle. **A:** Quantitfizierung der *Bcr-Abl*-Transkriptmenge mit Hilfe der LightCycler-Technik. 5 h, 9 h und 24 h nach einmaliger siRNA-Behandlung wurden die Zellen pelletiert und lysiert. Mit Hilfe des ‚LightCycler t(9;22) Quantification kits' (Roche) wurde das *Bcr-Abl*/*G6PDH* Verhältnis quantifiziert. **B:** Ergebnis einer Western-Blot-Analyse: ~ 24 h nach der zweiten siRNA-Behandlung wurden die Zellen geerntet und lysiert. Pro Ansatz wurden 100 µg Gesamtproteinlysat auf ein 7,5%-Acrylamidgel aufgetragen. Für den Nachweis von Bcr-Abl und c-Abl wurde der monoklonale c-Abl-Antikörper 8E9 verwendet, der Nachweis von Bcr erfolgte unter Verwendung des polyklonalen Antikörpers N-20. Als Beladungskontrolle diente GAPDH.

6.1.3 Wirkung der *Bcr-Abl*-RNAi auf den zellulären Phänotyp

Nach erfolgreicher Hemmung der *Bcr-Abl*-Expression durch die direkte Übertragung von siRNA-Molekülen in die Zielzellen sollte die Auswirkung der RNAi-vermittelten Genstilllegung auf den Phänotyp der Zellen abgeschätzt werden. Dies geschah anhand einer Unter-

suchung von zellulären Merkmalen, die durch die Expression des *Bcr-Abl*-Onkogens beeinflusst werden.

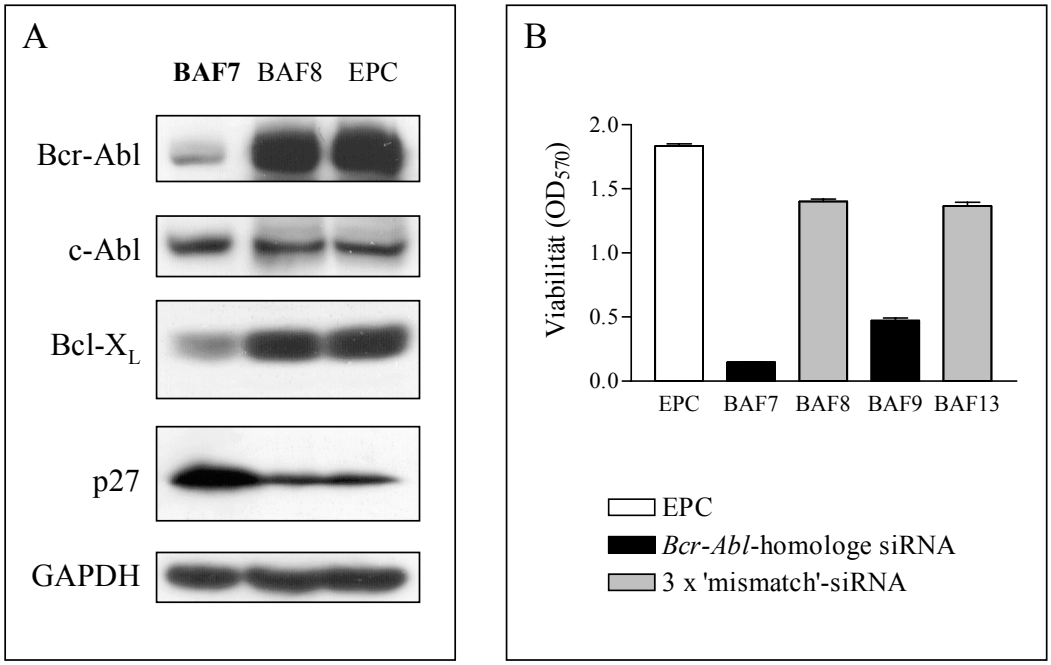


Abb.6.6: Eine Inaktivierung des humanen Onkogens *Bcr-Abl* durch RNAi revertiert den leukämischen Phänotyp. 2,5 Mio. 32Dp210/e14a2-Zellen wurden zweimal im Abstand von 24 h mit 800 nM der angegebenen siRNA elektroporiert. BAF7: *Bcr-Abl-e14a2*-spezifische siRNA (fett gedruckt), BAF8: 3 x ‚mismatch'-Kontrolle zu BAF7, EPC: Elektroporationskontrolle. Bis zur zweiten Elektroporation wurde dem Medium mIL-3 beigesetzt, um eine Selektion zu verhindern. Während der zweiten Elektroporation wurde allen Zellen mIL-3 entzogen. **A:** Dargestellt ist der Nachweis der Proteinexpression von c-Abl, Bcr-Abl, Bcl-X und p27, ~ 24 h nach der zweiten siRNA-Behandlung durch Western-Blot-Analyse. Pro Ansatz wurden 100 µg Gesamtproteinlysat auf ein SDS-Acrylamidgel aufgetragen. Für den Nachweis von Bcr-Abl und c-Abl wurde der monoklonale Antikörper 8E9 verwendet, für Bcl-X der monoklonale Anikörper 2H12 und für p27 der monoklonale Anikörper G173-524. Als Beladungskontrolle diente GAPDH. **B:** Ergebnis eines MTT-Viabilitäts Assays. Je 16600 Zellen wurden in 200 µl pro well einer 96well-Platte ausgesät. Dargestellt ist die Viabilität der Zellen der versch. Ansätze ~ 48 h nach der zweiten siRNA-Behandlung. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte ± SD von Dreifach-Ansätzen.

Um den leukämischen Phänotyp zu charakterisieren, wurde in 32Dp210/e14a2-Zellen die Menge zweier Proteine abgeschätzt, deren Präsenz bekanntermaßen durch Bcr-Abl beeinflusst wird: Bcl-X und p27. In Abb.6.6-A ist das Ergebnis dieser Untersuchung dargestellt. Analysiert wurde die Proteinmenge des anti-apoptotisch wirkenden Bcl-X und des Zellzyklusinhibitors p27, jeweils mit und ohne *Bcr-Abl*-RNAi-Wirkung. Tatsächlich spiegelte sich ein RNAi-bedingter Verlust von Bcr-Abl auch in der Proteinmenge dieser ‚downstream-target'-

Proteine wider. Zellen die mit der aktiven BAF7-siRNA behandelt wurden, zeigten parallel zur *Bcr-Abl*-Stilllegung auch einen Abfall im Bcl-X-Proteinspiegel und einen Anstieg des p27-Gehalts im Vergleich zu den Kontrollen.

Eine weitere durch die *Bcr-Abl*-Onkogenaktivität vermittelte Eigenschaft der in diesen Versuchen verwendeten Zellen ist die Fähigkeit, unabhängig von externen Wachstumsfaktoren zu proliferieren (vgl. Abb.6.1 und Abb.6.2). Eine durch RNAi verursachte Blockade der *Bcr-Abl*-Expression sollte sich also auch negativ auf Wachstum und Viabilität der Zellen auswirken.

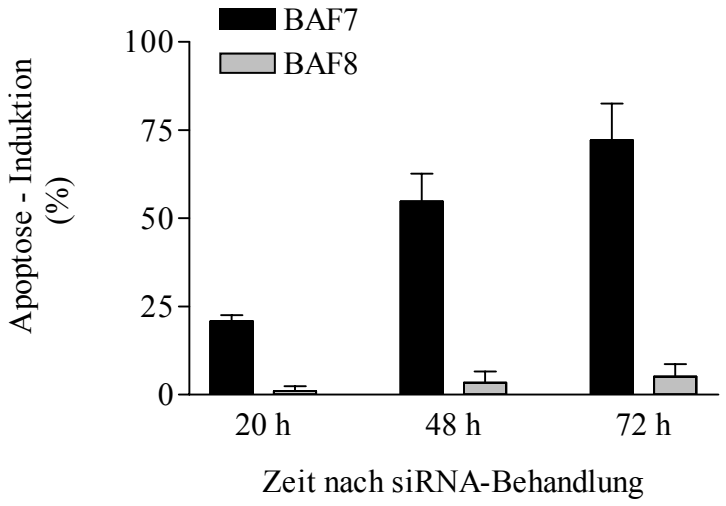


Abb.6.7: Eine *Bcr-Abl*-Inaktivierung durch RNAi führt zu einer Apoptoseinduktion in M07p210/e14a2-Zellen. Durchflusszytometrische Untersuchung des Anteils apoptotischer Zellen mittels Annexin V-FITC-Färbung. 4 Mio. M07p210/e14a2-Zellen wurden zweimal im Abstand von 24 h mit 800 nM siRNA elektroporiert und 24 h, 48 h und 72 h nach der 2. Elektroporation untersucht. BAF7: *Bcr-Abl-e14a2*-spezifische siRNA, BAF8: 3 x ‚mismatch'-Kontrolle zu BAF7. Die Werte sind relativ zur jeweiligen Elektroporationskontrolle (0%) angegeben. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte ± SD von drei unabhängigen Ansätzen.

Tatsächlich bewirkte eine erfolgreiche Hemmung der *Bcr-Abl*-Onkogenexpression durch RNAi sowohl bei den murinen als auch bei den humanen Zellen einen Rückgang der Zellviabilität. Bei den 32Dp210/e14a2-Zellen zeigte sich ~ 48 h nach zweimaliger Behandlung mit aktiven siRNAs ein Viabilitätsverlust von 92% (BAF7) bzw. 74% (BAF9) bezogen auf die Viabilität von Zellen der Elektroporationskontrolle (siehe Abb.6.6-B). M07p210/e14a2-Zellen reagierten auf den durch RNAi verursachten Bcr-Abl-Verlust mit Apoptose. 72 h nach zweifacher Behandlung mit der *Bcr-Abl*-spezifischen siRNA BAF7 zeigten die Zellen eine Apoptoseinduktion von 72% im Vergleich zu Zellen der Elektroporationskontrolle (siehe Abb.6.7).

6.1.4 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Die Transfektionseffizienz des in dieser Arbeit verwendeten siRNA-Elektroporations-protokolls wurde mit Hilfe fluoreszenzmarkierter siRNA-Moleküle bestimmt. Dazu wurden parentale 32D-Zellen gemäß dem beschriebenen Protokoll (vgl. 5.7.1) mit siRNA-FITC (800 nM) elektroporiert und der Anteil grünfluoreszierender Zellen am Durchflusszytometer bestimmt. Die so ermittelte Transfektionseffizienz lag bei > 80% (siehe Abb.6.8).

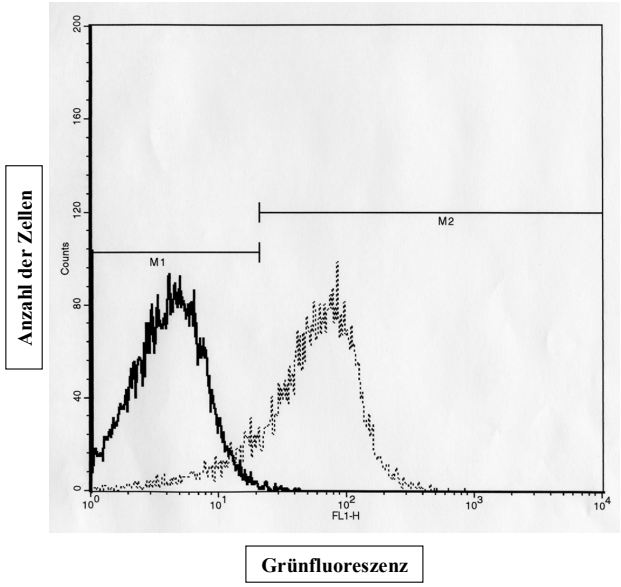


Abb.6.8: Bestimmung der Transfektionseffizienz mit Hilfe FITC-markierter siRNA. Ein Ansatz von 2,5 Mio. 32D-Zellen wurden mit 800 nM einer FITC-markierten siRNA (gestrichelte Linie) elektroporiert. Ein entsprechender Ansatz wurde ohne Zugabe von siRNA elektroporiert (durchgezogene Linie). Direkt im Anschluss wurde der Anteil grünfluoreszierender Zellen von insgesamt 15000 untersuchten Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

6.1.5 Kinetik der *Bcr-Abl*-RNAi

Um die Dauer der RNAi-Wirkung in den 32Dp210/e14a2-Zellen zu bestimmen, wurde der Bcr-Abl-Proteinspiegel 24 h, 48 h und 72 h nach einmaliger siRNA-Behandlung untersucht. Um eine Selektion zugunsten ineffizient transfizierter und daher weiterhin Bcr-abl positiver Zellen dieser schnell wachsenden Zelllinie zu verhindern, wurde dem Medium während des gesamten Versuchs mIL-3 zugesetzt. 24 h nach Transfektion der Zellen mit der Bcr-Abl-spezifischen siRNA BAF7 war ein deutlicher Bcr-Abl-Verlust im Vergleich zu dem Kontroll-

Ansatz erkennbar. 48 h nach der siRNA-Behandlung war dieser Effekt jedoch bereits stark abgeschwächt, und 72 h nach der siRNA-Behandlung war der Effekt völlig verschwunden: der Bcr-Abl-Proteinspiegel in den BAF7-behandelten Zellen hatte sich wieder vollständig dem der Kontrolle angeglichen (siehe Abb.6.9).

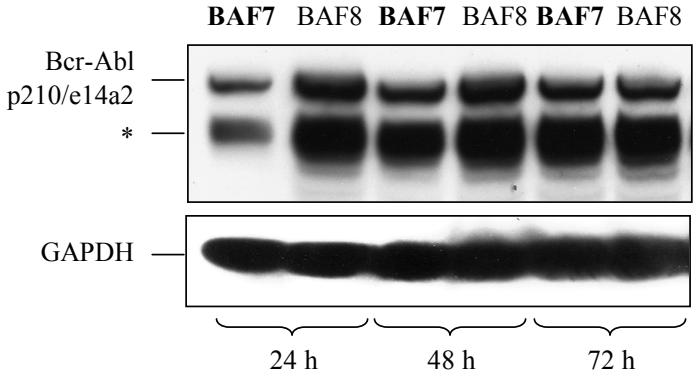


Abb.6.9: Der durch die direkte Übertragung von chemisch synthetisierten siRNAs erzielte RNAi-Effekt ist sehr transient. Western-Blot-Analyse der Bcr-Abl-Proteinmenge. 2,5 Mio. 32Dp210/e14a2-Zellen wurden einmal mit der angegebenen siRNA elektroporiert (800 nM). BAF7: *Bcr-Abl-e14a2*-spezifische siRNA, fett gedruckt; BAF8: 3 x ‚mismatch'-Kontrolle zu BAF7. Dem Medium wurde mIL-3 beigesetzt, um eine Selektion zu verhindern. Je 24 h, 48 h und 72 h nach siRNA-Behandlung wurde ein Teil der Zellen lysiert und 100 µg Gesamtproteinlysat auf ein 7,5%-Acrylamidgel aufgetragen. Der Nachweis von Bcr-Abl erfolgte unter Verwendung des monoklonalen Abl-Antikörpers 8E9. Als Beladungskontrolle diente GAPDH. * Bcr-Abl-Degradationsprodukt.

6.1.6 Eine längere siRNA-Exposition ist effizienter

Ein Vergleich der erzielten RNAi-Wirkung nach 1 x, 2 x und 4 x siRNA-Behandlung (jeweils im Abstand von 24 h) zeigte, dass eine wiederholte Behandlung zu effizienteren Ergebnissen führt (siehe Abb.6.10).

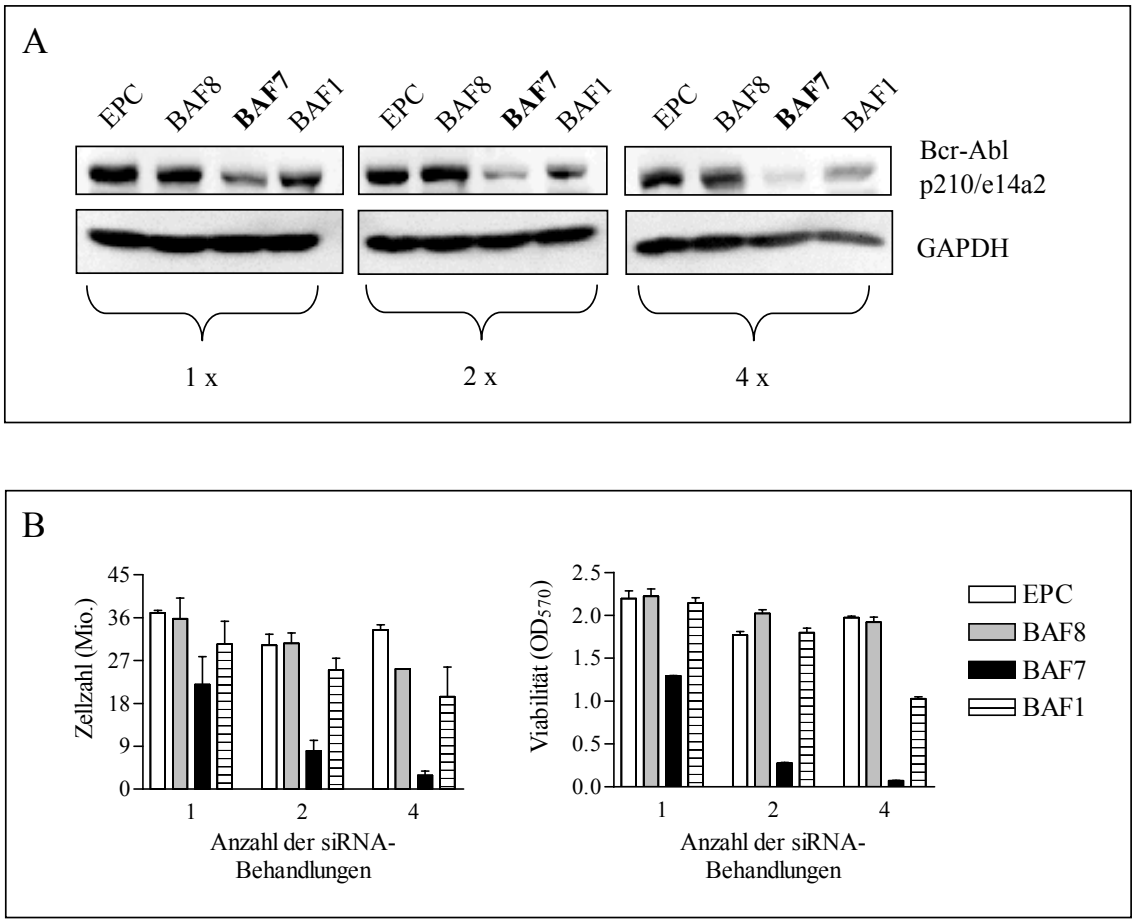


Abb.6.10: Eine wiederholte siRNA-Behandlung ist effizienter als eine einzelne Behandlung. 2,5 Mio. 32Dp210/e14a2-Zellen wurden 1 x, 2 x und 4 x im Abstand von 24 h mit der angegebenen siRNA (800 nM) elektroporiert. BAF7: *Bcr-Abl-e14a2*-spezifische siRNA, fett gedruckt; BAF8: 3 x ‚mismatch'-Kontrolle zu BAF7; BAF1: 1 x ‚mismatch'-siRNA zu BAF7; EPC: Elektroporationskontrolle. Die Zellzahl der einzelnen Ansätze wurde vor jeder Elektroporation wieder auf 2,5 Mio. reduziert. Bis zur jeweils letzten Elektroporation wurde dem Medium mIL-3 beigesetzt, um eine Selektion zu verhindern. Während der jeweils letzten Elektroporation wurde den Zellen mIL-3 entzogen. **A:** Western-Blot-Analyse der Bcr-Abl-Proteinmenge ~ 24 h nach der angegebenen Anzahl von siRNA-Behandlungen. Aufgetragen wurde 80 µg Gesamtproteinlysat. Als Beladungskontrolle diente GAPDH. **B: Linke Abbildung:** ~ 48 h nach siRNA-Behandlung wurde die Zellzahl in den einzelnen Ansätzen bestimmt. Die Ausgangszellzahl wurde vor jeder Elektroporation für jeden Ansatz auf 2,5 Mio Zellen eingestellt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte ± SD von zwei unabhängigen Versuchen. **Rechte Abbildung:** Ergebnis eines MTT-Viabilitäts-Assays. Je 18500 Zellen wurden in 200 µl pro well in eine 96well-Platte ausgesät. Dargestellt ist die Viabilität der Zellen der verschiedenen Ansätzen ~ 48 h nach der entsprechenden siRNA-Behandlung. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte ± SD von Dreifach-Ansätzen.

Für die Evaluation der Effizienz der RNAi diente sowohl die Auswirkung der jeweiligen Behandlung auf den Bcr-Abl-Proteinspiegel als auch der jeweils erzielte Viabilitätsverlust. Aus Abbildung 6.10-A geht hervor, dass bereits eine einzelne Behandlung mit der effizienten BAF7-siRNA ausreichte, um eine deutliche Reduktion des Bcr-Abl-Proteinspiegels zu bewirken. Trotz der transienten Natur der RNAi (vgl. Abb.6.9) genügte dieser Effekt, um die im MTT ermittelte Viabilität der Zellen auf ein Niveau von 59% relativ zu den Kontrollen (100%) abzusenken (Abb.6.10-B rechtes Diagramm). Nach viermaliger Transfektion mit BAF7 war Bcr-Abl im Western-Blot kaum noch nachweisbar. Parallel dazu führte die mehrfache Behandlung zu einem nahezu vollständigen Verlust der Viabilität der BAF7-behandelten Zellen. Die im MTT detektierbare Rest-Viabilität lag bei einem Niveau von 3,6% bezogen auf die der Kontrollen (100%).

Zu demselben Ergebnis gelangte man durch Bestimmung der Zellzahl 48 h nach der jeweiligen Behandlung. Abbildung 6.10-B (linkes Diagramm) zeigt, dass sowohl die mit der 3fachen ‚mismatch'-Kontrolle (BAF8) behandelten Zellen als auch die Zellen der Elektroporationskontrollen bereits 48 h nach der jeweiligen Elektroporation ihre Ausgangsmenge (2,5 Mio. Zellen) mindestens auf das 10fache (25 Mio. Zellen) expandiert hatten. Zellen die einmal mit der BAF7-siRNA behandelt worden sind, zeigten dagegen ein im Vergleich zu den Kontrollen um ~ 40% reduziertes Wachstum. 48 h nach vierfacher Behandlung war der Unterschied noch sehr viel deutlicher, mit nur noch knapp 3 Mio. Zellen in den BAF7-Ansätzen verglichen mit 25 Mio. (BAF8) bzw. 33 Mio. (EPC) Zellen in den Kontrollen. Das entspricht einer Wachstumsinhibition von etwa 90%.

6.1.7 Spezifität des RNAi-Effekts

Die hohe Spezifität des RNAi-Effektes konnte u.a. durch die Verwendung einer siRNA demonstriert werden (BAF1), die der *Bcr-Abl*-homologen siRNA BAF7 bis auf eine zentral lokalisierte Punktmutation entspricht. Diese wurde in den oben beschriebenen Versuchen mitgeführt (Abb.6.10). Tatsächlich genügte diese einzelne Basenabweichung von der *Bcr-Abl*-mRNA-Sequenz, um die siRNA-Wirkung deutlich abzuschwächen. Der Effizienz-Verlust zeigte sich sowohl auf Proteinebene als auch in der geringen Beeinträchtigung der Viabilität der BAF1-behandelten Zellen. So erzielte eine Behandlung mit der BAF1-siRNA einen im MTT gemessenen maximalen Viabilitätsverlust von 48% bezogen auf die Kontrollen. Im

Vergleich dazu lag der bei entsprechender Behandlung mit der vollständig homologen siRNA BAF7 erzielte Viabilitätsverlust bei 96,4% (Abb.6.10-B rechtes Diagramm).

Eine Untersuchung des Zellwachstums im Anschluss an die jeweilige siRNA-Behandlung unter nicht-selektiven Bedingungen gab einen Hinweis darauf, dass es sich bei der nach der BAF7-Behandlung beobachteten Proliferationshemmung um einen spezifischen, Bcr-Abl-abhängigen Effekt handelte. Falls der Rückgang des Wachstums der Zellen durch den Verlust von Bcr-Abl verursacht worden war, sollte dieser Effekt durch ständige Präsenz externer Zytokine im Wachstumsmedium aufgehoben werden können (vgl. Abb.6.1). Abb.6.11 zeigt eindeutig, dass der durch die *Bcr-Abl*-RNAi verursachte Viabilitätsverlust durch externe Gabe von mIL-3 vollständig kompensiert werden konnte.

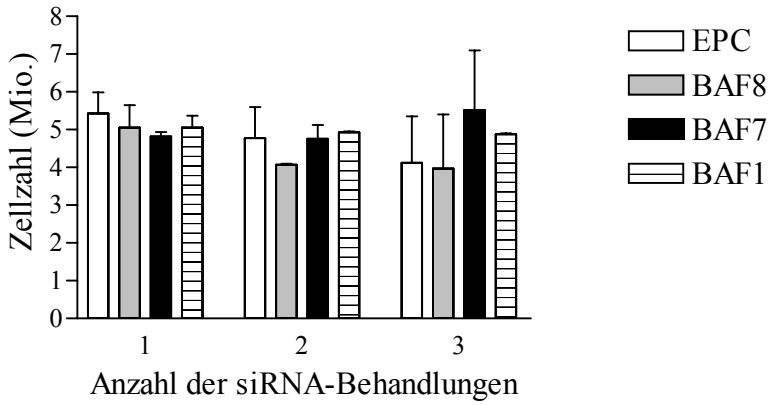


Abb.6.11: Der durch *Bcr-Abl*-RNAi verursachte Viabilitätsverlust kann durch Gabe externer Wachstumsfaktoren kompensiert werden. 2,5 Mio. 32Dp210/e14a2-Zellen wurden 1 x, 2 x und 3 x im Abstand von 24 h mit der angegebenen siRNA (800 nM) elektroporiert. BAF7: *Bcr-Abl-e14a2*-spezifische siRNA; BAF8: 3 x ‚mismatch'-Kontrolle zu BAF7; BAF1: 1 x ‚mismatch'-siRNA zu BAF7; EPC: Elektroporationskontrolle. 24 h nach jeder siRNA-Behandlung wurde die Zellzahl der einzelnen Ansätze bestimmt. Während des gesamten Experiments wurde dem Medium mIL-3 zugesetzt um eine Selektion zu verhindern. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte ± SEM von zwei unabhängigen Versuchen.

6.1.8 Dosisabhängigkeit des RNAi-Effekts

Abb.6.12 zeigt die Auswirkung einer zweifachen siRNA-Behandlung auf die Viabilität von 32Dp210/e14a2-Zellen. In diesem Experiment wurde ein Ansatz mit 800 nM siRNA behandelt, ein weiterer hingegen nur mit 1/4 der Menge (200 nM). Die niedrig dosierte Behandlung

führte zu einer schwächeren Hemmung der Viabilität der Zellen im Vergleich zur hohen Dosis. So resultierte eine zweifache Behandlung der Zellen mit 200 nM BAF7-siRNA in einem Viabilitäts-Rückgang von 32% bezogen auf die Elektroporationskontrolle, der Viabilitätsverlust bei zweifacher Behandlung mit 800 nM BAF7 lag jedoch deutlich höher (73%).

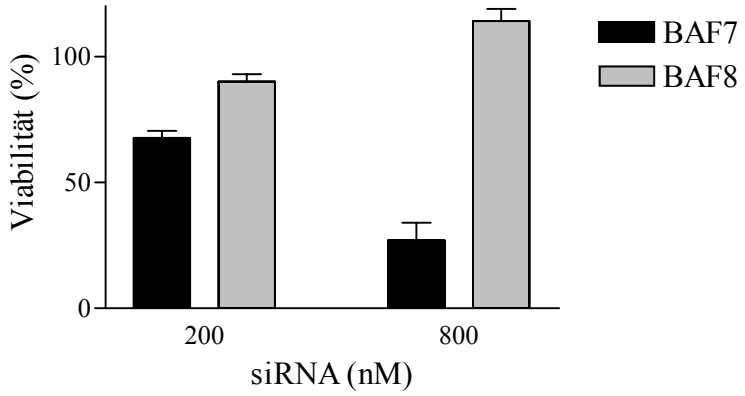


Abb.6.12: Dosisabhängigkeit der *Bcr-Abl*-RNAi. 2,5 Mio. 32Dp210/e14a2-Zellen wurden zweimal im Abstand von 24 h mit 800 nM bzw. 200 nM siRNA elektroporiert. Dem Medium wurde mIL-3 zugesetzt um eine Selektion zu verhindern. Während der zweiten Elektroporation wurde den Zellen mIL-3 entzogen. Dargestellt ist das Ergebnis eines MTT-Viabilitäts-Assays ~ 40 h nach der zweiten siRNA-Behandlung (relativ zur EPC). BAF7: *Bcr-Abl*-spezifische siRNA. BAF8: 3 x ‚mismatch'-Kontrolle zu BAF7. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte ± SD von sechs Werten.

6.1.9 Untersuchung des RNAi-Effekts mit Hilfe eines Reportergen-Systems

In den in dieser Arbeit verwendeten 32Dp210/e14a2-Zellen bildet das humane Onkogen *Bcr-Abl* zusammen mit dem Reportergen *eGfp* eine Transkriptionseinheit. Beide Gene werden über eine gemeinsame mRNA transkribiert. Die Translation dagegen erfolgt getrennt und führt so zur Bildung zweier unabhängiger Proteine. Dabei geht die Translation des Bcr-Abl-Proteins von der mRNA-Cap Struktur aus, während die Translation des eGfps von einer internen ribosomalen Bindungssequenz (IRES) aus initiiert wird (vgl. Abb.5.2). Da die RNAi über eine Degradation der mRNA des jeweiligen Zielgens wirksam wird, war zu erwarten, dass eine gegen *Bcr-Abl* gerichtete siRNA nicht nur zu einer Reduktion des Bcr-Abl-Proteinspiegels, sondern parallel auch zu einer Abnahme des eGfp-Reporterproteins führen sollte.
Eine Überprüfung der Grünfluoreszenz der Zellen nach Behandlung mit der kompetenten siRNA BAF7 im Fluoreszenzmikroskop zeigte tatsächlich einen deutlichen Rückgang der

eGfp-Expression im Vergleich zu Zellen, die mit der 3 x ‚mismatch'-Kontrolle (BAF8) behandelt worden waren (siehe Abb.6.13-A). Diese Beobachtung konnte in nachfolgenden durchflusszytometrischen Untersuchungen bestätigt werden.
Dabei zeigte sich auch mit diesem Nachweisverfahren, dass eine längere siRNA-Exposition der Zellen zu einem stärkeren ‚Silencing'-Effekt führte. So reduzierte eine einmalige BAF7-Behandlung die Grünfluoreszenz der behandelten Zellpopulation um etwa 42%, während eine vierfache Behandlung eine Reduktion um 71% bewirkte (jeweils bezogen auf die Grünfluoreszenz der Zellpopulation der Elektroporationskontrolle (100%); siehe Abb.6.13-C).

Aus den durchflusszytometrischen Daten ließ sich des Weiteren erkennen, dass sich auch nach wiederholter Elektroporation der Zellen mit BAF7 die gesamte Zellpopulation in einen niederen Fluoreszenzbereich verlagerte. Daraus lässt sich schließen, dass die siRNA-Behandlung nahezu alle Zellen in gleichem Maße erreicht (siehe Abb.6.13-B).

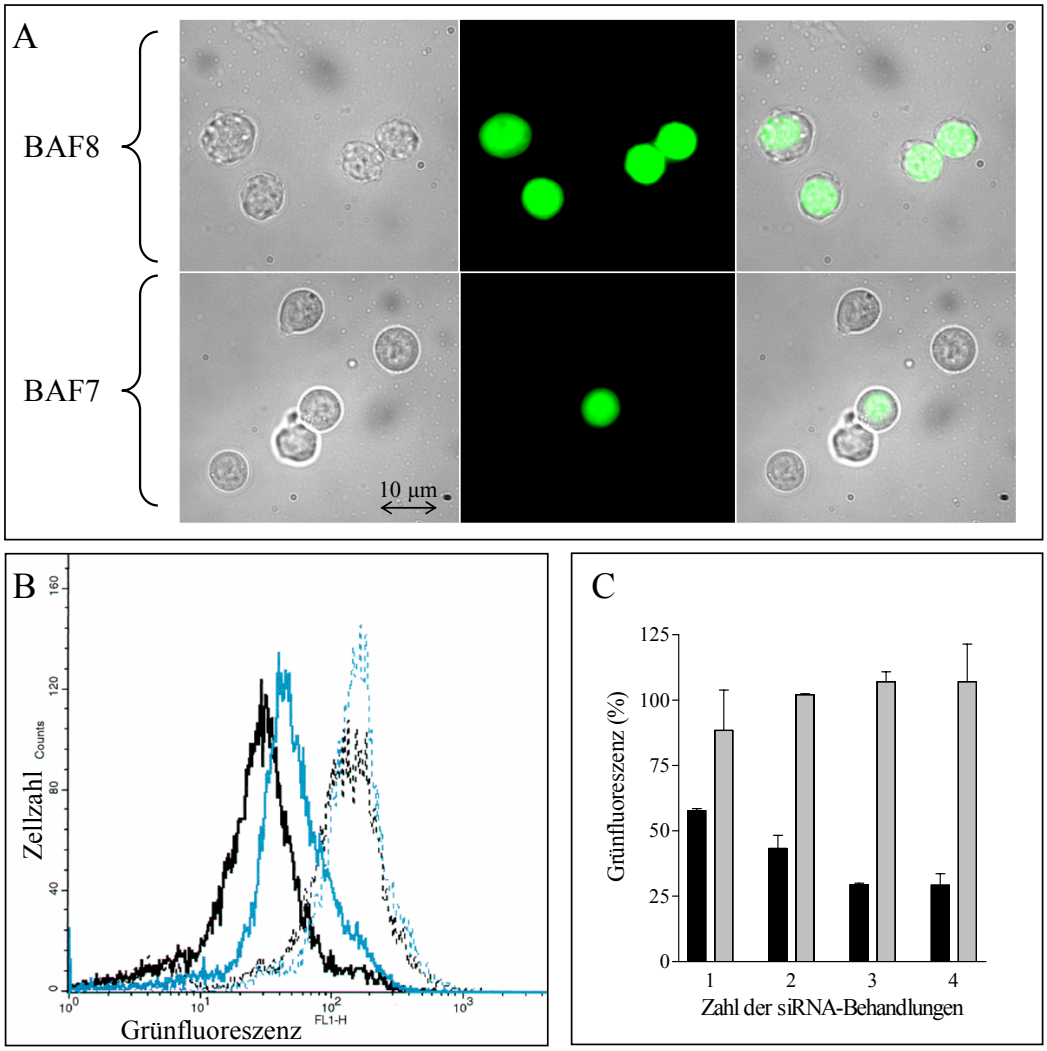


Abb.6.13: Untersuchung der *Bcr-Abl*-RNAi mit Hilfe eines Reportergen-Systems. In den 32Dp210/e14a2-Zellen wird das *Bcr-Abl*-Gen zusammen mit dem Reportergen *eGfp* über eine (bicistronische) mRNA transkribiert. 2,5 Mio. Zellen wurden mit der angegebenen siRNA (800 nM) elektroporiert. BAF7: *Bcr-Abl*-spezifische siRNA; BAF8: 3 x ‚mismatch'-Kontrolle zu BAF7. **A:** Aufnahme am Fluoreszenzmikroskop (Vergrößerung: 630 x) ~ 24 h nach 2 x Behandlung mit BAF8 (oben) und BAF7 (unten). Links: die Durchlichtaufnahme des jeweils gewählten Bildausschnitts. Mitte: Aufnahme der Gfp-Fluoreszenz der Zellen. Rechts: Die Überlagerung von Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahme. **B:** Durchflusszytometrische Bestimmung der Grünfluoreszenz der Gesamtpopulation der behandelten Zellen ~ 24 h nach 1 x Behandlung (blau) und 4 x Behandlung (schwarz) mit BAF7 (durchgezogene Linie) bzw. BAF8 (gestrichelte Linie). **C:** Durchflusszytometrische Bestimmung der relativen mittleren Grünfluoreszenz 15000 gemessener Zellen nach *Bcr-Abl*-RNAi. Die Messung erfolgte ~ 24 h nach der jeweiligen Behandlung mit BAF7 (schwarze Balken) und BAF8 (graue Balken). Die Werte sind auf die entsprechende Elektroporationskontrolle (100%) bezogen. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte ± SD von drei unabhängigen Ansätzen.

6.2. *Bcr-Abl-e13a2*-RNAi

Bei nahezu allen Patienten mit typischer CML findet sich die $p210^{Bcr\text{-}Abl}$-Proteinvariante. Diese kann aber durch Translation zweier verschiedener *Bcr-Abl*-Transkripte entstehen, die als *e14a2* und *e13a2* bezeichnet werden. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde exemplarisch anhand der *Bcr-Abl-e14a2*-Transkripvariante ein *in vitro-Bcr-Abl*-RNAi-Protokoll etabliert. Dieses Verfahren sollte nun auf die zweite für die CML typische Transkriptvariante *(e13a2)* ausgeweitet werden.

Als Versuchssystem wurde eine mit dem humanen *Bcr-Abl-e13a2*-Gen stabil transfizierte 32D-Zelllinie gewählt. Diese 32Dp210/e13a2-Zellen zeichneten sich durch faktorunabhängiges Wachstum aus. Wie Abb.6.14 zeigt führte ein Verlust der Bcr-Abl-Aktivität durch Gabe des Bcr-Abl-TK-Inhibitors Imatinib mesylate zum Absterben der Zellen. Der so verursachte Zelltod konnte aber durch Zugabe von mIL-3 zum Kulturmedium kompensiert werden. Die Proliferationsrate der Zellen lag bei etwa 1,5 Zyklen pro Tag.

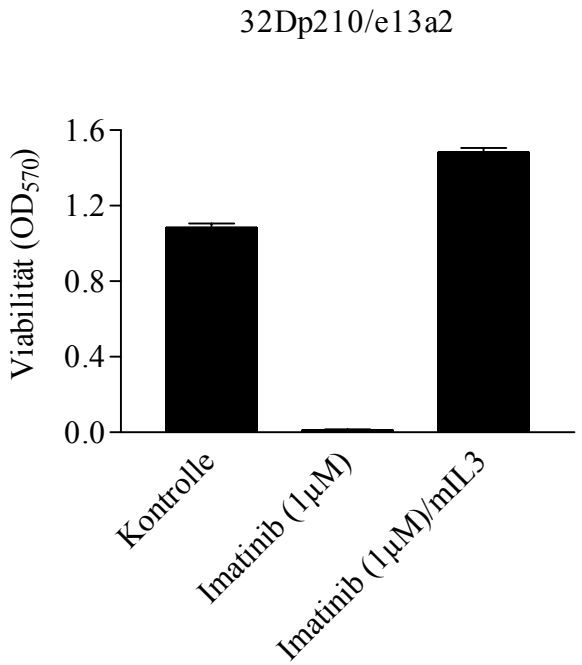


Abb.6.14: 32Dp210/e13a2-Zellen proliferieren in Abwesenheit externer Wachstumsfaktoren abhängig von Bcr-Abl. 16000 32Dp210/e13a2-Zellen wurden ~ 48 h entweder mit Imatinib mesylate (1 µM)/ohne mIL-3, mit Imatinib mesylate (1 µM)/+ mIL-3 oder ohne jeglichen Zusatz inkubiert. Anschließend wurde die Viabilität der Zellen mit Hilfe einer MTT-Viabilitätsanalyse bestimmt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte ± SD von Dreifach-Ansätzen.

Für die *Bcr-Abl-e13a2*-RNAi wurden insgesamt vier siRNAs mit leicht variierenden Zielsequenzen getestet. In jedem Fall überspannte die Sequenz der verwendeten siRNA-Varianten die Bruchpunkt-Region der *Bcr-Abl-e13a2*-mRNA (siehe Abb.6.15).

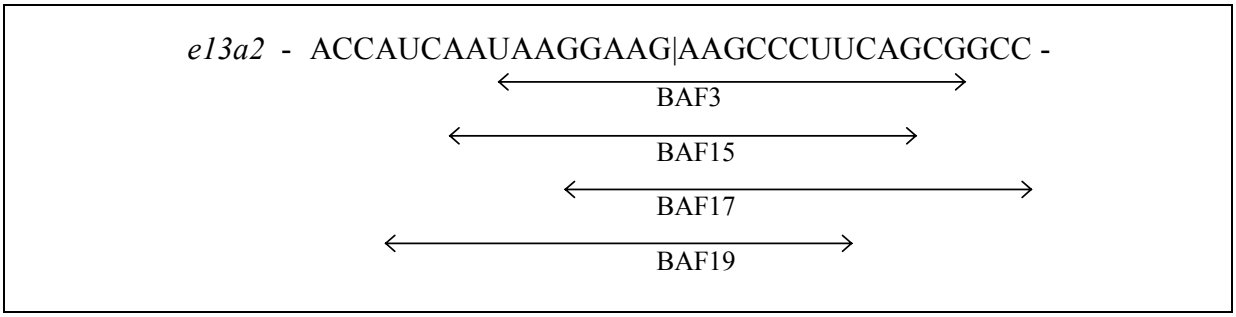


Abb.6.15: Übersicht über die Zielsequenzen der verwendeten siRNAs, die gegen das humane Fusionsgen *Bcr-Abl-e13a2* gerichtet sind. Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt der Nukleotidsequenz der *Bcr-Abl-e13a2*-mRNA im Bereich des Bruchpunkts. Die exakte Fusionsstelle zwischen *Abl*- und *Bcr*- Sequenz ist durch einen Längsstrich markiert. Die Sequenz, die dem ‚sense'-Stang der jeweiligen siRNA (21 nt) entspricht ist durch Pfeile markiert.

Eine direkte Transfektion der vier siRNA-Varianten BAF3, BAF15, BAF17 und BAF19 in 32Dp210/e13a2-Zellen gab Aufschluss über deren Effizienz. Wie Abb.6.16 zeigt induzierten nur zwei der vier getesteten siRNAs effektiv eine *Bcr-Abl*-Inaktivierung. So bewirkte nur eine Behandlung mit den siRNA-Molekülen BAF15 und BAF19 eine erhebliche Reduktion des Bcr-Abl-Proteinspiegels im Vergleich zu den Kontrollen (EPC/BAF9) (Abb.6.16-A). Der Verlust von Bcr-Abl wiederum verursachte bei den Zellen dieser Ansätze einen deutlichen Rückgang der Viabilität (Abb.6.16-B). Die Zellen, die mit den nicht-aktiven siRNAs BAF3 und BAF17 behandelt worden waren, zeigten dagegen keine Beeinträchtigung des Bcr-Abl-Proteinspiegels und folglich auch keine Beeinflussung der Viabilität.

Des Weiteren bestätigte sich auch in diesen Versuchen die Beobachtung, dass eine mehrfache Behandlung für eine effiziente *Bcr-Abl*-Hemmung notwendig ist (vgl. 6.1.6). So hatte eine einmalige siRNA-Behandlung noch keinen signifikanten Einfluss auf den Bcr-Abl-Proteinspiegel und die Viabilität der Zellen, eine dreifache Behandlung dagegen führte zu einer ausgeprägten Bcr-Abl-Reduktion und damit verbunden zu einem Viabilitätsverlust von 90,3% (BAF15) bzw. 86,4% (BAF19) bezogen auf die Viabilität der Elektroporationskontrolle.

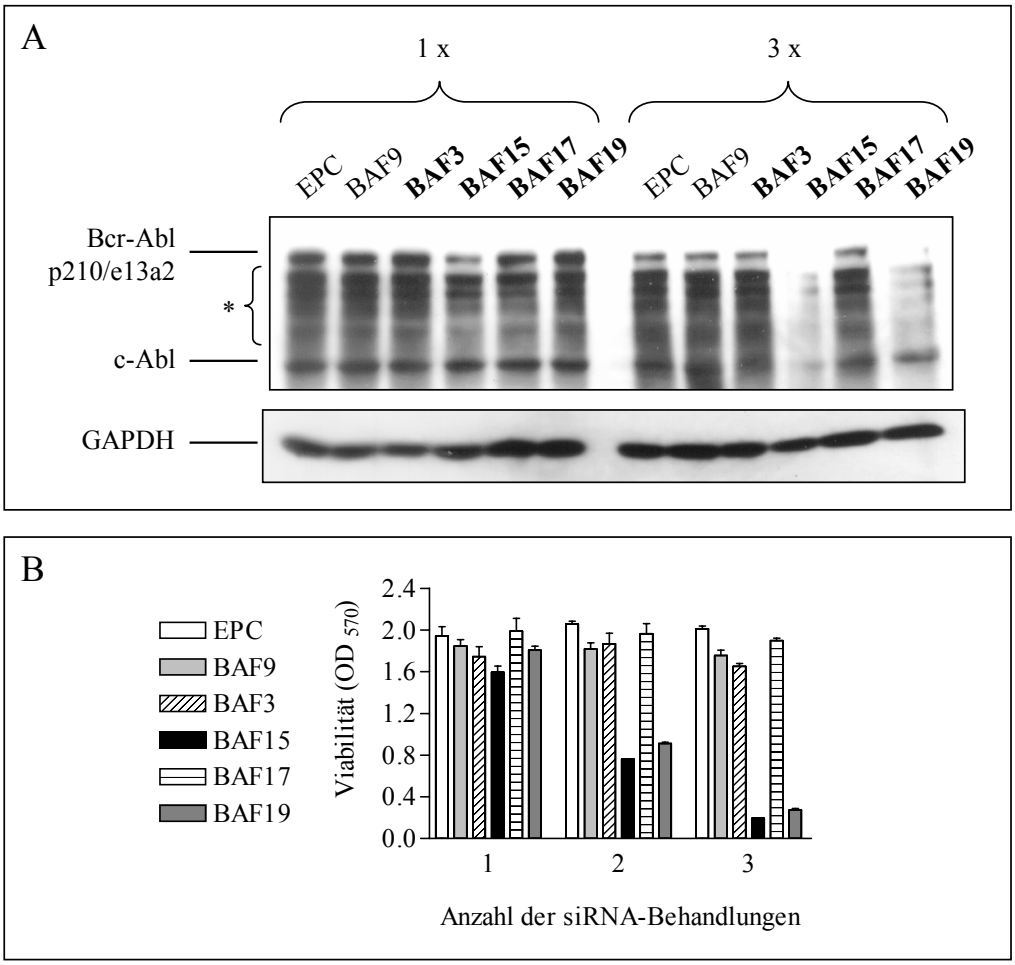


Abb.6.16: Die getesteten *Bcr-Abl-e13a2*-spezifischen siRNAs unterscheiden sich in ihrer Effizienz. ~ 2,5 Mio. 32Dp210/e13a2-Zellen wurden einmal bis dreimal im Abstand von 24 h mit 800 nM der angegebenen siRNA elektroporiert. BAF3/BAF15/BAF17/BAF19: *Bcr-Abl-e13a2*-spezifische siRNAs, fett gedruckt; BAF9 *Bcr-Abl-e14a2*-spezifische siRNA als Kontrolle, EPC: Elektroporationskontrolle. Dem Medium wurde mIL-3 beigesetzt, um eine Selektion zu verhindern. Während der jeweils letzten Elektroporation wurde den Zellen mIL-3 entzogen. **A:** Western-Blot-Analyse des Bcr-Abl-Proteinspiegels. Die Zellen wurden ~ 24 h nach der jeweils angegebenen Anzahl von siRNA-Behandlung geerntet und lysiert. Pro Ansatz wurden 50 µg Gesamtproteinlysat auf ein 7,5%-Acrylamidgel aufgetragen. Für den Nachweis von Bcr-Abl wurde der monoklonale c-Abl-Antikörper 8E9 verwendet. Als Beladungskontrolle diente GAPDH. * Bcr-Abl-Degradationsprodukte. **B:** Ergebnis eines MTT-Viabilitäts-Assays. Je 25000 Zellen wurden in 200 µl pro well einer 96well-Platte ausgesät. Dargestellt ist die Viabilität der Zellen der versch. Ansätze ~ 48 h nach der jeweils angegebenen siRNA-Behandlung. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte ± SD von Dreifach-Ansätzen.

6.3. *Bcr-Abl-e1a2*-RNAi

Eine weitere für das Krankheitsbild der Leukämie bedeutende Bcr-Abl-Variante ist $p190^{Bcr-Abl}$. Das zugehörige Transkript wird als *Bcr-Abl-e1a2* bezeichnet. $p190^{Bcr-Abl}$ kommt zwar nur sehr selten bei Patienten mit CML oder Akuter Myeloischer Leukämie (AML) vor, wird aber bei etwa einem Drittel der Patienten mit Philadelphia-Chromosom positiver (Ph^+)-Akuter Lymphatischer Leukämie (ALL) exprimiert (Ravandi *et al.,* 1999). Die Expression von *Bcr-Abl* wirkt sich bei diesen Patienten deutlich negativ auf die Heilungschancen aus. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es daher, zu überprüfen, ob auch diese dritte, klinisch relevante *Bcr-Abl*-Variante durch RNAi gehemmt werden kann.

Für die *Bcr-Abl-e1a2*-RNAi-Versuche wurde die murine hämatopoetische Zelllinie 32D mit dem humanen *Bcr-Abl-e1a2*-Gen stabil transfiziert. Die entstandene 32Dp210/e1a2-Zelllinie zeichnete sich durch faktorunabhängiges Wachstum aus. Ein Verlust der Bcr-Abl-Aktivität durch Gabe des Bcr-Abl-Kinase Inhibitors Imatinib mesylate führte zum Absterben der Zellen. Der Zelltod konnte aber durch Zugabe von mIL-3 zum Kulturmedium verhindert werden (Abb.6.17). Die Proliferationsrate der Zellen lag bei etwa einem Zyklus pro Tag.

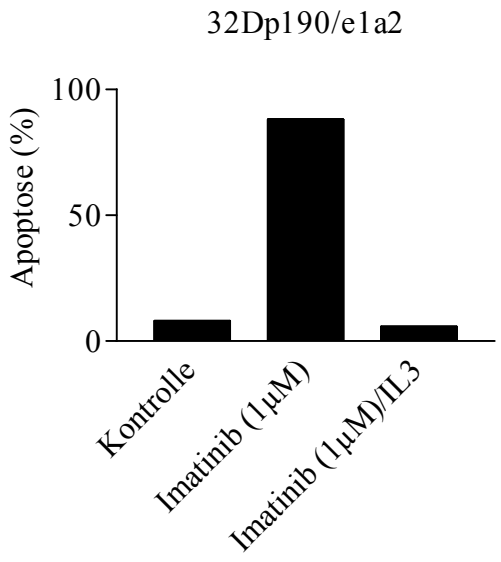


Abb.6.17: 32Dp210/e1a2-Zellen proliferieren in Abwesenheit externer Wachstumsfaktoren abhängig von Bcr-Abl. 250 000 32Dp190/e1a2-Zellen wurden ~ 19 h entweder mit Imatinib mesylate (1 µM)/ohne mIL-3, mit Imatinib mesylate (1µM)/+ mIL-3 oder ohne jeglichen Zusatz inkubiert. Der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen wurde nach AnnexinV-FITC-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt.

Für die *Bcr-Abl-e1a2*-RNAi wurden zwei siRNA-Moleküle mit leicht variierenden Zielsequenzen ausgewählt. Die Sequenz dieser siRNA-Varianten überspannte dabei die exakte Fusionsstelle der *Bcr*- und *Abl*-Sequenzen der *Bcr-Abl-e1a2*-mRNA (siehe Abb.6.18).

Abb.6.18: Übersicht über die Zielsequenzen der verwendeten siRNAs, die gegen das humane Fusionsgen *Bcr-Abl-e1a2* gerichtet sind. Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt der Nukleotidsequenz der *Bcr-Abl-e1a2*-mRNA im Bereich des Bruchpunkts. Die exakte Fusionsstelle zwischen *Abl*-und *Bcr*-Sequenz ist durch einen Längsstrich markiert. Die zum ‚sense'-Stang der jeweiligen siRNA (21 nt) homologe *Bcr-Abl*-Sequenz ist durch Pfeile markiert.

Die Überprüfung der Effektivität der beiden siRNAs erfolgte durch Elektroporation von 32Dp190/e1a2-Zellen mit 800 nM der entsprechenden Moleküle. Abb.6.19 zeigt, dass nur die Behandlung mit der BAF22-siRNA zu einer Gen-Inaktivierung führte. So war nur in Zellen, die mit BAF22 behandelt wurden, ~ 24 h nach zweimaliger Behandlung eine deutliche Reduktion des Bcr-Abl-Proteinspiegels im Western-Blot erkennbar (Abb.6.19-A). Erwartungsgemäß zeigten auch nur die Zellen dieses Ansatzes einen Rückgang der Viabilität (Abb.6.19-B). Die Zellen, die mit der nicht-aktiven siRNA BAF24 behandelt worden waren, wiesen dagegen keine Beeinträchtigung des Bcr-Abl-Proteinspiegels auf und folglich auch keinen Viabilitätsverlust im Vergleich zu den Kontrollen (EPC/BAF9/BAF19).

Auch in diesen Versuchen bestätigte sich die Beobachtung, dass eine längere Wirkdauer der siRNA, z.B. durch mehrfache Behandlung, für eine effiziente *Bcr-Abl*-Hemmung notwendig war (vgl. 6.1.6). Während eine einmalige Behandlung mit der effektiven siRNA BAF22 zwar eine erkennbare Bcr-Abl-Reduktion bewirkt, zeigten die entsprechenden Zellen im MTT-Test nur eine leichte Beeinträchtigung ihrer Viabilität. So war diese 48 h nach einmaliger BAF22-Behandlung nur um 35% geringer als die der EPC (100%). Eine zweifache BAF22-Behandlung dagegen bewirkte einen nahezu vollständigen Rückgang von Bcr-Abl verbunden mit einem Viabilitätsverlust von ~ 85% bezogen auf das Niveau der Elektroporationskontrolle (100%).

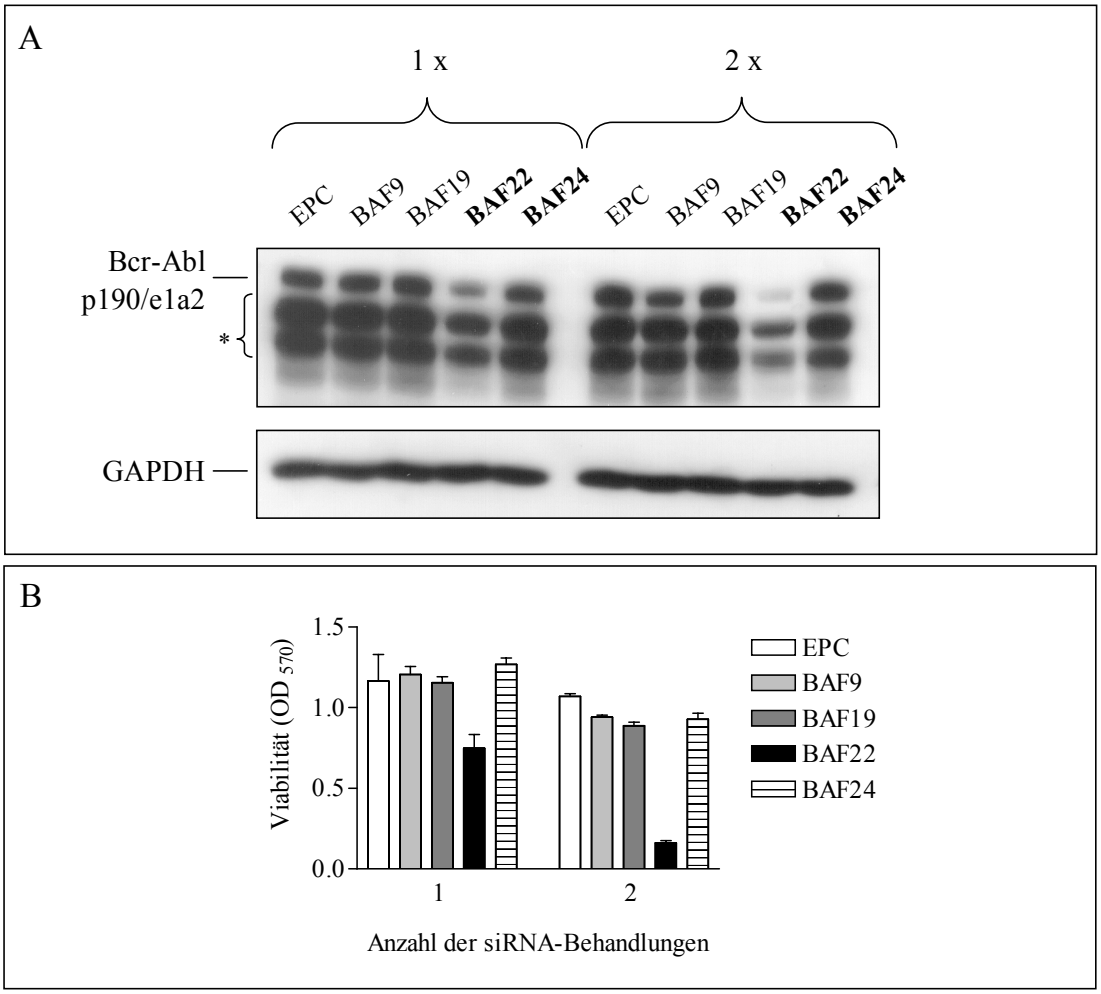


Abb.6.19: Die zwei getesteten *Bcr-Abl-e1a2*-siRNAs sind unterschiedlich effizient. 4 Mio. 32Dp190/e1a2-Zellen wurden einmal und zweimal im Abstand von 24 h mit der angegebenen siRNA (800 nM) elektroporiert. BAF22/BAF24: *Bcr-Abl-e1a2*-spezifische siRNAs, fett gedruckt; BAF9: *Bcr-Abl-e14a2*-spezifische siRNA als Kontrolle, BAF19: *Bcr-Abl-e13a2*-spezifische siRNA als Kontrolle EPC: Elektroporationskontrolle. Dem Medium wurde mIL-3 beigesetzt, um eine Selektion zu verhindern. Während der jeweils letzten Elektroporation wurde den Zellen mIL-3 entzogen. **A:** Western-Blot-Analyse des Bcr-Abl-Proteinspiegels. Die Zellen wurden ~ 24 h nach der jeweils angegebenen Anzahl von siRNA-Behandlung geerntet und lysiert. Pro Ansatz wurden 60 µg Gesamtproteinlysat auf ein 7,5%-Acrylamidgel aufgetragen. Für den Nachweis von Bcr-Abl wurde der monoklonale Abl-Antikörper 8E9 verwendet. Als Beladungskontrolle diente GAPDH. * Bcr-Abl-Degradations-produkte. **B:** Ergebnis eines MTT-Viabilitäts-Assays. Je 32000 Zellen wurden in 200 µl pro well einer 96well-Platte ausgesät. Dargestellt ist die Viabilität der Zellen der versch. Ansätze ~ 48 h nach der jeweils angegebenen siRNA-Behandlung. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte ± SD von Dreifach-Ansätzen.

6.4. Sensibilisierung *Bcr-Abl*$^{+}$-Zellen gegenüber klinischen Therapeutika durch RNAi

6.5.1. Sensibilisierung gegenüber Imatinib und γ-Bestrahlung.

Im folgenden Teil der Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern sich eine Reduktion des Bcr-Abl-Proteinspiegels durch RNAi auf die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber klinischen Therapeutika auswirkt. Dazu wurde im Anschluss an die *Bcr-Abl*-RNAi-Induktion in 32Dp210/e14a2-Zellen eine Bestimmung der Sensitivität gegenüber dem Bcr-Abl-TK-Inhibitor Imatinib mesylate oder γ-Bestrahlung durchgeführt. Da die *Bcr-Abl*-RNAi wie bereits in 6.1.3 beschrieben an sich schon sehr effektiv die Proliferation der betroffenen Zellen inhibiert, wurden für die Detektion möglicher synergistischer Effekte suboptimale siRNA-Konzentrationen eingesetzt (200 nM, vgl. 6.1.8). Die Ergebnisse sind in Abb.6.20 zusammengefasst. Eine suboptimale Hemmung der *Bcr-Abl*-Expression (siRNA: 200 nM) reichte allein schon aus, um einen erkennbaren Abfall der Viabilität zu bewirken (vgl. Ausgangswerte auf der y-Achse). Die mit der effektiven siRNA BAF7 behandelten Zellen reagierten außerdem um mehr als das Dreifache sensitiver auf Imatinib mesylate als die entsprechenden Kontrollen (BAF8, EPC). Die aus Abb.6.20-A ermittelten IC_{50}-Werte für den Inhibitor lagen entsprechend bei 0,08 µM für die BAF7-behandelten Zellen und bei 0,27 µM für die Kontrollen (BAF8, EPC). Zusätzlich zu einer Sensibilisierung gegenüber Imatinib konnte auch eine stärkere Reaktion der Zellen auf γ-Bestrahlung nachgewiesen werden (Abb.6.20-B). So lag die ermittelte Bestrahlungsdosis, die notwendig war, um die Hälfte der behandelten Zellen abzutöten, bei den BAF7-behandelten Zellen bei 2,5 Gy. Bei der BAF8-behandelten Kontrolle dagegen waren dafür ~ 2,5-mal höhere Bestrahlungsdosen erforderlich (6 Gy).

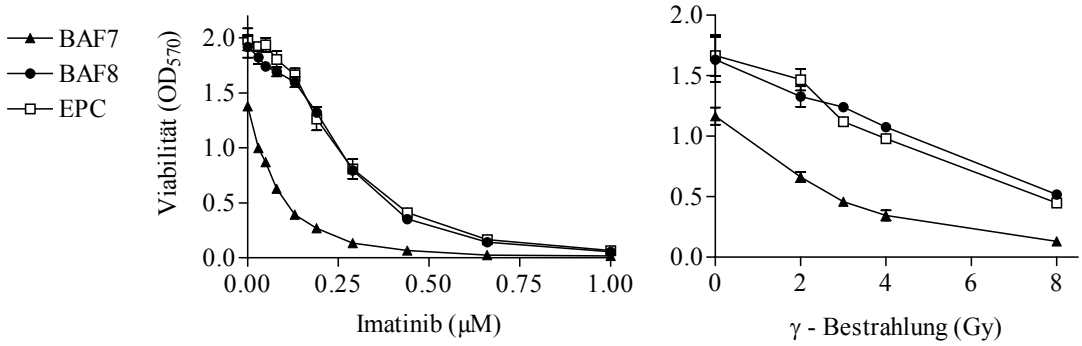


Abb.6.20: Die Hemmung der *Bcr-Abl*-Expression durch RNAi führt zu einer Sensibilisierung von 32Dp210/e14a2-Zellen gegenüber Imatinib und γ-Bestrahlung. Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines MTT-Viabilitäts-Assays. 2,5 Mio. 32Dp210/e14a2-Zellen wurden zweimal im Abstand von 24 h mit der angegebenen siRNA (200 nM) elektroporiert. BAF7: *Bcr-Abl*-spezifische siRNA; BAF8: 3 x ‚mismatch'-Kontrolle zu BAF7; EPC: Elektroporationskontrolle. Bis zur zweiten Elektroporation wurde dem Medium mIL-3 beigesetzt, um eine Selektion zu verhindern, und dann durch waschen der Zellen entfernt. Im Anschluss an die zweite siRNA-Behandlung wurden pro Ansatz etwa 15000 Zellen, ohne Zugabe von mIL-3, in 200 µl pro well einer 96well-Platte ausgesät und mit den angegebenen Imatinib-Konzentrationen (µM) versetzt, bzw. der angegebenen Strahlendosis (Gy) ausgesetzt. Dargestellt ist die Viabilität der Zellen ~ 40 h nach der jeweiligen Behandlung. Die Abbildungen zeigen jeweils die Mittelwerte ± SD von Dreifach-Ansätzen.

Vergleichbare Resultate ergaben sich aus anschließenden Versuchen, die mit den humanen M07p210/e14a2-Zellen durchgeführt wurden. Auch hier ließ sich nachweisen, dass eine Hemmung der *Bcr-Abl*-Expression durch RNAi zu einer verstärkten Sensibilität gegenüber dem Bcr-Abl-TK-Inhibitor Imatinib führt. So lag die durch Inkubation mit niedrigen Dosen von Imatinib ausgelöste Apoptoserate bei den BAF7-behandelten Zellen bei 11,3%, wohingegen bei den Kontrollen mit derselben Behandlung nur 1,4% (EPC) und 3,2% (BAF8) Apoptose induziert wurde (siehe Abb.6.21).

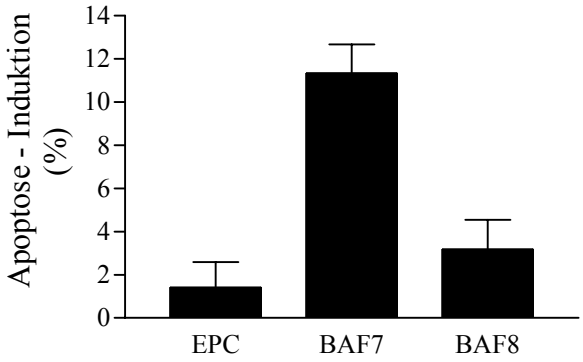


Abb.6.21: Eine Absenkung des Bcr-Abl-Proteinspiegels durch RNAi führt zu einer Sensitivierung humaner M07p210/e14a2-Zellen gegenüber Imatinib mesylate. Durchflusszytometrische Untersuchung des Anteils apoptotischer Zellen nach Annexin V-FITC-Färbung. M07p210/e14a2-Zellen wurden zweimal im Abstand von 24 h mit der bezeichneten siRNA elektroporiert und mit Imatinib mesylate (0,05 µM) inkubiert. BAF7: *Bcr-Abl*-spezifische siRNA; BAF8: 3 x ‚mismatch'-Kontrolle zu BAF7; EPC: Elektroporationskontrolle. Die Untersuchung erfolgte ~ 21 h nach der letzten siRNA-Behandlung. Dargestellt ist die zusätzliche Apoptose der Zellen in den mit Imatinib mesylate behandelten Ansätzen gegenüber den entsprechenden Ansätzen ohne Imatinib mesylate-Behandlung. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte ± SD von drei unabhängigen Versuchen.

6.5.2 Kompensation bestimmter Imatinib-Resistenz-vermittelnder *Bcr-Abl*-Mutationen

Im Weiteren sollte die Möglichkeit untersucht werden, ursprünglich Imatinib-resistente Zellen durch die *Bcr-Abl*-RNAi gegenüber dem Inhibitor zu ‚re-sensibilisieren'. Als Versuchssystem wurden zwei 32Dp210-Zelllinien etabliert, die jeweils eine *Bcr-Abl*-Genvariante mit einer Punktmutation exprimierten. Die mutierten *Bcr-Abl*-Sequenzen waren zuvor aus Leukämie-Patienten mit erworbener Resistenz gegen den Bcr-Abl-TK-Inhibitor ‚Imatinib mesylate' subkloniert worden (von Bubnoff *et al*., 2002). Beide Mutationen führen über einen AS-Austausch in der Bcr-Abl-Kinase-Domäne zu einer Reduktion der Bindungsaffinität von Imatinib an Bcr-Abl.

Die entstandene Linie 32Dp210-T315I produzierte eine Bcr-Abl-Variante, in welcher Threonin an Position 315 innerhalb der TK-Domäne durch Isoleucin ersetzt ist. Die Linie 32Dp210-H396P dagegen stellte eine Bcr-Abl-Variante her, bei der Histidin an Position 396 durch Prolin ersetzt ist. Über einen MTT-Viabilitätsassay wurde die Sensitivität dieser Linien gegenüber Imatinib mesylate bestimmt (siehe Abb.6.22). Die ermittelten IC_{50}-Werte für Ima-

tinib lagen bei 1,4 µM (32Dp210-H396P) und bei 5,2 µM (32Dp210-T315I); im Vergleich dazu lag der IC_{50}-Wert für die 32Dp210-wt Linie, die keine Mutation im *Bcr-Abl*-Gen aufwies, bei 0,3 µM. Die Bcr-Abl-Variante-T315I verlieh den Zellen demnach eine ausgeprägte Resistenz gegen Imatinib mesylate, während die H396P-Variante eine partielle Resistenz gegenüber Imatinib gewährte.

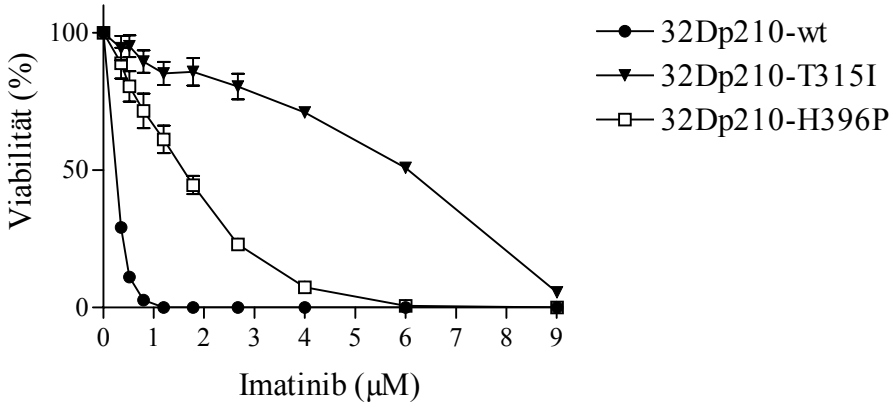


Abb.6.22: Imatinib-Sensitivität der Zelllinien 32Dp210-wt, 32Dp210-H396P und 32Dp210-T315I. Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines MTT-Tests. Pro Zelllinie wurden etwa 10000 Zellen in 200 µl pro well einer 96well-Platte ausgesät und mit den angegebenen Imatinib-Konzentrationen inkubiert. Dargestellt ist die Viabilität der Zellen ~ 40 h nach der jeweiligen Behandlung. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte ± SD von Dreifach-Ansätzen. Die ermittelten IC_{50}-Werte lagen bei 0,3 µM (32Dp210-wt), 1,4 µM (32Dp210-H396P) und 5,2 µM (32Dp210-T315I).

Inwiefern die RNAi-vermittelte Hemmung der *Bcr-Abl*-Expression auch in diesen resistenten Zellen eine Sensitivierung gegenüber Imatinib mesylate erreichen kann, sollte im Folgenden getestet werden. Dazu wurden die 32Dp210-H396P/T315I-Zellen zweimal im Abstand von 24 h mit der aktiven siRNA BAF7 transfiziert und im Anschluss die Sensitivität gegenüber Imatinib mesylate mittels eines MTT-Assays bestimmt. In Abb.6.23 ist das Ergebnis einer Western-Blot-Analyse nach siRNA-Behandlung dargestellt. Wie in den Wildtyp-Zellen bewirkte die *Bcr-Abl*-RNAi auch in den Zelllinien 32Dp210-H396P/T315I eine deutliche Hemmung der *Bcr-Abl*-Expression. Eine densitometrische Auswertung ergab eine Abnahme des Bcr-Abl-Proteingehalts um 83% (32Dp210-wt), 86,22% (32Dp210-H396P) und 71,83% (32Dp210-T315I) in den BAF7-behandelten Ansätzen im Vergleich zur Kontrolle (BAF8).

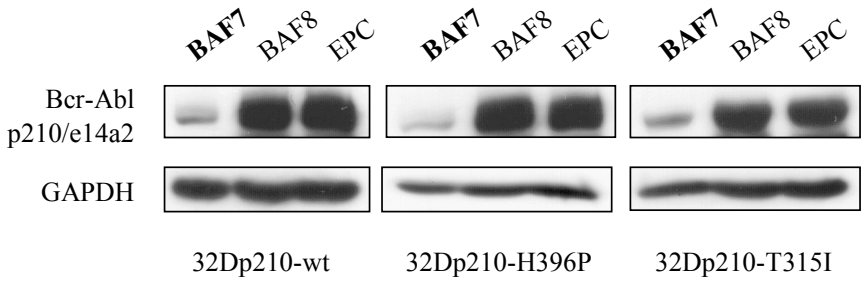
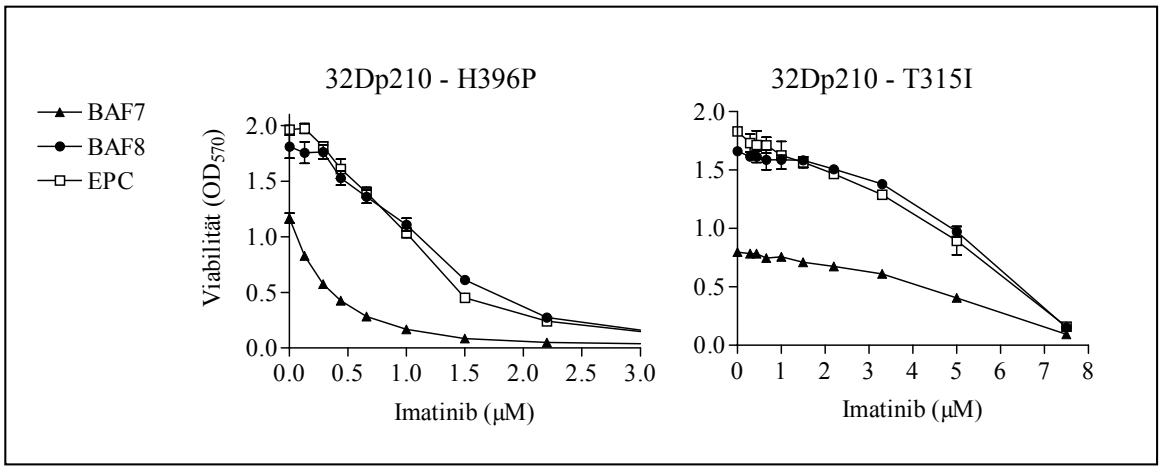


Abb.6.23: Effektive Hemmung der *Bcr-Abl*-Expression in 32Dp210-wt, 32Dp210-H396P und 32Dp210-T315I Zellen durch *Bcr-Abl*-RNAi. Ergebnis einer Western-Blot-Analyse. 2,5 Mio. der entsprechenden 32Dp210-Zellen wurden zweimal im Abstand von 24 h mit 800 nM der angegebenen siRNA elektroporiert. BAF7: *Bcr-Abl-e14a2*-spezifische siRNA, fett gedruckt; BAF8: 3 x ‚mismatch'-Kontrolle zu BAF7, EPC: Elektroporationskontrolle. Bis zur zweiten Elektroporation wurde dem Medium mIL-3 beigesetzt, um eine Selektion zu verhindern, nach weiteren 24 h ohne mIL-3 wurden die Zellen geerntet und lysiert. Pro Ansatz wurden 100 µg Gesamtproteinlysat auf ein 7,5%-Acrylamidgel aufgetragen. Für den Nachweis von Bcr-Abl wurde der monoklonale Abl-Antikörper 8E9 verwendet. Als Beladungskontrolle diente GAPDH.

Die Reduktion des Bcr-Abl-Proteinspiegels führte auch bei den beiden Imatinib-resistenten Zelllinien zu einer Reduktion der Viabilität (Abb.6.24, Ausgangswerte auf der y-Achse).
Zusätzlich bewirkte die *Bcr-Abl*-RNAi bei der partiell resistenten Linie 32Dp210-H396P eine Sensitivierung gegenüber dem Inhibitor Imatinib mesylate. Der ermittelte IC_{50}-Wert lag bei den BAF7-behandelten 32Dp210-H396P-Zellen um das vierfache (0,3 µM) unter dem entsprechenden Wert der Kontrollen (1,1 µM (EPC) bzw. 1,2 µM (BAF8)). Durch die siRNA-vermittelte Reduktion von Bcr-Abl wurde demnach in diesen Zellen eine Sensibilität gegenüber dem Inhibitor Imatinib wiederhergestellt, die der nicht-resistenter 32Dp210-wt Zellen entspricht (vgl. Abb.6.22).
Bei der Imatinib-resistenten Linie 32Dp210-T315I dagegen konnte durch die *Bcr-Abl*-RNAi keine Sensitivierung erreicht werden. Die IC_{50}-Werte lagen bei 4,9 µM (BAF7), 5,2 µM (BAF8) und 4,6 µM (EPC).



Behandlung	IC_{50} für Imatinib mesylate (µM)	
	32Dp210 - H396P	32Dp210 - T315I
BAF7	0,3	4,9
BAF8	1,2	5,2
EPC	1,1	4,6

Abb.6.24: Die Hemmung der *Bcr-Abl*-Expression durch RNAi führt zu einer Sensitivierung von 32Dp210-H396P-Zellen gegenüber Imatinib mesylate. Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines MTT-Viabilitäts-Assays. 2,5 Mio. 32Dp210-H396P- bzw. 32Dp210-T315I-Zellen wurden zweimal im Abstand von 24 h mit 200 nM der angegebenen siRNA elektroporiert. BAF7: *Bcr-Abl-e14a2*-spezifische siRNA, BAF8: 3 x ‚mismatch'-Kontrolle zu BAF7, EPC: Elektroporationskontrolle. Bis zur zweiten Elektroporation wurde dem Medium mIL-3 beigesetzt, um eine Selektion zu verhindern. Im Anschluss an die zweite siRNA-Behandlung wurden pro Ansatz etwa 15000 Zellen ohne mIL-3 in 200 µl pro well einer 96well-Platte ausgesät und mit den angegebenen Imatinib-Konzentrationen inkubiert. Dargestellt ist die Viabilität der Zellen ~ 40 h nach der jeweiligen Behandlung. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte ± SD von Dreifach-Ansätzen. Die aus den Diagrammen abgeleiteten IC_{50}-Werte sind tabellarisch darunter aufgeführt.

6.5 Untersuchung der Effizienz verschieden modifizierter siRNA-Moleküle

Im Hinblick auf eine potentielle klinische Anwendung der *Bcr-Abl*-RNAi ist die Serumstabilität der siRNA-Moleküle von kritischer Bedeutung. Diese kann durch verschiedene Modifikationen erhöht werden. Im folgenden Abschnitt wurde die Effizienz der in Abb.6.25 dargestellten, unterschiedlich modifizierten siRNA-Moleküle getestet.

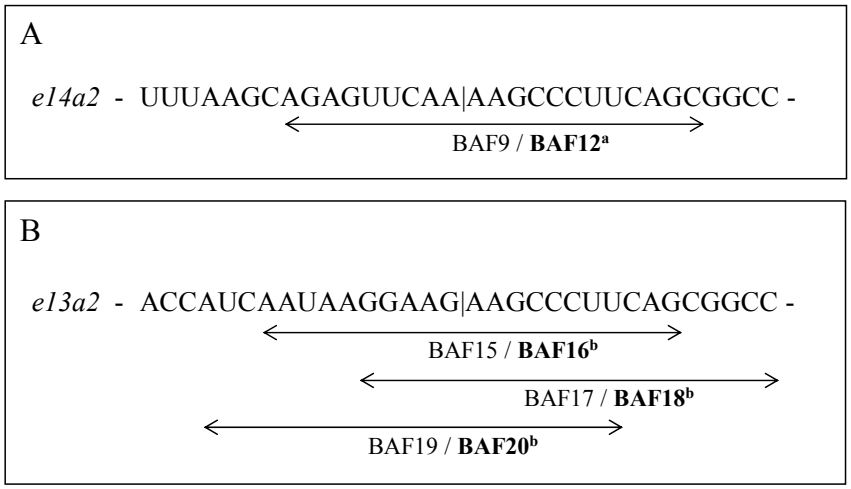


Abb.6.25: Übersicht über die Zielsequenzen der verwendeten modifizierten und der korrespondierenden nicht modifizierten siRNAs. Abbildung A zeigt einen Ausschnitt der Nukleotidsequenz der *Bcr-Abl-e14a2*-mRNA im Bereich des Bruchpunkts. **Abbildung B** zeigt den entsprechenden Ausschnitt der *Bcr-Abl-e13a2*-mRNA. Die exakte Fusionsstelle zwischen *Abl*- und *Bcr*-Sequenz ist jeweils durch einen Längsstrich markiert. Die *Bcr-Abl*-Sequenz, die dem ‚sense'-Strang der jeweiligen modifizierten (fett gedruckt) und nicht modifizierten siRNA entspricht, ist durch Pfeile markiert. [a] = Stabilisierung durch 2'-O-Methylierung von zwei Basen am 3'-Ende des ‚antisense' (as)-Stranges. [b] = Stabilisierung durch Anpassung der Basensequenz im Bereich des 3'-Endes des as-Strangs.

Die Induktion einer Gen-Inaktivierung in 32Dp210/e14a2-Zellen unter Verwendung der effektiven BAF9-siRNA und des entsprechenden 2'-O-methylierten-Pendants (BAF12) bewirkte eine äquivalente Abnahme des Bcr-Abl-Proteinspiegels (siehe Abb.6.26). Die bereits beschriebene transiente Natur des erzielten RNAi-Effektes (vgl. 6.1.5) konnte jedoch nicht überwunden werden. Der ‚Silencing'-Effekt war auch bei Verwendung stabilisierter siRNA-Moleküle auf Proteinebene nach 48 h kaum noch erkennbar.

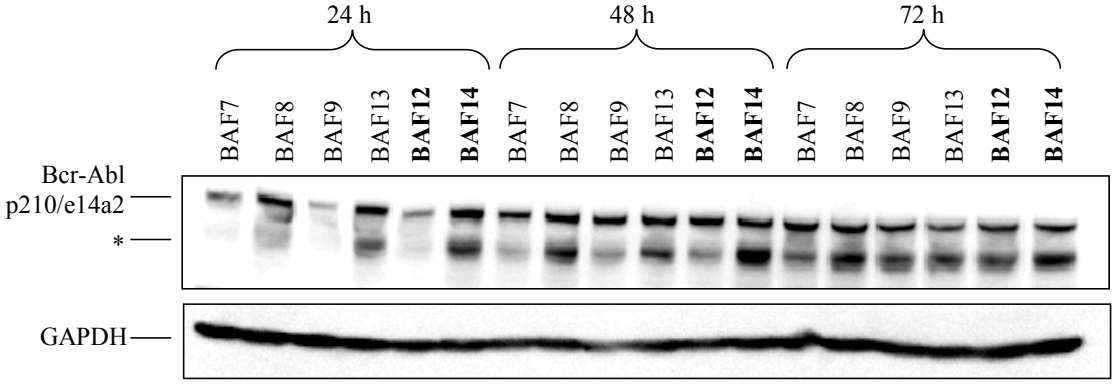


Abb.6.26: Effizienz und Persistenz des *Bcr-Abl-e14a2*-RNAi-Effekts bei Verwendung einer 2'-O-methylierten-siRNA. 2,5 Mio. 32Dp210/e13a2-Zellen wurden zweimal im Abstand von 24 h mit der angegebenen siRNA (800 nM) elektroporiert. BAF7/BAF9/BA12: *Bcr-Abl-e14a2*-spezifische siRNAs; BAF8/BAF13/BAF14: jeweils passende 3 x ‚mismatch'-Kontrolle. BAF12 und BAF14 sind 2'-O-methyliert (fett gedruckt). Während der gesamten Behandlung wurde dem Medium mIL-3 beigesetzt, um eine Selektion zu verhindern. 24 h, 48 h und 72 h nach der 2. Elektroporation wurden Teile der Zellen geerntet und lysiert. Pro Ansatz wurden 100 µg Gesamtproteinlysat auf ein 7,5 % Acrylamidgel aufgetragen. Für den Nachweis von Bcr-Abl wurde der monoklonale c-Abl-Antikörper 8E9 verwendet. Als Beladungskontrolle diente GAPDH. * Bcr-Abl-Degradationsprodukt.

Zu einem vergleichbaren Ergebnis führten entsprechende Versuche bei der 32Dp210/e13a2-Linie. Die Verwendung modifizierter siRNA-Moleküle (BAF16, BAF18 und BAF20) führte zu einer äquivalenten Hemmung der *Bcr-Abl*-Expression wie die entsprechenden nicht-stabilisierten siRNA-Varianten (BAF15, BAF17 und BAF19) (siehe Abb.6.27).

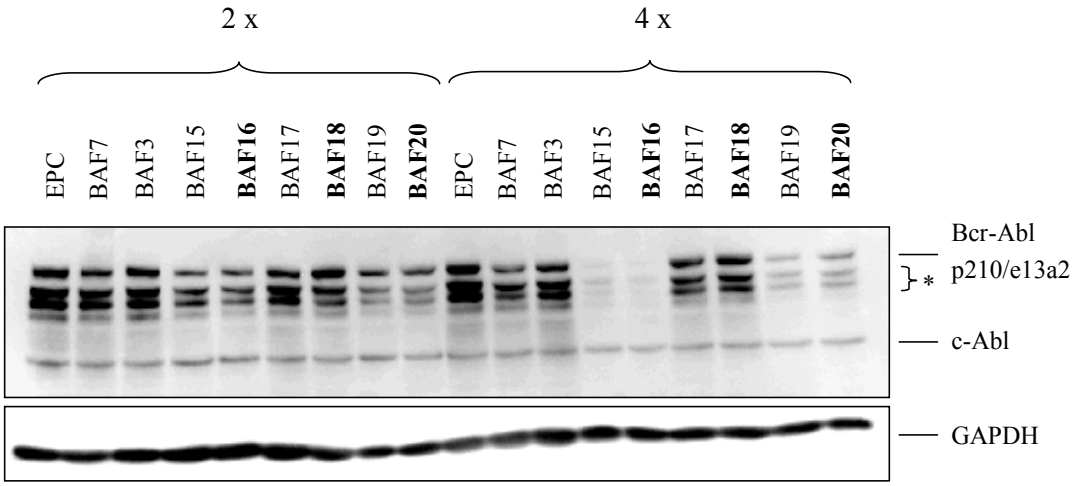


Abb.6.27: Effizienz des *Bcr-Abl-e13a2*-RNAi-Effekts bei Verwendung stabilisierter siRNAs. ~ 2,5 Mio. 32Dp210/e13a2-Zellen wurden 2 x oder 4 x im Abstand von 24 h mit der angegebenen siRNA (800 nM) elektroporiert. BAF3/BAF15/BA17/BAF19: *Bcr-Abl-e13a2*-spezifische siRNAs ohne Modifikation; BAF7: *Bcr-Abl-e14a2*-spezifische siRNA als Kontrolle. BAF16/BAF18/BAF20: *Bcr-Abl-e13a2*-spezifische siRNAs mit modifizierter Sequenz am 3'-Ende des as-Strangs (fett gedruckt). Ausserdem wurde eine Elektroporations-kontrolle (EPC) mitgeführt. Bis zur jeweils letzten Elektroporation wurde dem Medium mIL-3 beigesetzt, um eine Selektion zu verhindern. Nach weiteren 24 h ohne mIL-3 wurden die Zellen geerntet und lysiert. Pro Ansatz wurden 80 µg Gesamtproteinlysat auf ein 7,5%-Acrylamidgel aufgetragen. Für den Nachweis von Bcr-Abl wurde der monoklonale c-Abl-Antikörper 8E9 verwendet. Als Beladungskontrolle diente GAPDH. * Bcr-Abl-Degradationsprodukte.

Die Beobachtung, dass die verschiedenen Modifikationen die Effizienz der siRNAs nicht beeinträchtigen, wurde auch durch die Viabilitäts-Untersuchungen bestätigt (Abb.6.28). 32Dp210/e14a2-Zellen, die mit der aktiven nicht-modifizierten siRNA BAF9 behandelt wurden, zeigten im MTT-Test eine Reduktion der Viabilität um 78% im Vergleich zur Elektroporationskontrolle (EPC, 100%). Der Viabilitätsverlust, der durch die Behandlung mit der entsprechenden 2'-O-methylierten-siRNA BAF12 erreicht wurde, lag bei 80%. Auch bei der *Bcr-Abl*-Variante *e13a2* bewirkten die durch Anpassung der Nukleotidsequenz am 3'-Ende des as-Strangs stabilisierten siRNAs einen ähnlich starken Rückgang der Viabilität wie die nicht-modifizierten Pendants. Der Viabilitätsverlust der Zellen, die mit der nicht-modifizieren BAF15-siRNA behandelt wurden, lag im MTT-Test bei 64,4% verglichen mit 86,4% bei der entsprechenden modifizierten BAF16-siRNA (jeweils bezogen auf die EPC (100%)). Die nicht-modifizierte BAF19-siRNA bewirkte einen Verlust von 86,6% verglichen mit 77,5% bei der modifizierten Variante BAF20.

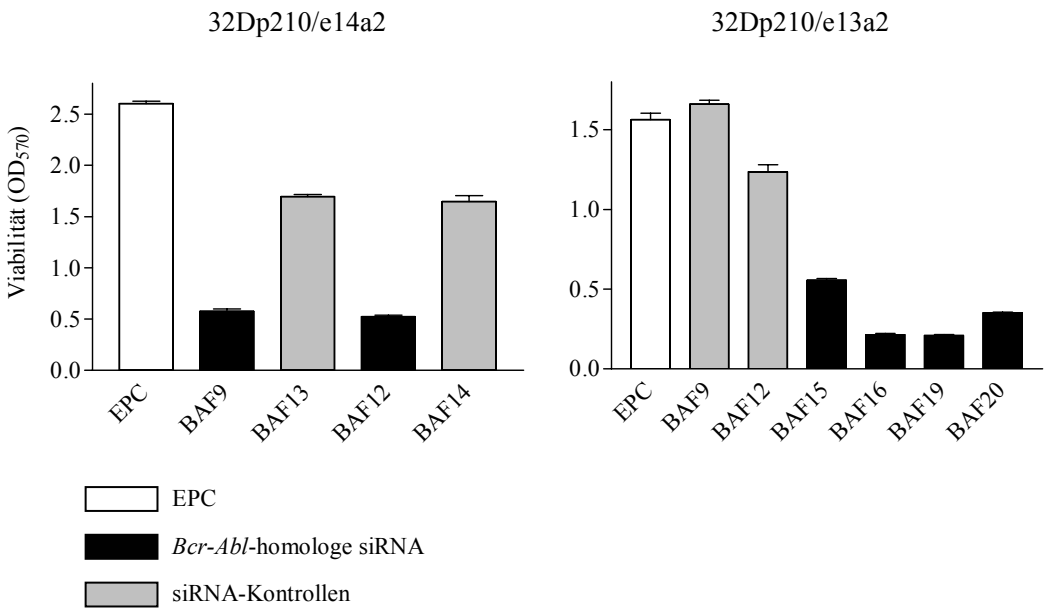


Abb.6.28: Effekt der *Bcr-Abl*-RNAi nach Verwendung modifizierter siRNAs auf die Viabilität der Zellen. ~ 2,5 Mio. 32Dp210-Zellen wurden 2 x im Abstand von 24 h mit der angegebenen siRNA (800 nM) elektroporiert. Bis zur zweiten Elektroporation wurde dem Medium mIL-3 beigesetzt, um eine Selektion zu verhindern, und dann durch waschen der Zellen entfernt. **Linke Abbildung:** Ergebnis eines MTT-Viabilitäts-Assays. Je 16600 32Dp210/e14a2-Zellen wurden ohne mIL-3-Zusatz in 200 µl pro well einer 96well-Platte ausgesät. Dargestellt ist die Viabilität der Zellen der verschiedenen Ansätze ~ 48 h nach der zweiten siRNA-Behandlung. BAF9/BAF12: *Bcr-Abl-e14a2*-spezifische siRNA jeweils ohne (BAF9) und mit (BAF12) 2‘-O-Methyl-Modifikation. BAF13/BAF14: 3 x mismatch-Kontrolle jeweils ohne (BAF13) und mit (BAF14) 2‘-O-Methyl-Modifikation. EPC: Elektroporationskontrolle. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte ± SD von Dreifach-Ansätzen. **Rechte Abbildung:** Ergebnis eines MTT-Viabilitäts-Assays. Je 25000 32Dp210/e13a2-Zellen wurden ohne mIL-3-Zusatz in 200 µl pro well einer 96well-Platte ausgesät. Dargestellt ist die Viabilität der Zellen der verschiedenen Ansätze ~ 48 h nach der zweiten siRNA-Behandlung. BAF15/BA16/ BAF19/BAF20: *Bcr-Abl-e13a2*-spezifische siRNAs. BAF16 und BAF20 jeweils mit Modifikation der Sequenz am 3’-Ende des as-Strangs. BAF9/BAF12: *Bcr-Abl-e14a2*-spezifische siRNA als Kontrolle. EPC: Elektroporationskontrolle. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte ± SD von Dreifach-Ansätzen.

6.6 Übertragung des RNAi-Protokolls auf humane leukämische Zellen

Die Übertragung des im ersten Teil der Arbeit etablierten *Bcr-Abl*-RNAi-Protokolls auf humane leukämische Zellen gelang zunächst bei der leukämischen K562-Zelllinie. Diese Zelllinie wurde aus dem Zellmaterial einer 53 Jahre alten Patientin mit CML im Stadium der Blastenkrise etabliert. Bei diesen Zellen liegt das *Bcr-Abl*-Gen in amplifizierter Form auf dem Ph-Chromosom. Die Zellen exprimieren die *Bcr-Abl*-Transkriptvariante *e14a2* (Drexler *et al.*, 1999). Da K562-Zellen relativ sensitiv auf Elektroporation reagieren, wurde ein Lipofektamin-basiertes Transfektions-Protokoll für die siRNA-Übertragung verwendet.

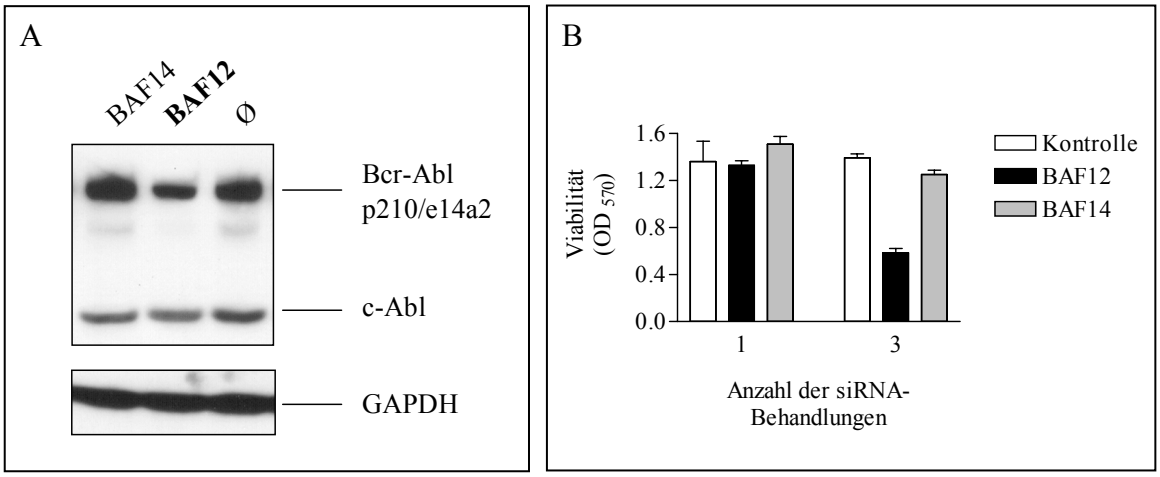


Abb.6.29: *Bcr-Abl*-RNAi führt zu einer Abnahme des Bcr-Abl-Proteinspiegels und zu einem Viabilitätsverlust in leukämischen K562-Zellen. 1,5 Mio. Zellen wurden ein- bis dreimal im Abstand von 24 h mit 8,4 µg siRNA behandelt. BAF12: *Bcr-Abl-e14a2*-spezifische siRNA, modifiziert (fett gedruckt); BAF14: 3 x ‚mismatch'-Kontrolle zu BAF12. Kontrolle: nur mit Transfektionsreagenz (ohne RNA) behandelte Zellen. Die Transfektion erfolgte mittels Lipofektamin 2000™. **A:** Ergebnis einer Western-Blot-Analyse. 24 h nach der dritten siRNA-Behandlung wurden die Zellen geerntet und lysiert. Pro Ansatz wurden 60 µg Gesamtproteinlysat auf ein 7,5%-Acrylamidgel aufgetragen. Für den Nachweis von Bcr-Abl wurde der monoklonale c-Abl-Antikörper 8E9 verwendet. Als Beladungskontrolle diente GAPDH. **B:** Ergebnis eines MTT-Viabilitäts-Assays. Im Anschluss an die jeweils letzte siRNA-Behandlung wurden je 20000 Zellen in 200 µl pro well einer 96well-Platte ausgesät. Dargestellt ist die Viabilität der Zellen ~ 48 h nach der siRNA-Behandlung. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte ± SD von sechs Ansätzen.

Eine wiederholte Behandlung mit der *Bcr-Abl-e14a2*-spezifischen siRNA BAF12 führte zu einem leichten aber reproduzierbaren Rückgang des Bcr-Abl-Proteingehalts im Western-Blot (siehe Abb.6.29). Parallel dazu konnte man nach dreifacher siRNA-Behandlung einen Via-

bilitätsverlust von 58% bezogen auf die Kontrolle (100%) erkennen. Auch hier bestätigte sich die Erfahrung, dass eine längere siRNA-Exposition (≥ 48 h) notwendig war, um eine deutliche Abschwächung der *Bcr-Abl*-bedingten leukämischen Merkmale zu erzielen. Nach einer einzigen siRNA-Behandlung war im Gegensatz zur dreifachen Behandlung nahezu keine Beeinflussung der Zellproliferation im MTT-Assay nachweisbar (Abb.6.29-B).

Auch bei primären hämatopoetischen mononukleären Zellen (MNC), die aus dem Blut eines CML-Patienten isoliert worden waren, konnte ein *Bcr-Abl*-RNAi-Effekt durch Anwendung des ausgearbeiteten Protokolls induziert werden. Über eine RT-PCR und anschließende PCR mit entsprechend gewählten Primern wurde zunächst die vom Patienten exprimierte *Bcr-Abl*-Fusionsform ermittelt (Abb.6.30-A). Es handelte sich um die *Bcr-Abl-e14a2*-Variante, entsprechend wurde die BAF7-siRNA als aktive siRNA für die Behandlung ausgewählt. Als Kontrolle wurde die entsprechende dreifache ‚mismatch'-siRNA BAF8 verwendet. Abb.6.30-B zeigt deutlich eine signifikante Reduktion des Bcr-Abl-Proteingehalts in $CD34^+$-Zellen, die zweimal mit BAF7 elektroporiert worden waren, im Vergleich zur Kontrolle.

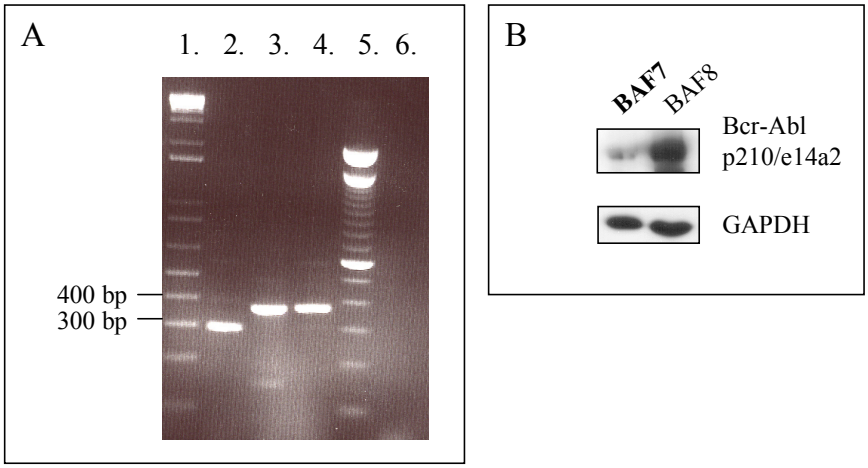


Abb.6.30: Hemmung der *Bcr-Abl*-Expression in primären $Ph^+/CD34^+$-MNC mittels RNAi. A: DNA-Gel; aufgetragen sind die Proben der qualitativen PCR zur Bestimmung der *Bcr-Abl*-Bruchpunktvariante. Die Beladung war wie folgt: 1: 1 Kb DNA-Ladder, 2: bekannte Probe mit *Bcr-Abl-e13a2*, 3: bekannte Probe mit *Bcr-Abl-e14a2*, 4: zu untersuchende Patienten-Probe, 5: 100 bp DNA-Ladder, 6: Negativkontrolle **B:** Ergebnis einer Western-Blot-Analyse. ~ 1,5 Mio. $CD34^+$-MNC aus dem peripheren Blut des CML-Patienten, wurden zweimal im Abstand von 24 h mit 800 nM der angegebenen siRNA elektroporiert. BAF7: *Bcr-Abl-e14a2*-spezifische siRNA, fett gedruckt; BAF8: 3 x ‚mismatch'-Kontrolle zu BAF7. 24 h nach der zweiten siRNA-Behandlung wurden die Zellen geerntet und lysiert. Für den Nachweis von Bcr-Abl wurde der monoklonale c-Abl-Antikörper 8E9 verwendet. Als Beladungskontrolle diente GAPDH.

Anhand einer weiteren leukämischen Zelllinie (MEG-01) sollten auch die gegen *Bcr-Abl-e13a2* gerichtete siRNA BAF19 getestet werden. Die Zelllinie wurde aus Knochenmark-Material eines 55 Jahre alten CML-Patienten in der Blastenkrise gewonnen. Die Zellen sind Ph^+ und exprimieren die *Bcr-Abl*-Variante *e13a2* (Drexler *et al.*, 1999). Eine wiederholte Elektroporation mit BAF19 bewirkte einen deutlichen Rückgang der *Bcr-Abl-e13a2*-Expression in den entsprechenden Zellen (siehe Abb.6.31). Der Hemmung von *Bcr-Abl* folgte wie erwartet ein Rückgang der Viabilität der Zellen. Eine MTT-Viabilitätsanalyse der Zellen ergab einen Viabilitätsverlust von ~ 72% bezogen auf die Elektroporationskontrolle (EPC, 100%).

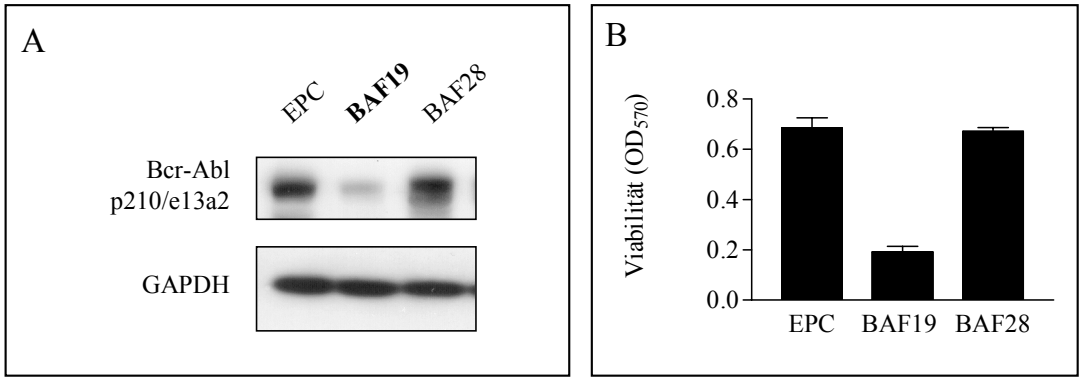


Abb.6.31: Senkung des Bcr-Abl-Proteinspiegels und Induktion eines Viabilitätsverlusts in leukämischen MEG-01 Zellen durch *Bcr-Abl*-RNAi. 2-4 Mio. Zellen wurden dreimal im Abstand von 24 h mit der entsprechenden siRNA (800 nM) behandelt. BAF19: *Bcr-Abl-e13a2*-spezifische siRNA, BAF28: entsprechende 3 x ‚mismatch'-siRNA als Kontrolle; EPC: Elektroporationskontrolle **A:** Ergebnis einer Western-Blot-Analyse. 24 h nach der dritten siRNA-Behandlung wurden die Zellen geerntet und lysiert. Pro Ansatz wurden 60 µg Gesamtproteinlysat auf ein 7,5%-Acrylamidgel aufgetragen. Als Beladungskontrolle diente GAPDH. **B**: Ergebnis eines MTT-Viabilitäts-Assays. Im Anschluss an die dritte siRNA-Behandlung wurden pro Ansatz etwa 50000 Zellen in 200 µl pro well einer 96well-Platte ausgesät und ~ 48 h inkubiert. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte ± SD von Dreifach-Ansätzen.

6.7 *Bcr-Abl*-RNAi durch stabile ‚short hairpin RNA'-Expression

Der durch die direkte Transfektion chemisch synthetisierter siRNA-Moleküle in Säugerzellen erzielte RNAi-Effekt ist sehr transient (siehe 6.1.5). Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen, ist die intrazelluläre Synthese siRNA-ähnlicher Transkripte, sogenannter ‚short hairpin RNAs' (shRNAs) mit Hilfe spezieller Expressionsvektoren. Im folgenden Teil der Arbeit sollte unter Verwendung des pSUPER-RNAi-Systems™ (Brummelkamp *et al.*, 2002; siehe 5.7.2) getestet werden, ob mit Hilfe dieser Methode eine *Bcr-Abl*-RNAi in humanen Leukämiezellen erreicht werden kann.

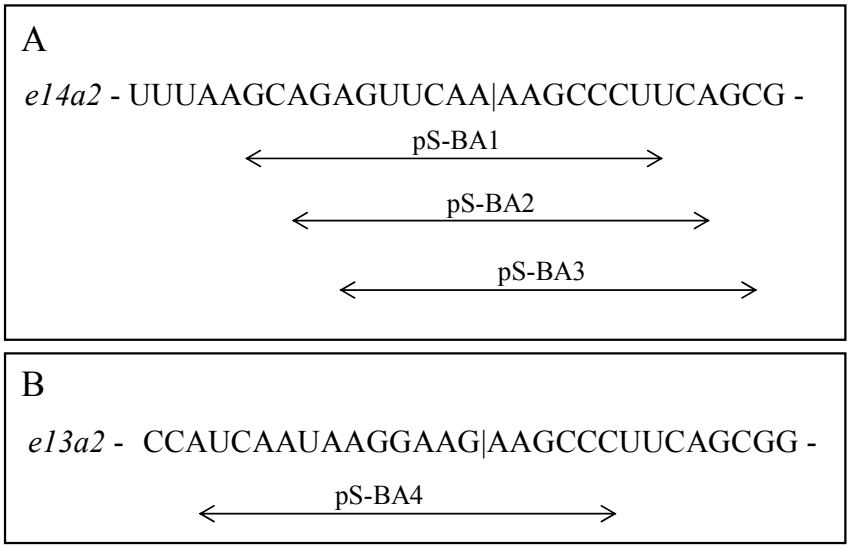


Abb.6.32: Zielsequenzen der von den vier verwendeten pSUPER-*Bcr-Abl*-Plasmiden codierten shRNAs. A: Ausschnitt der Nukleotidsequenz der *Bcr-Abl-e14a2*-mRNA im Bereich des Bruchpunkts. **B:** Ausschnitt der Nukleotidsequenz der *Bcr-Abl-e13a2*-mRNA im Bereich des Bruchpunkts. Die exakte Fusionsstelle zwischen *c-Abl*- und *Bcr*-Sequenz ist jeweils durch einen Längsstrich markiert. Die (Ziel-)Sequenz des von dem jeweiligen Vektor (pS-BA1-4) codierten shRNA-Dimers (19 nt) ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Insgesamt wurden vier pSUPER-Vektoren mit verschiedenen *Bcr-Abl*-spezifischen shRNA-codierenden Sequenzen hergestellt. pS-BA1-3 enthielten Expressionskassetten für drei in der Zielsequenz leicht variierende shRNAs, die alle gegen die Bruchpunktregion der *Bcr-Abl-e14a2*-mRNA gerichtet waren (siehe Abb.6.32). pS-BA4 dagegen vermittelte die Expression einer *Bcr-Abl-e13a2*-spezifischen shRNA, die im Folgenden als Kontrolle für die *Bcr-Abl-e14a2*-RNAi verwendet wurde. Die voraussichtliche Sequenz und die daraus resultierenden

thermodynamischen Eigenschaften der durch die Expression der drei Anti-*Bcr-Abl-e14a2*-shRNA-Gene entstehenden siRNAs sind in Tabelle 6.1 dargestellt.

Tabelle 6.1: Voraussichtliche Sequenz und thermodynamische Eigenschaften der exprimierten siRNAs BA1-3:

Name	siRNA-Sequenz	thermodynamische Eigenschaften (ΔG [kcal/mol])
BA1	s 5‘-GCAGAGUUCAA|AAGCCCUUUU-3‘ as 3‘-UUCGUCUCAAGUU|UUCGGGAA-5‘	$\Delta G_{5'\text{-sense}}$: -11,2; $\Delta G_{5'\text{-antisense}}$: -9,6; $\Delta\Delta G$: -1,6
BA2	s 5‘-AGAGUUCAA|AAGCCCUUCAUU-3‘ as 3‘-UUUCUCAAGUU|UUCGGGAAGU -5‘	$\Delta G_{5'\text{-sense}}$: -8,9; $\Delta G_{5'\text{-antisense}}$: -8,1; $\Delta\Delta G$: -0,8
BA3	s 5‘-AGUUCAA|AAGCCCUUCAGCUU-3‘ as 3‘- UUUCAAGUU|UUCGGGAAGUCG -5‘	$\Delta G_{5'\text{-sense}}$: -7,7; $\Delta G_{5'\text{-antisense}}$: -11,2; $\Delta\Delta G$: 3,5

s: sense, as: antisense

Die Vektor-vermittelte intrazelluläre Expression *Bcr-Abl-e14a2*-spezifischer shRNAs führte zu einer beachtlichen Reduktion des Bcr-Abl-Proteinspiegels in leukämischen K562-Zellen (siehe Abb.6.33). Aufgrund einer sehr geringen Transfektionseffizienz (~ 10%) wurden die nicht-transfizierten K562-Zellen etwa 24 h nach Transfektion über eine Antibiotikum-Selektion entfernt. Die Abnahme des Bcr-Abl-Proteinspiegels war ~ 96 h nach Transfektion der pS-BA1-3-Vektoren, also 72 h nach Selektionsbeginn, im Western-Blot deutlich erkennbar (siehe Abb.6.33-B).

Generell unterschieden sich die von den drei Vektoren exprimierten shRNA-Varianten in der Effizienz des von ihnen induzierten RNAi-Effekts. Die von dem pS-BA1-Vektor exprimierte shRNA-Variante bewirkte reproduzierbar die stärkste *Bcr-Abl*-Hemmung, während die pS-BA3 Vektor-codierte shRNA die schwächste Hemmwirkung auf die *Bcr-Abl*-Expression hatte.

Bei einer Bestimmung der Zellzahl im Anschluss an die Transfektion/Selektion der shRNA-exprimierenden Zellen zeigten wie erwartet nur die Kontrollzellen eine kontinuierliche Proliferation (siehe Abb.6.33-B). Bei den mit aktiven *Bcr-Abl-e14a2*-siRNA-Expressionsplasmiden behandelten Zellen (pS-BA1-3) war eine Anreicherung stabil proliferierender

Klone aufgrund des durch die *Bcr-Abl*-Hemmung bedingten Viabilitätsverlustes nicht möglich.

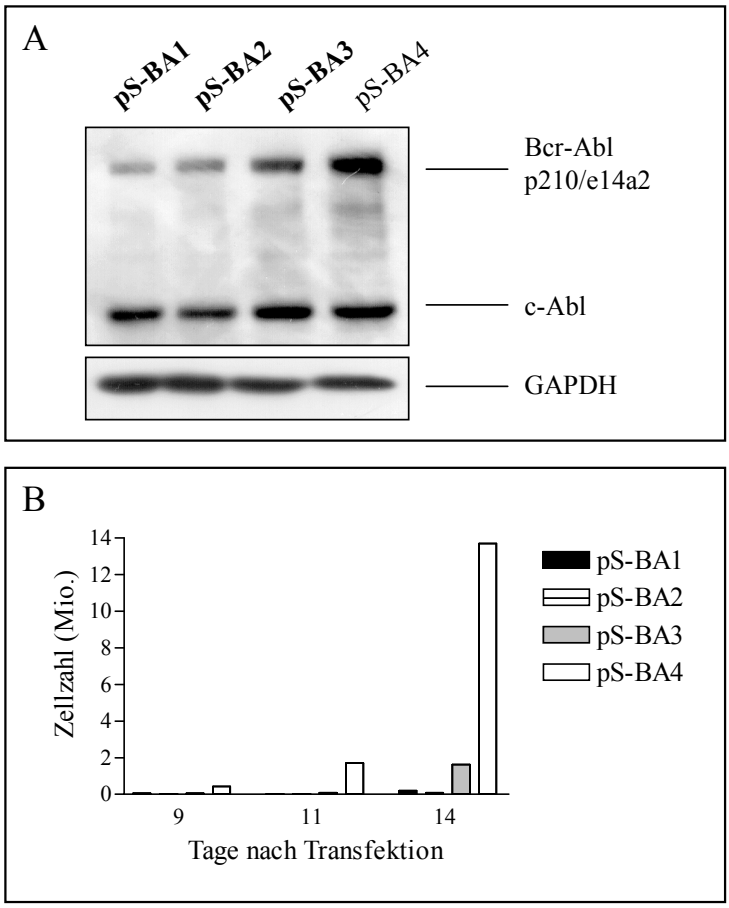


Abb.6.33: Die Expression von anti-*Bcr-Abl*-shRNAs verringert effektiv den Bcr-Abl-Proteinspiegel in leukämischen K562-Zellen. 1 Mio. K562-Zellen wurden mit 10,25 µg pS-BA-DNA unter Verwendung von JetPEI™ transfiziert. ~ 24 h nach Transfektion wurden nicht transfizierte Zellen über eine Antibiotikum-Selektion eliminiert. pS-BA1-3: encodieren *Bcr-Abl-e14a2*-spezifische shRNA**,** pS-BA4: encodiert *Bcr-Abl-e13a2*-spezifische shRNA; diente als Kontrolle. **A:** Ergebnis einer Western-Blot-Analyse. ~ 96 h nach Transfektion wurden die überlebenden Zellen geerntet und lysiert. Pro Ansatz wurden 60 µg Gesamtproteinlysat auf ein 7,5%-Acrylamidgel aufgetragen. Für den Nachweis von Bcr-Abl wurde der monoklonale Abl-Antikörper 8E9 verwendet. Als Beladungskontrolle diente GAPDH. **B:** 9, 11 und 14 Tage nach Transfektion wurde die Anzahl lebender Zellen in den einzelnen Ansätzen über eine Trypan-Blau Ausschluss-Färbung bestimmt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis.

7. Diskussion

Die Aktivität der Bcr-Abl-Tyrosinkinase (Bcr-Abl-TK) ist die molekulare Ursache für die Entwicklung einer Chronisch Myeloischen Leukämie (CML). Außerdem findet sich dieses chimäre Onkogenprodukt auch bei etwa 15-30% aller Patienten mit Akuter Lymphatischer Leukämie (ALL) und bei 2% der Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie (AML) (Kalidas *et al.,* 2001). Da Bcr-Abl nur in malignen Zellen präsent ist und darüber hinaus kausal zur Entstehung des leukämischen Phänotyps beiträgt, stellt es einen legitimen Angriffspunkt für eine zielgerichtete Behandlung dar. In den vergangenen Jahren gab es daher zahlreiche Versuche zur selektiven Inhibition von Bcr-Abl. Diese Strategien basierten zum einen auf einer Hemmung der Bcr-Abl-TK-Aktivität mittels chemischer Inhibitoren, wie beispielsweise Imatinib mesylate, und zum anderen auf einer systematischen Hemmung der *Bcr-Abl*-Genexpression.

Der von Novartis (Basel, Schweiz) entwickelte Bcr-Abl-TK-Inhibitor Imatinib mesylate (STI571, Gleevec™, Glivec®) ist seit 2001 von der amerikanischen ‚Food and Drug Administration' (FDA) zur Therapie *Bcr-Abl*-positiver Leukämien zugelassen. Das 2-Phenylamino-pyrimidin-Derivat Imatinib bindet an einen Teil der ATP-Bindedomäne (ATP-BD) und stabilisiert die Kinase so in ihrer inaktiven Form (Schindler *et al*., 2001, Gambacorti-Passerini *et al*., 2003; Nagar *et al*., 2002). Die therapeutische Anwendung von Imatinib hat bislang große Erfolge sowohl bei Patienten mit CML in chronischer und akuter Phase als auch bei Patienten mit Philadelphia-Chromosom positiver (Ph^+)-ALL erzielt (Druker *et al.,* 2001-A/B). Der niedermolekulare Inhibitor hemmt jedoch nicht ausschließlich die Bcr-Abl-TK, sondern blockiert auch die Aktivität von vier weiteren TKs. So werden c-Abl-, ARG-, c-KIT- und die PDGF-Rezeptor-TK mit der gleichen Effizienz inhibiert (zur Übersicht: Cowan-Jacob *et al.*, 2004). c-Abl spielt unter anderem als Induktor des G1-Zellzyklus-Arrest nach genotoxischem Stress eine wichtige Rolle bei der Überwachung des Zellwachstums (Kipreos *et al.,* 1992; Sawyers *et al.,* 1994). Der Stammzellfaktor-Rezeptor c-KIT ist sowohl in Gametogenese, Spermatogenese als auch in die Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen involviert (Poole *et al.*, 1979). Inwiefern sich die zusätzliche Hemmung dieser TK bei der Imatinib-Therapie auf den Zell-Phänotyp auswirkt, ist bislang kaum untersucht. Besonders bei einer dauerhaften Imatinib-Gabe sind daher unerwünschte Spätfolgen nicht auszuschließen.

Eine weitere Strategie zur gezielten Behandlung der malignen Bcr-Abl$^+$-Zellen ist die Stilllegung der *Bcr-Abl*-Genexpression durch ‚antisense' (as)-Techniken. Die Inaktivierung des Gens wird hierbei über eine selektive Degradation der mRNA erreicht. Ein entscheidender Vorteil dieser Methode liegt darin, dass Fusionstranskripte wie *Bcr-Abl* einen idealen Angriffspunkt für eine spezifische Inhibition darstellen. Bei Verwendung von as-Molekülen, die sowohl zur *Abl*- als auch zur *Bcr*-Sequenz komplementär sind, also die Fusionsstelle überspannen, sollte faktisch nur das Onkogen in seiner Expression beeinträchtigt werden. Die Expression der zellulären Gene *Abl* und *Bcr* sollte dagegen nicht beeinflusst werden.
Die Gen-Inaktivierung durch den gezielten Abbau des *Bcr-Abl*-Transkripts gelang bereits *in vitro* sowohl mittels einzelsträngiger (ss) as-Oligodesoxynukleotide (as-ODN) als auch durch Verwendung von katalytisch aktiven Oligonukleotiden (Ribozymen und DNAzymen) (zur Übersicht: Barnes *et al.*, 2003). Mit Hilfe der as-ODN-Methode konnte außerdem ein antileukämischer Effekt im Mausmodell erzielt werden (Skorsky *et al.*, 1994). Generell wurde jedoch nur in Einzelfällen eine signifikante Hemmung der Expression des Zielgens erzielt, insgesamt blieb die Effizienz und Reproduzierbarkeit dieser herkömmlichen as-Techniken besonders aber die der as-ODN-Technik sehr unbefriedigend (zur Übersicht: Barnes *et al.*, 2003). Ein Grund für die schlechten Resultate ist die äußerst niedrige Serumstabilität der ss-ODN (~ 1 h). Die daher notwendige hohe Dosierung und Stabilisierung der as-ODN durch Modifikationen (vor allem durch Verwendung von Phosphorothioat-ODN) begünstigten das Auftreten unspezifischer toxischer Effekte (zur Übersicht: Lewin, 1999; Vaerman *et al.*, 1995).

Jüngste Fortschritte im Bereich der Anwendung von siRNA-Molekülen für die gezielte Stilllegung von Genen in Säugerzellen wecken die Hoffnung auf eine klinische Anwendung dieser neuen Technik. Im Gegensatz zu den konventionellen as-Techniken erwies sich die Nutzung dieses natürlichen endogenen Signalweges für die selektive Inaktivierung eines Zielgens bislang als deutlich effizienter (Caplen *et al.*, 2001). In dieser Arbeit sollte am Beispiel des humanen Onkogens *Bcr-Abl* getestet werden, inwiefern es möglich ist, die Expression dieses chimären Onkogens durch RNA-Interferenz (RNAi) selektiv zu hemmen.

7.1 Charakterisierung der *Bcr-Abl*-RNAi

7.1.1 Nachweis des RNAi-Effekts

Die Bcr-Abl-TK zeichnet sich durch eine im Vergleich zur zellulären Abl-TK deregulierte, konstitutive Enzymaktivität aus (Konopka *et al.*, 1985). In hämatopoetischen Zelllinien-Modellen führt eine Expression von *Bcr-Abl* zu verstärkter Proliferation und zu einer Transformation der Zellen (Daley *et al.*, 1988; Nieborowska-Skorska *et al.*, 1999; Sirard *et al.*, 1994). Die Veränderung der zellulären Eigenschaften beruht vor allem auf der Phosphorylierung einer Vielzahl molekularer ‚Targets' durch die hyperaktive Bcr-Abl-TK. Dies wiederum führt zu einer Aktivierung intrazellulärer, häufig mitogener Signalwege. Auch den in dieser Arbeit verwendeten murinen und humanen Zelllinien (32D/M07) verlieh die Expression des stabil übertragenen humanen Onkogens *Bcr-Abl* die Fähigkeit, unabhängig von externen Wachstumsfaktoren zu proliferieren (siehe Abb.6.1, Abb.6.2, Abb.6.14, Abb.6.17). Die so gewonnenen Zelllinien-Modelle wurden für die Entwicklung eines effizienten *in vitro*-RNAi-Protokolls zur spezifischen Hemmung der *Bcr-Abl*-Genexpression genutzt.
Der Nachweis der RNAi erfolgte durch Analyse des Bcr-Abl-Proteinspiegels (Western-Blot-Analyse). Eine Untersuchung auf mRNA-Ebene wurde nur exemplarisch durchgeführt (siehe Abb.6.5), da eine erfolgreiche Reduktion des Proteins die erfolgreiche Reduktion der mRNA voraussetzt, wie bereits von anderen Arbeitsgruppen bestätigt wurde (Wilda *et al.*, 2002; Scherr *et al.*, 2003). Zusätzlich wurde die Wirkung der *Bcr-Abl*-RNAi durch Untersuchung des leukämischen Wachstums der behandelten Zellen mit Hilfe eines MTT-Viabilitäts-Assays bzw. über Apoptose-Messungen verifiziert. Exemplarisch wurden außerdem zwei Proteine, Bcl-X_L und $p27^{kip}$ untersucht, deren Produktion bekanntermaßen durch Bcr-Abl beeinflusst wird (vgl. Abb.6.6-A). So wird das anti-apoptotische Protein Bcl-X_L in *Bcr-Abl*-transfizierten Zelllinien verstärkt gebildet (zur Übersicht: Danial *et al.*, 2000), der Zellzyklus-Inhibitor $p27^{kip}$ dagegen wird durch die Bcr-Abl-TK-Aktivität destabilisiert, was eine Reduktion des $p27^{kip}$-Proteinspiegels in *Bcr-Abl*-positiven Zellen zur Folge hat (Gesbert *et al.*, 2000; Jonuleit *et al.*, 2000). Die Hemmung der *Bcr-Abl*-Expression durch Behandlung mit der spezifischen siRNA BAF7 bewirkte eine Reduktion von Bcl-X_L und führte zu einem Wiederanstieg von $p27^{kip}$ in 32Dp210-Zellen. Durch die *Bcr-Abl*-RNAi konnte also eine Umkehrung des Onkogen-Einflusses auf das Expressionsmuster in den *Bcr-Abl*-positiven-Zellen erreicht werden.

7.1.2 Dauer der RNAi in Säugerzellen

Trotz einer Elektroporationseffizienz von > 80% (Abb.6.8) und einer optimierten siRNA-Dosierung (Abb.6.12) erwies sich die in dieser Arbeit durch die Transfektion synthetischer siRNA-Moleküle erzielte RNAi als äußerst transient. Bereits 48 h nach Behandlung, also nach etwa vier Zellzyklen, war der Effekt in 32Dp210/e14a2-Zellen deutlich abgeschwächt (Abb.6.9, Abb.6.26). Diese Beobachtung stimmt überein mit zahlreichen Publikationen, die die RNAi-Kinetik in Säugerzellen als sehr transient beschreiben (Chiu *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2001, Tuschl *et al.*, 2002). Man geht davon aus, dass die durch Transfektion von siRNAs erzielte RNAi nur etwa 3-5 Zellzyklen lang anhält. Ursache hierfür ist sehr wahrscheinlich das Fehlen von RNAi-Amplifikationsmechanismen in Säugerzellen, wie sie z.B. in C.*elegans* beschrieben wurden (Fire *et al.*, 1998). Jede Zellteilung, die der siRNA-Behandlung folgt, bewirkt daher eine graduelle Verdünnung der siRNA-Moleküle: je höher also die Teilungsrate der behandelten Zellen desto kürzer die erwartete Dauer der RNAi.

Die RNAi-Kinetik nach Transfektion synthetischer siRNAs wird außerdem noch durch einen weiteren Faktor bestimmt: Die Halbwertszeit des Zielproteins. Eine effektive RNAi bewirkt zwar meist eine schnelle Reduktion des mRNA-Spiegels, aber es ist von der Halbwertszeit des Proteins abhängig, wann sich diese Reduktion tatsächlich auch im Proteinspiegel des Zielproteins bemerkbar macht. Je stabiler das Protein, desto später wird der RNAi-Effekt auf Proteinebene nachweisbar (zur Übersicht: Duxbury *et al.*, 2003; Scherr *et al.*, 2004; Narry Kim, 2003). Das humane Onkoprotein *Bcr-Abl* ist äußerst stabil. Spiller *et al.* (1998) bestimmten die Halbwertszeit von $p210^{Bcr\text{-}Abl}$ (e13a2) in humanen KYO-1 Zellen auf > 48 h. Sie konnten außerdem nachweisen, dass die Stabilität des Zielproteins einen großen Einfluss auf die Effektivität von as-ODN hat. So blieb der $p210^{Bcr\text{-}Abl}$ (e13a2)-Proteinspiegel nach as-ODN-Behandlung trotz erfolgreicher Absenkung des mRNA-Spiegels zu frühen Zeitpunkten der Behandlung unbeeinflusst. Übereinstimmend zeigen die Resultate dieser Arbeit, dass eine dauerhafte siRNA-Präsenz (≥ 48 h) in den Zellen notwendig war, um eine signifikante Reduktion des Bcr-Abl-Proteins und vor allem eine Aufhebung des leukämischen Phänotyps der behandelten Zellen zu erreichen (Abb.6.10). Eine einzelne Behandlung mit synthetischen siRNA-Molekülen war dafür nicht ausreichend. Diese Beobachtung wurde durch die Daten weiterer Arbeitsgruppen bestätigt, die zeigten, dass eine einmalige Behandlung mit anti-*Bcr-Abl*-siRNA zwar eine deutliche Reduktion der *Bcr-Abl*-Transkriptmenge bewirkt, diese aber kaum auf der Bcr-Abl-Proteinebene sichtbar wird (Wilda *et al.*, 2002; Scherr *et al.*, 2003).

Die Verlängerung der siRNA-Exposition gelang in der vorliegenden Arbeit zunächst durch mehrfache siRNA-Behandlung im Abstand von 24 h. Dabei konnte mit Hilfe eines Reportergen-Assays (Abb.6.13-B) bestätigt werden, dass auch nach mehrfacher siRNA-Elektroporation alle behandelten Zellen gleichermaßen von der Genexpressions-Hemmung betroffen waren. Die beobachtete Wirkung der RNAi auf die *Bcr-Abl*-Expression und auf das Überleben der Zellen spiegelte also den Zustand der gesamten Zellpopulation wider. Durch dieses optimierte siRNA-Behandlungsprotokoll wurde sowohl bei den humanen als auch bei den murinen hämatopoetischen Zelllinien eine Reduktion des Bcr-Abl-Proteinspiegels um bis zu 86% (siehe Abb.6.23) erreicht. Der Verlust der transformierenden Eigenschaften des Onkogens führte in allen Zelllinien auch zu einem Rückgang der Teilungsfähigkeit bzw. zum Absterben der Zellen. Erzielt wurde dabei ein Viabilitätsverlust um bis zu 96,4% verglichen mit entsprechenden Kontrollen (vgl. Abb.6.10-B). Die Effizienz dieses optimierten Protokolls übertraf deutlich die Resultate, die von anderen Arbeitsgruppen bislang durch einmalige Übertragung von Anti-*Bcr-Abl*-siRNAs erzielt werden konnten (Wilda *et al.*, 2002; Scherr *et al.*, 2003).
Als alternativer Ansatz für eine Verlängerung der siRNA-Wirkung in der Zelle wurde außerdem eine stabile intrazelluläre Expression von ‚short hairpin RNAs' (shRNAs) überprüft (siehe 7.5).

7.1.3 Sequenzspezifität der siRNA-Wirkung

Als ‚microRNAs' (miRNAs) bezeichnet man eine ständig wachsende Gruppe kleiner nicht-codierender regulatorischer Gene die in zahlreichen Eukaryonten identifiziert werden konnten. Bei einigen konnte gezeigt werden, dass sie als translationelle Inhibitoren die Expression partiell homologer mRNAs regulieren (zur Übersicht: Nelson *et al.*, 2003). Neuere Erkenntnisse der miRNA-Forschung weisen darauf hin, dass der Anteil komplementärer Basen zwischen der miRNA und der ‚Target'-mRNA über die Funktion der miRNA bestimmt. Bei partieller Sequenzübereinstimmung wird die Translation der ‚Target'-mRNA gehemmt, während eine vollständige Sequenz-Homologie die Degradation der Zielstruktur zur Folge hat. Eine miRNA könnte also auch als siRNA wirken und umgekehrt (Doench *et al.*, 2003). Dies hätte natürlich erhebliche Folgen für die praktische Anwendung der RNAi: die Bestimmung spezifisch wirkender siRNA-Moleküle würde erschwert und eine selektive Hemmung von Fusionsgenen ohne Beeinträchtigung der Expression der am Fusionsprodukt beteiligten physiologischen Gene wäre nahezu unmöglich.

Die Sequenz der verwendeten, gegen die Bruchpunkt-Regionen gerichteten siRNA-Moleküle stimmt in etwa zur Hälfte auch mit der entsprechenden Sequenz des physiologischen *Abl*- bzw. *Bcr*-Transkripts überein. Um eine ‚off-Target'-Wirkung, also eine Wirkung der siRNA-Moleküle auf die Expression anderer Gene als die des Zielgens auszuschließen, wurde nach Induktion der *Bcr-Abl*-RNAi zusätzlich zur Analyse des Bcr-Abl-Proteinspiegels auch eine Untersuchung der beiden physiologischen Ausgangs-Proteine, Bcr und c-Abl, vorgenommen. In 32Dp210/e14a2-Zellen konnte keine Beeinträchtigung des Bcr- und c-Abl-Proteinspiegels nach *Bcr-Abl*-RNAi festgestellt werden (Abb.6.4). Sowohl die murine *Bcr*- als auch die murine *Abl*-Sequenz weisen in der zu den verwendeten siRNAs (BAF7/BAF9) homologen Region mindestens eine Basenabweichung zur entsprechenden humanen *Bcr-Abl*-Sequenz auf. Die murine *Abl*-Sequenz stimmt mit dem *Abl*-Anteil der *Bcr-Abl-e14a2*-spezifischen siRNA BAF7 bis auf eine Nukleotidbase (+8; stromabwärts der Fusionsstelle) überein. Bei der siRNA BAF9 sind es zwei Basenabweichungen (+8, +12). Der *Bcr*-homologe Sequenzbereich beider siRNA-Moleküle weist eine Basenabweichung (-5; stromaufwärts der Fusionsstelle) zur entsprechenden murinen *Bcr*-Sequenz auf. Daraus ergibt sich für beide siRNAs BAF7 und BAF9 eine Homologie von 10 Positionen zur murinen *Abl*-Sequenz und eine Übereinstimmung in 11 bzw. 10 Positionen (bezogen auf den as-Strang) mit der murinen *Bcr*-Sequenz. Dass trotz dieser hohen Sequenzübereinstimmung, kein Einfluss der siRNAs auf die Expression dieser Gene sichtbar wird, spricht für die hohe Spezifität der RNAi.

Bei den humanen M07p210/e14a2-Zellen war nach siRNA-Behandlung parallel zur Hemmung der *Bcr-Abl*-Expression auch ein Abfall im Bcr- und Abl-Proteinspiegel erkennbar (Abb.6.5). Die GAPDH-Expression war zu diesem Zeitpunkt (noch) nicht beeinträchtigt. Dieser Effekt schien aber eine Begleiterscheinung des Sterbeprozesses der betroffenen Zellen darzustellen, da ein vergleichbares Proteinmuster auch nach Hemmung von Bcr-Abl mit Hilfe des Inhibitors Imatinib mesylate erkennbar war (Abb. 6.2). ~ 15 h nach Behandlung von M07p210/e14a2-Zellen mit dem kompetenten Inhibitor sank durch den Verlust der Bcr-Abl-TK-Aktivität auch die Viabilität der Zellen ab. Parallel war dabei ein Abfall sowohl des Bcr- als auch des Abl-Proteinspiegels sichtbar. Diese Abnahme vollzog sich, wie bei der *Bcr-Abl*-RNAi noch vor einer sichtbaren Beeinträchtigung des GAPDH-Spiegels.
In den humanen Zellen war demnach im Gegensatz zu den murinen Zellen die Beeinträchtigung der Viabilität bereits 24 h nach der zweiten siRNA-Behandlung stark genug, um sich auf das Proteinmuster der Zelle auszuwirken. Ein Grund für diese Abweichung könnte sein, dass bei den humanen Zellen im Gegensatz zu den murinen Zellen der Verlust des ‚Überlebens-

signals' Bcr-Abl nicht durch Zugabe externer Wachstumsfaktoren ersetzt werden kann. Bei den 32Dp210/e14a2-Zellen wurde während der siRNA-Behandlung mIL-3 zum Medium gegeben. Daher entspricht das in Abb.6.4 analysierte Proteinmuster dem Status: 24 h nach Verlust des ‚Überlebenssignals'. Bei den M07p210/e14a2-Zellen dagegen beginnt dieser Zustand bereits bei einsetzender Abnahme des Bcr-Abl-Proteinspiegels nach erstmaliger Behandlung. 24 h nach der zweiten siRNA-Behandlung bedeutet also: länger als 24 h ohne ‚Überlebenssignal'.

Diese Überlegungen, und die Beobachtungen der hohen Sequenzspezifität der siRNA-Wirkung in den murinen Zellen unterstützen die These, dass der Rückgang des Bcr- und Abl-Proteinspiegels im Verlauf der *Bcr-Abl*-RNAi bei den M07p210/e14a2-Zellen mit großer Wahrscheinlichkeit auf einen Bcr-Abl-bedingten Verlust der Viabilität zurückzuführen ist, und nicht auf eine ‚off-Target'-Wirkung der RNAi. Die Tatsache, dass auch andere Arbeitsgruppen nach Applikation von Anti-*Bcr-Abl*-siRNAs keine Effekte auf die *Abl*-Expression beobachten konnten, bekräftigt diese Annahme (Wilda *et al*., 2002; Scherr *et al*., 2003).

Gegen eine ausgeprägte miRNA-Wirkung der in unseren Experimenten verwendeten siRNAs spricht aber vor allem, dass bereits eine einzelne Basenabweichung der siRNA-Sequenz von der mRNA-Sequenz ausreichte, um die Effizienz der Gen-Stilllegung und die damit verbundenen Auswirkungen auf den Phänotyp der Zellen erheblich abzumildern (Abb.6.10). Auch die Beobachtung, dass siRNAs die gegen *Bcr-Abl-e14a2* gerichtet waren nur die entsprechende ‚Target'-mRNA, nicht jedoch die anderer Bruchpunkte mit demselben *Abl*-Anteil (*a2*) effektiv hemmten bestätigen diese Auffassung. So konnte für die *Bcr-Abl-e14a2*-spezifische siRNA BAF9 gezeigt werden, dass eine Behandlung von 32Dp210/e13a2-Zellen keine deutliche Reduktion des Bcr-Abl (e13a2)-Proteinspiegels bzw. der Viabilität bewirkte (Abb.6.16; Abb.6.28). Auch eine Behandlung von 32Dp190/e1a2-Zellen mit BAF9 und der *e13a2*-spezifischen siRNA BAF19 hatte keine Wirkung auf die *Bcr-Abl-e1a2*-Expression (Abb.6.19).

7.1.4 Die anti-leukämische Wirkung der *Bcr-Abl*-RNAi ist Bcr-Abl-abhängig

Ein Hinweis auf die ‚Target'-Abhängigkeit der beobachteten siRNA-Wirkung in den 32Dp210/e14a2-Zellen war, dass der durch den *Bcr-Abl*-Verlust erzielte Proliferations-Stopp durch Zugabe von mIL-3 zum Medium vollständig kompensiert werden konnte (Abb.6.11). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in 32Dp210/e14a2-Zellen das durch Bcr-Abl repräsentierte ‚Überlebenssignal' durch den Wachstumsfaktor mIL-3 ersetzt werden kann. So konnte der durch die Behandlung mit dem spezifischen Bcr-Abl-TK-Inhibitor Imatinib ausgelöste Zelltod durch Zugabe von mIL-3 verhindert werden (Abb.6.1). Die Tatsache, dass auch der durch die *Bcr-Abl*-RNAi ausgelöste Viabilitätsrückgang, durch externe Zugabe des Zytokins verhindert werden konnte, spricht dafür, dass auch diese RNAi-induzierte Wirkung direkt auf den *Bcr-Abl*-Verlust zurückzuführen ist.

7.2 Bestimmung effektiver anti-*Bcr-Abl*-siRNAs

Die drei klinisch relevanten *Bcr-Abl*-Varianten *Bcr-Abl-e1a2*, *-e13a2* und *-e14a2* entstehen durch Fusion des immer konstanten *Abl*-Anteils (*a2*) an unterschiedliche Bereiche der *Bcr*-Sequenz (*e1/e13/e14*) (vgl. 4.1.3).
Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Proteinspiegel aller drei Bcr-Abl-Varianten $p210^{Bcr\text{-}Abl}$ (e13a2/e14a2) und $p190^{Bcr\text{-}Abl}$ (e1a2) mit Hilfe des entwickelten RNAi-*in-vitro*-Protokolls in murinen 32D-Zellen effektiv gesenkt werden konnten (Abb.6.4; Abb.6.16; Abb.6.19). Der siRNA-vermittelte Abfall des Bcr-Abl-Proteinspiegels war dabei immer mit einer Abnahme der Bioaktivität von Bcr-Abl verbunden. Dieser Aktivitätsverlust war in allen Fällen stark genug, um die Bcr-Abl-bedingte Transformation der Zellen aufzuheben. Eine erfolgreiche Inaktivierung von *Bcr-Abl* durch RNAi führte immer zu einem Rückgang der Teilungsfähigkeit und/oder zum Tod der behandelten Zellen.

Es gelang für alle drei Onkogenvarianten siRNAs zu bestimmen, die die Expression effektiv hemmen. Die Sequenz der verwendeten siRNA-Moleküle überspannte dabei stets die Bruchpunkt-Region der *Bcr-Abl*-mRNA (Abb.6.3; Abb.6.15; Abb.6.18). Dies geschah, um eine Beeinflussung der Expression des zellulären *Bcr*- und *Abl*-Gens zu vermeiden. Aufgrund dieser Beschränkung der Zielsequenz auf die Bruchpunkt-Region war die Wahl möglicher siRNA-Sequenzen limitiert. Dennoch zeigen die hier durchgeführten Versuche, dass die

Überprüfung von 1-4 verschiedenen siRNA-Varianten ausreichte, um für jedes der drei Fusionsgene eine effektive siRNA zu bestimmen.

7.2.1 Voraussetzung für die Effektivität von siRNAs

Die Vorhersage der Effektivität der siRNA-Moleküle bleibt jedoch schwierig. Die Resultate dieser Arbeit zeigen, dass trotz der hohen Sequenzüberlappungen die Effizienz der getesteten siRNA-Moleküle oft erheblich variierte (Sequenz-Übersicht: Tab.5.6; Tab.5.7; Tab.5.8). Beispielsweise ist die Sequenz der *Bcr-Abl-e13a2*-spezifischen siRNA BAF3 nahezu identisch zu der von BAF15, nur um zwei Basen weiter in Richtung der *Abl*-Sequenz verschoben (Abb.6.15). Dennoch zeigen die Experimente in 32Dp210/e13a2-Zellen, dass eine Behandlung mit BAF15 zu einer signifikanten Hemmung der *Bcr-Abl*-Expression führte, während BAF3 keinerlei hemmende Wirkung zu haben schien (Abb.6.16). Dieselbe Beobachtung konnte bei den gegen *Bcr-Abl-e1a2* gerichteten siRNAs BAF22 und BAF24 gemacht werden. Die BAF24-Sequenz reicht im Vergleich zu BAF22 nur um drei Basen weiter in die *Abl*-Region des Fusionstranskripts (Abb.6.18). BAF22 hemmte effektiv die *Bcr-Abl-e1a2*-Expression in 32Dp190/e1a2 Zellen, BAF24 dagegen nicht (Abb.6.19).
Diese Diskrepanz könnte durch unterschiedliche strukturelle Charakteristika der *Bcr-Abl*-mRNA im Bereich der Bruchpunkt-Sequenz verursacht werden. Es ist bekannt, dass die biologische Aktivität einer gegebenen siRNA nicht allein von ihrer Sequenz-Information abgeleitet werden kann, sondern auch durch die Sekundär- und Tertiärstruktur der ‚Target'-mRNA bestimmt wird. Diese lokalen Struktureigenschaften der mRNA scheinen das Hybridisierungspotential zwischen der abzubauenden mRNA und dem as-Strang der siRNA zu beeinflussen (Kretschmer-Kazemi Far *et al.*, 2003). Im Zuge einer Entwicklung konventioneller as-Techniken für die Expressionshemmung von *Bcr-Abl* wurde bereits 1996 die mRNA-Struktur der *Bcr-Abl*-Bruchpunkt-Sequenz auf ihre Zugänglichkeit für as-ODN hin untersucht. Eine rechnerische Analyse des Faltungspotentials der *Bcr-Abl-e14a2*-mRNA lieferte vor allem im Bereich des Bruchpunkts deutliche Hinweise auf ausgedehnte intramolekulare Interaktionen (Kronenwett *et al.*, 1996). Besonders prädestiniert für die Ausbildung stabiler Sekundärstrukturen schien der Bereich +9-+58 (relativ zum Fusionspunkt) stromabwärts des Bruchpunkts zu sein. Die Autoren folgerten daher, dass für einen Angriff mit komplementären Nukleinsäuren vor allem der Bereich der *Bcr*-Sequenz und nur die ersten 8 Nukleotide der *Abl*-Sequenz geeignet sind.

Da die *Abl*-Sequenz aller in dieser Arbeit untersuchten *Bcr-Abl*-Traskriptvarianten übereinstimmt, ist dieses aus der Analyse des *Bcr-Abl-e14a2*-Transkripts gezogene Resümee möglicherweise auch für die *Bcr-Abl-e13a2* und *Bcr-Abl-e1a2*-Transkripte zutreffend. Tatsächlich war bei allen in dieser Arbeit getesteten siRNA-Varianten die Tendenz erkennbar, dass siRNA-Moleküle, die relativ weit in den Bereich der *Abl*-Sequenz des *Bcr-Abl*-Fusionstranskripts hineinreichten, weniger effektiv zu sein schienen. Die Sequenz der gegen das *Bcr-Abl-e13a2*-Transkript gerichteten siRNAs BAF3 und BAF17 reicht bis zu Nukleotid +13 bzw. +15 stromabwärts des Bruchpunkts. Beide siRNAs waren inaktiv. Die Sequenz der *Bcr-Abl-e1a2*-spezifischen inaktiven siRNA BAF24 reichte 14 Nukleotide weit in den Bereich der *Abl*-Sequenz. Auch bei den in K562-Zellen stabil exprimierten shRNAs erwies sich die shRNA (pS-BA3), deren Zielsequenz am weitesten in die *Abl*-Region (+ 12 nt) hineinreichte als schwächste Variante. Die Sequenz der in dieser Arbeit verwendeten aktiven siRNAs/ shRNAs enthielt dagegen nur maximal 8-11 Nukleotide der *Abl*-Sequenz. Eine Ausnahme bildete die aktive, gegen *Bcr-Abl-e14a2* gerichtete siRNA BAF9, deren ‚Target'-Sequenz wie die der nur mäßig aktiven shRNA-BA3, 12 Nukleotide weit in die *Abl*-Region reichte. Trotz einer weitgehenden Übereinstimmung ihrer Zielsequenz handelt es sich bei BAF9 und BA3 um Moleküle mit unterschiedlichem Design. BAF9 ist wie alle in dieser Arbeit verwendeten, chemisch synthetisierten siRNAs eine asymmetrische siRNA mit einer Länge von 21 nt (s-Strang) -23 nt (as-Strang) und einem Überhang von zwei Basen am 3'-Ende des as-Strangs (siehe 5.7.1). Die vom pS-BA3-Vektor exprimierte shRNA-BA3 dagegen hat eine Länge von 21 nt mit je einem 2 nt-Überhang an den 3'-Enden des Duplex (vgl. 5.7.2). Für letztere ‚klassische' siRNA-Variante konnten bislang noch weitere Strukturmerkmale festgelegt werden, die die Effektivität beeinflussen. Wie in 7.5 diskutiert, entspricht die Sequenz der BA3-shRNA nicht den für eine funktionelle siRNA evaluierten Bedingungen. Die hohe Effektivität der siRNA BAF9 trotz einer Bindung an denselben Bereich der mRNA wie die shRNA BA3, deutet darauf hin, dass die schwache Aktivität im Fall der shRNA BA3 unabhängig ist von der mRNA-Struktur und sehr wahrscheinlich auf die shRNA-Sequenz selbst zurückzuführen ist.

Zusammenfassend weisen die Resultate dieser Arbeit auf die Positon +12 stromabwärts des *Bcr-Abl*-Bruchpunkts als kritische Position für eine effektive Target-Bindung hin. siRNA-Moleküle deren ‚Target'-Sequenz weiter stromabwärts lag, waren inaktiv. Auch sämtliche inzwischen von anderen Arbeitsgruppen veröffentlichten funktionellen Anti-*Bcr-Abl*-siRNA-Sequenzen bestätigen diese Regel. So wurden stets *Bcr-Abl-e14a2*-siRNA-Zielsequenzen verwendet, die im Vergleich zu der in dieser Arbeit eingesetzten BAF7 um 1-2 Positionen

weiter in den *Bcr*-Bereich des Fusionstranskripts versetzt lagen (Wilda *et al.*, 2002; Scherr *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2003).

7.3 Die *Bcr-Abl*-RNAi sensitiviert *Bcr-Abl*$^+$-Zellen gegenüber Imatinib

Die Entdeckung des hoch effektiven Bcr-Abl-TK-Inhibitors Imatinib mesylate, und die Zulassung des entsprechenden Medikaments (Gleevec™, Glivec®, Novartis, Schweiz) für die Klinik durch die amerikanische FDA 2001, führte zu einer umfassenden Veränderung der Behandlungsstrategie Ph$^+$-Leukämien. Bereits in einer Phase I-Studie an Patienten mit CML in der chronischen Phase (CP-CML) erzielte die Imatinib-Therapie eindrucksvolle Ergebnisse (Druker *et al.*, 2001 (A)): 53 von 54 Patienten zeigten nach vier Wochen Imatinib-Behandlung (400 mg/Tag) eine komplette Normalisierung des Blutbildes. Diese Verbesserung hielt bei 96% der behandelten Patienten auch noch nach einem Jahr an. Auch in den sich anschließenden Phase II- und Phase III-Studien an CP-CML-Patienten überzeugte die Effektivität des Inhibitors (Kantarjian *et al.*, 2002; O'Brien *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu erwies sich die Behandlung von Patienten mit CML in der Blastenkrise (BC) und von Patienten mit Ph$^+$-ALL als weniger erfolgreich. Das Fortschreiten der Erkrankung ließ sich hier meist trotz fortgesetzter Gabe des Inhibitors nur kurzfristig aufhalten (Druker *et al.*, 2001 (B); Sawyers *et al.* 2002; Talpaz *et al.*, 2002; Kantarjian *et al.*, 2002). Dieses Therapie-Versagen wird auf das häufige Auftreten von Imatinib-Resistenzen während dieser genetisch instabilen Phase der BC-CML und der Ph$^+$-ALL zurückgeführt (Kantarjian *et al.*, 2002; Sawyers *et al.*, 2002). Die Entwicklung einer Resistenz gegenüber Imatinib ist allerdings nicht nur auf die genetisch instabilen akuten Leukämie-Stadien beschränkt, sondern findet sich auch bei einer kleinen Anzahl CP-CML-Patienten, die bereits auf Imatinib angesprochen haben (Barthe *et al.*, 2002; Branford *et al.*, 2002; Roche-Lestienne et al 2002; Kreuzer *et al.*, 2003; Hochhaus, 2003; Branford *et al.*, 2003).

Bei der Mehrheit der Patienten mit erworbener Imatinib-Resistenz scheint der Wirkungsverlust durch Punktmutationen innerhalb des für die ATP-BD codierenden Genbereichs verursacht zu werden. Diese Mutationen führen durch Veränderung einer einzelnen Aminosäure (AS) in der ATP-BD des Proteins zu einer Reduktion der Affinität gegenüber Imatinib (zur Übersicht: Cowan-Jacob *et al.*, 2004).

Aufgrund der nun immer offensichtlicher werdenden Limitierung der Imatinib-Therapie, ist es von großem Interesse weitere alternative bzw. ergänzende Strategien für die klinische Bcr-Abl-Hemmung zu entwickeln.

Um zu Überprüfen, inwiefern die *Bcr-Abl*-RNAi eine Möglichkeit darstellt, durch Punktmutationen bedingte Resistenzen gegen Imatinib mesylate zu überwinden, wurde ein entsprechendes Zellmodell etabliert. Zwei 32D-Zelllinien wurden mit je einer punktmutierten *Bcr-Abl*-Variante transfiziert. Beide mutierten *Bcr-Abl*-Sequenzen stammten aus Leukämie-Patienten mit erworbener Imatinib-Resistenz (von Bubnoff *et al.*, 2002). Die Expression jedes dieser mutierten Gene führte zur Bildung einer Bcr-Abl-Proteinvariante, die im Vergleich zum Bcr-Abl-wt-Protein einen AS-Austausch im Bereich der Bcr-Abl-TKD aufwies. Die verwendete Bcr-Abl-Form Bcr-Abl-T315I enthält statt Threonin Isoleucin an Position 315. Diese Variante gehört zu einer Gruppe von AS-Veränderungen in der Bcr-Abl-TKD (T315I, G250Q, Q255K, Y253H), für die eine sehr hohe Resistenz-vermittelnde Wirkung beschrieben wurde (zur Übersicht: Cowan-Jacob *et al.*, 2004). Die zweite getestete Variante (H396P) besitzt an Position 396 ein Prolin anstatt des Histidins im nicht-veränderten Bcr-Abl (wt). Sie bewirkt bekanntermaßen nur eine geringfügige Desensitivierung gegenüber Imatinib (Hochhaus *et al.*, 2002; von Bubnoff *et al.*, 2002; Shah *et al.*, 2002).
Eine Überprüfung der Imatinib-Wirkung auf die so etablierten Zelllinien bestätigte die bereits beschriebene Resistenz-vermittelnde Wirkung der entsprechenden *Bcr-Abl*-Mutationen (vgl. 6.22). Die 32Dp210-T315I Zellen waren hochgradig unempfindlich gegen Imatinib (IC_{50}: 5,2 µM). Die Sensitivität gegenüber dem Inhibitor war 17fach niedriger als in 32Dp210-wt Zellen (IC_{50}: 0,3 µM). Dagegen war bei den 32Dp210-H396P-Zellen die Imatinib-Wirkung nur teilweise reduziert. Die Empfindlichkeit (IC_{50}: 1,4 µM) war in diesen Zellen im Vergleich zu der der 32Dp210-wt-Zellen etwa um das 4,7fache herabsetzt.
Bemerkenswerterweise führte die *Bcr-Abl*-RNAi bei allen drei Linien unabhängig vom Status der Imatinib-Sensitivität zu einer effektiven Reduktion der *Bcr-Abl*-Expression. Diese Gen-Inaktivierung war bei den Imatinib-resistenten Zellen in gleichem Maße mit einem deutlichen Viabilitätsverlust verbunden wie bei den Imatinib-sensitiven Zellen (siehe Abb.6.23, 6.24). Die Technik der *Bcr-Abl*-RNAi erwies sich nach den vorliegenden Untersuchungen also schon für sich allein genommen, zumindest *in vitro*, in ihrer anti-leukämischen Wirkung als außerordentlich effektiv.
Eine Untersuchung möglicher additiver Effekte von *Bcr-Abl*-RNAi und Imatinib-Behandlung zeigte weiter, dass durch eine RNAi-vermittelte Reduktion des Bcr-Abl-Proteinspiegels die

Wirkung von Imatinib noch erhöht werden kann. Dies galt nicht nur für die 32Dp210-wt-Zellen, sondern auch für die partiell Imatinib-resistente Zelllinie 32Dp210-H396P. Bei den 32Dp210-wt Zellen konnte die Sensitivität gegenüber Imatinib durch die zusätzliche siRNA-Behandlung um etwa das 3,4fache erhöht werden (IC_{50} (ohne *Bcr-Abl*-RNAi): 0,27 µM auf IC_{50} (mit *Bcr-Abl*-RNAi): 0,08 µM). Entsprechende Resultate wurden bei den 32Dp210-H396P Zellen erzielt: Durch Verbesserung der Imatinib-Empfindlichkeit mit Hilfe der *Bcr-Abl*-RNAi um das 4fache konnte bei diesen Zellen eine Sensitivität erreicht werden, die in etwa der Sensitivität unbehandelter 32Dp210-wt-Zellen (IC_{50}: 0,3 µM) entspricht. In der komplett Imatinib-resistenten Zelllinie 32Dp210-T315I konnte dagegen durch die *Bcr-Abl*-RNAi keine Sensitivierung gegenüber Imatinib erzielt werden (vgl. Abb.6.24).
Diese Daten stehen im Kontrast zu Beobachtungen von Wilda *et al.* (2002). Deren Arbeitsgruppe konnte keine additive Wirkung einer *Bcr-Abl*-RNAi und einer Behandlung mit Imatinib auf die Apoptoseinduktion in K562-Zellen feststellen. Die verwendeten K562-Zellen wiesen jedoch eine sehr hohe Imatinib-Resistenz auf: 48 h nach Imatinib-Behandlung waren nur 8% der untersuchten Zellen apoptotisch. Ein solches System, das auf eine Hemmung von Bcr-Abl durch den hoch effektiven Inhibitor Imatinib relativ unempfindlich reagiert, scheint eher ungeeignet für die Untersuchung möglicher synergistischer Effekte von Imatinib mit anderen potentiellen Inhibitoren. Ein weiterer Grund für die schlechte Proliferationshemmende Wirkung der RNAi bei Wilda und Kollegen ist vermutlich auch die kurze siRNA-Exposition. So erfolgte die siRNA-Behandlung nur einmalig und hatte eine dementsprechend schwache Beeinträchtigung des Bcr-Abl-Proteinspiegels zur Folge.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Erhöhung der Imatinib-Empfindlichkeit nach Reduktion des Bcr-Abl-Proteinspiegels durch RNAi ist vermutlich auf einen Dosiseffekt zurückzuführen. Durch Senkung des Bcr-Abl-Proteingehalts in den Zellen wird das Verhältnis Medikament/Zielprotein zugunsten des Medikaments, also Imatinib verschoben. Dies kann sich jedoch nur dann positiv auf die Imatinib-Wirkung auswirken, wenn dessen Wirkung grundsätzlich gewährleistet ist. Im Fall der Bcr-Abl-T315I-Variante ist die Bindung von Imatinib nahezu vollständig blockiert, da der Threonin-Rest an Position 315 direkt mit Imatinib über eine Wasserstoff-Brücke interagiert. Durch den Austausch von Threonin zu Isoleucin geht diese H-Bindung verloren (zur Übersicht Cowan-Jacob *et al.*, 2004). Eine Verhältnisverschiebung Imatinib/Bcr-Abl zugunsten des Inhibitors kann daher auch keine Verbesserung seiner Wirkung erzielen. Bei der Bcr-Abl-H396P-Variante dagegen ist die Affinität gegenüber Imatinib nur vermindert. Imatinib kann grundsätzlich immer noch an Bcr-

Abl binden und die TK-Aktivität hemmen. Die Reduktion des Bcr-Abl-Proteingehalts durch RNAi und der damit verbundene Anstieg der Imatinib-Moleküldichte pro Bcr-Abl-Protein führen so zu einer verbesserten Wirkung des Medikaments. Bei Patienten mit Imatinib-Resistenz wäre eine solche Technik nur sinnvoll, wenn die Natur der Resistenz derart ist, dass sie durch Anhebung der Imatinib-Dosis überwunden werden kann. Tatsächlich konnten Studien zur Imatinib-Therapie von CML-Patienten in fortgeschrittenem Stadium zeigen, dass eine Erhöhung der Imatinib-Dosis von 400 mg/Tag auf 600 mg/Tag eine signifikante Verbesserung der Therapie bei dieser problematischen Patienten-Gruppe bewirkt (Sawyers *et al.* 2002; Talpaz *et al.*, 2002). Dies deutet darauf hin, dass das Versagen der Imatinib-Therapie bei diesen Patienten vor allem durch zelluläre Veränderungen verursacht wird, die die effektive Imatinib-Moleküldichte/Bcr-Abl-Protein herabsenken (beispielsweise durch *Bcr-Abl*-Amplifikation, *Bcr-Abl*-Überexpression, *Bcr-Abl*-Mutationen). In diesem Fall können höhere Tagesdosen die Effizienz der Behandlung verbessern. Das Überwinden derartiger Resistenzen durch einfaches Anheben der Imatinib-Konzentration ist jedoch nur begrenzt möglich, da bereits eine Dosis von 800 mg/Tag toxische Nebeneffekte verursacht (Kantarjian *et al.*, 2003).

Die RNAi könnte hier eine Lösung bieten, da durch diese Technik über eine Senkung des Bcr-Abl-Proteingehalts die Wirksamkeit von Imatinib bei gleich bleibender Tagesdosis verbessert werden könnte.

Aufgrund der häufigen Ausbildung von Resistenzen während der genetisch instabilen Phase der BC-CML und der Ph^+-ALL ist es zukünftig durchaus sinnvoll mehrere Therapieansätze zu kombinieren, um eine Desensitivierung gegenüber den verwendeten Therapeutika zu vermeiden oder zumindest zu verlangsamen. Die RNAi könnte hier eine zusätzliche Alternative darstellen. Eine Weiterentwicklung der RNAi-Technik für die Klinik wäre daher für die Behandlung Ph^+-Leukämien sicher ein Gewinn.

7.4 Untersuchung stabilisierender siRNA-Modifikationen

Trotz der an sich schon recht hohen Stabilität der kurzen siRNA-Doppelstränge ist es angesichts einer potentiellen klinischen Anwendung der *Bcr-Abl*-RNAi wünschenswert die Serumstabilität der siRNAs noch weiter zu erhöhen. Eines der Ziele dieser Arbeit war zu testen, inwiefern sich stabilisierende Modifikationen auf die Effektivität der siRNA-Moleküle auswirken.

Eine bekannte Möglichkeit die Stabilität von Oligonukleotiden zu erhöhen ist die Verwendung von Nukleotiden mit modifiziertem Ribosezucker. Im Fall der siRNA-Moleküle werden chemische Modifikationen vorzugsweise an Nukleotiden des 3‘-Endes des jeweiligen siRNA-Strangs vorgenommen, da dieser Teil gegenüber einer Blockierung weitgehend unempfindlich zu sein scheint (Chiu *et al.*, 2003; Elbashir *et al.*, 2001 (A/B/C)). In der vorliegenden Arbeit wurde eine siRNA mit einer 2’-O-Methyl-Modifikation an zwei Nukleotiden des 3‘-Ende des as-Stranges (BAF12) validiert (vgl. 5.7.1). 2’-O-Methyl-Gruppen erhöhen die RNA-Stabilität, indem sie deren Konformation so verändern, dass diese gegenüber Nukleasen resistenter wird (Cummins *et al.* 1995). Sie scheinen außerdem im Gegensatz zu den bei as-ODN geläufigen Phosphorothioat-Modifikationen weniger toxisch zu wirken (zur Übersicht: Kurreck, 2004).

Ein weiteres getestetes Stabilisierungsmotiv war eine Sequenzanpassung der siRNA-Moleküle (BAF16/BAF18/BAF20). Hierbei wurde die Sequenz im Bereich des 3‘-Endes des as-Strang so verändert, dass durch das Entstehen zusätzlicher induzierter Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen den benachbarten aromatischen Ringsystemen der Nukleotide (Stapelwechselwirkungen = ‚stacking interactions‘) eine Stabilisierung des RNA-Moleküls erreicht wurde (Stabilisierungsdaten: Alnylam Europe AG) (Abb.5.3). Eine Abweichung der siRNA-Sequenz von der mRNA-Targetsequenz sollte sich an diesen Positionen nicht auf die Aktivität der siRNAs auswirken, da bekannt ist, dass die Sequenz des siRNA-Überhangs nicht zur Zielerkennung beiträgt (Elbashir *et al.*, 2001 (C)).

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigten, dass beide Stabilisierungsvarianten die Effizienz der siRNAs nicht beeinträchtigen. Alle modifizierten siRNAs induzierten einen zu den entsprechenden nicht-modifizierten Pendants vergleichbaren *Bcr-Abl*-RNAi-Effekt (siehe 6.5). Eine Verbesserung bzw. Verlängerung des RNAi-Effektes wurde jedoch nicht erzielt (Abb.6.26). Inwiefern sich eine Verwendung nukleasestabiler siRNA-Moleküle tatsächlich auf die Dauer des erzielten RNAi-Effektes *in vitro* auswirkt ist fraglich. Amarzguioui und Kollegen berichteten beispielsweise von einer Verlängerung des RNAi-Effekts bei Verwendung einer 2‘-O-Methyl-stabilisierten siRNA-Variante in HaCaT-Zellen (Amarz-guioui *et al.*, 2003). Hamada *et al.* (2002) dagegen konnten keinerlei Verlängerung des RNAi-Effekts bei Verwendung einer 2‘-Hydroxyethylphosphat-stabilisierten siRNA beobachten. Diese Ergebnisse lassen sich jedoch nicht direkt vergleichen, da unterschiedliche Verssuchsysteme und unterschiedliche siRNA-Modifikationen verwendet wurden.

Generell kann man sicher sagen, dass sich die erhöhte Stabilität erst dann deutlich positiv auf die Effizienz der RNAi auswirken kann, wenn die siRNA-Moleküle längere Zeit dem Serum

ausgesetzt sind bevor die Zielzellen erreicht werden. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass sich eine erhöhte siRNA-Stabilität vor allem bei einer Anwendung der siRNA *in vivo* vorteilhaft auf die RNAi-Effizienz auswirkt.

7.5 Stabile Expression von anti-*Bcr-Abl*-shRNAs in K562-Zellen

Die durch direkte Übertragung synthetischer siRNA-Moleküle in Säugerzellen induzierte RNAi ist, wie bereits besprochen, nur von kurzer Dauer (vgl. 7.1.2). Eine Möglichkeit diesem Problem zu begegnen, ist die Verwendung von siRNA-Expressionsvektoren, die eine stabile intrazelluläre Expression von siRNA-Molekülen ermöglichen. In dieser Arbeit wurde ein in jüngster Zeit entwickeltes System (Brummelkamp *et al.*, 2002) verwendet, bei dem ausgehend von einem RNA-Polymerase III (Pol III)-Promotor die Transkription eines Haarnadel-Konstrukts, einer so genannten ‚short haipin RNA' (shRNA), veranlasst wird. Diese shRNAs werden dann vom Dicer zu 21 nt-siRNA umgewandelt (siehe Abb.5.4). Pol III-Promotoren finden sich in Genen, die für kleine RNA-Varianten (snRNAs) codieren, welche den siRNAs strukturell ähneln. Ihre Vorzüge liegen u.a. darin, dass sie in allen Säugergeweben aktiv sind und, dass alle essentiellen Transkriptionselemente (mit Ausnahme des ersten transkribierten Nukleotids) stromaufwärts liegen.

Es konnte schon vielfach gezeigt werden, dass durch konstitutive Expression von shRNAs ausgehend von den Pol III-Promotoren U6 und H1 eine stabile Hemmung der Zielgenexpression in Säugerzellen erreicht werden kann (zur Übersicht: Wilson *et al.*, 2003). Bislang nahm man jedoch an, dass einige Bruchpunkt-Regionen chimärer Onkogen-mRNAs nicht für die Hemmung durch Pol III-exprimierte shRNAs geeignet sind, da diese einen Abschnitt von vier oder mehr aufeinander folgenden Thymidin- bzw. Adenin-Basen enthalten. Polythymidin-Sequenzen sind das Terminationssignal für die RNA-Pol III, daher befürchtete man einen frühzeitigen Abbruch der Transkription bei shRNA-Sequenzen mit diesem Motiv. Einige der am häufigsten vorkommenden Leukämie-assoziierten chimären Onkogene besitzen solche Polythymidin/adenin-Motive in der Sequenz der Bruchpunkt-Region: *Bcr-Abl-e14a2*, *MLL/AF9, PLM/E2A, NUP98/HOXA9* und *MLL/AF4* (zur Übersicht: Damm-Welk, 2003).

In dieser Arbeit konnte anhand von Experimenten in den humanen, leukämischen K562-Zellen gezeigt werden, dass die Fusionsstelle zwischen *Abl*- und *Bcr*-Sequenz der *Bcr-Abl-e14a2*-mRNA trotz des ‚AAAA'-Motivs als effektive Zielsequenz für Pol III-transkribierte shRNA genutzt werden kann. Die Hemmung der *Bcr-Abl*-Expression führte auch in diesen

Zellen zu einem Verlust der Teilungsfähigkeit (Abb.6.33). Diese Beobachtung wurde von einer weiteren Arbeitsgruppe bestätigt, der eine erfolgreiche Hemmung der *Bcr-Abl-e14a2*-Expression mit Hilfe einer Pol III-transkribierten anti-*Bcr-Abl*-shRNA gelang (Li *et al.*, 2003).

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur shRNA-induzierten *Bcr-Abl*-RNAi in K562-Zellen wurden drei verschiedene shRNA-Sequenzen getestet. Dabei wurden ‚Target'-Sequenzen gewählt, die in dem von den bereits getesteten funktionellen, synthetischen siRNA-Molekülen (BAF7/BAF9) überspannten mRNA-Bereich lagen (vgl. Abb.6.32). Dennoch bewirkten nur die von den pSUPER-*Bcr-Abl*-1 und -2 (pS-BA-1, -2) exprimierten shRNAs eine effiziente Reduktion des Bcr-Abl-Proteinspiegels. Trotz der weitgehenden Überlappung der Zielsequenz der exprimierten shRNAs zeigte die weiter in den Bereich der *Abl*-Sequenz verschobene shRNA-BA3 eine erheblich schlechtere RNAi-Wirkung. Eine Möglichkeit für diese Diskrepanz könnte im verwendeten shRNA-Design liegen. Die shRNAs BA1 und BA2 entsprechen in ihrem Design den kürzlich von Schwarz *et al.* (2004) und Khvorova *et al.* (2004) aufgestellten Regeln für eine effektive siRNA-Sequenz. Beide Arbeitsgruppen konnten als einen entscheidenden Faktor für die Aktivität einer siRNA bzw. miRNA die thermodynamische Stabilität (ΔG [kcal/mol]) der jeweiligen Enden des siRNA-Doppelstrangs festlegen. Dieser Wert scheint darüber zu bestimmen, welcher Strang tatsächlich in den ‚RNA induced silencing complex' (RISC) aufgenommen wird. Um einen wirksamen Antisense-Effekt zu erreichen, sollte überwiegend der as-Strang der siRNA in den RISC inkorporiert werden. Dieses Ziel wird dann erreicht, wenn die Stabilität der Basensequenz des 5'-Endes des as-Strangs niedriger ist, als die des 3'-Endes. Ein typisches Design für eine effektive siRNA besteht demnach also aus einem A-U-Basenpaar (2 Wasserstoff-Brücken) am 5'-Ende des as-Strangs und einem G-C-Basenpaar (3 Wasserstoff-Brücken) am 5'-Ende des sense-Strangs. Von den drei in dieser Arbeit getesteten shRNAs entspricht die vom pS-BA1 exprimierte Variante vollständig dieser Regel (siehe Tabelle 6.1). Bei dieser shRNA ist die Stabilität des 5'-Endes des as-Strangs deutlich niedriger (ΔG: -9,6 kcal/mol) als die des 3'-Endes (ΔG: -11,2 kcal/mol). Bei der shRNA-BA2 ist der Stabilitätsunterschied zwischen den beiden Enden des Doppelstrangs nicht ganz so deutlich ($\Delta\Delta G_{(BA1)}$: -1,6 kcal/mol und $\Delta\Delta G_{(BA2)}$: -0,8 kcal/mol), dennoch stimmt die Tendenz mit der vorgegebenen Regel überein: die Stabilität des 5'-Endes des as-Strangs ist auch hier niedriger (ΔG: -8,1 kcal/mol) als die des 3'-Endes (ΔG: -8,9 kcal/mol). Die Stabilitätsverteilung der BA3-Basensequenz ist dagegen entgegengesetzt zu der publizierten Regel: hier liegt die Stabilität des 5'-Endes des s-

Strangs bei -7,7 kcal/mol und damit deutlich niedriger (ΔΔG: + 3,5 kcal/mol) als die Stabilität der Basensequenz am 3'-Ende (ΔG: -11,2 kcal/mol).

7.7 Fazit und Ausblick

Bei der CML konnte die zur Entstehung des Ph-Chromosom führende Translokation t(9;22) als ursächliches Ereignis für die Entwicklung der leukämischen Erkrankung identifiziert werden. Bei der ALL bedeutet das Vorhandensein des Ph-Chromosoms und damit die Expression des *Bcr-Abl*-Onkogens eine erhebliche Verschlechterung der klinischen Prognose. Trotz der Entwicklung eines effektiven Bcr-Abl-TK-Inhibitors (Imatinib mesylate; Glivec®) für die Therapie Ph^+-Leukämie-Patienten ist die Wirkung dieses Medikaments limitiert. Patienten mit BC-CML und Patienten mit Ph^+-ALL sprechen im Allgemeinen schlecht auf eine Imatinib-Behandlung an, da es hier gehäuft zur Ausbildung von Resistenzen gegen den Inhibitor kommt. Um einem derartigen Wirkungsverlust durch Selektion therapieresistenter Zellklone vorzubeugen ist es notwendig mehrere, alternative Therapiestrategien zu kombinieren. Die Stilllegung der *Bcr-Abl*-Expression mittels RNAi wäre als ein solcher alternativer Therapieansatz denkbar.

In dieser Arbeit gelang es durch entsprechende *in vitro*-Experimente zu zeigen, dass es möglich ist die Expression des chimären Onkogens *Bcr-Abl* durch Verwendung der RNAi-Technik effektiv und hoch spezifisch zu hemmen. Dieses Ergebnis wurde im Verlauf dieser Dissertation auch von weiteren Arbeitsgruppen bestätigt (Wilda *et al.*, 2001; Scherr *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003).
Trotz der Beschränkung der Zielsequenz auf die Bruchpunktregion gelang es für alle drei klinisch relevanten *Bcr-Abl*-Varianten siRNAs zu bestimmen, die die Expression des jeweiligen Onkogens effektiv hemmen. Dabei genügte eine Überprüfung von 1-4 verschiedenen siRNA-Varianten, um für jedes der drei Fusionsgene eine aktive siRNA zu finden. Ob diese hohe Erfolgsquote auf *Bcr-Abl* beschränkt ist, ist nicht klar, allerdings gibt es inzwischen Berichte, dass auch andere Leukämie-assoziierte Fusionsgene effektiv und spezifisch durch die RNAi gehemmt werden konnten. Beispielsweise gelang Heidenreich und Kollegen (2003) die Hemmung der Expression des t(8;21) Translokationsprodukts AML1/ETO, das eine der häufigsten Aberrationen bei der AML darstellt. Auch das beim Anaplastischen Großzelligen Lymphom (‚anaplastic large cell lymphoma', ALCL) vorkommende Fusionsgen NPM/ALK,

das durch die Translokation t(2;5) entsteht, konnte effektiv durch RNAi stillgelegt werden (Ritter *et al.*, 2003). Diese Berichte und die hohe Frequenz, mit der in dieser Arbeit effektive siRNA-Moleküle identifiziert werden konnten, weisen darauf hin, dass die RNAi als Technik für die selektive Inaktivierung von Fusionsgenen generell geeignet ist.
Ein erster Hinweis auf eine Eignung der RNAi-Strategie auch für die klinische Anwendung lieferte die im Rahmen dieser Dissertation gelungene Übertragung des in *Bcr-Abl*-transfizierten Zelllinien-Modellen entwickelten *Bcr-Abl*-RNAi-Protokolls auf leukämische Ph^+-Zellen. Die Behandlung mit Bcr-Abl-spezifischen siRNAs bewirkte sowohl bei den leukämischen Zelllinen MEG-01 und K562 als auch bei primären hämatopoetischen $CD34^+/Ph^+$-mononukleären Zellen (MNC) einen selektiven Abfall des Bcr-Abl-Proteins. In den leukämischen Zelllinien konnte zusätzlich zur effektiven Reduktion des Bcr-Abl-Proteinspiegels auch eine Beeinträchtigung des Wachstums der leukämischen Zellen beobachtet werden. Der erzielte Viabilitätsverlust lag hier etwa bei 60-70% im Vergleich zu den Kontrollen (vgl. Abb.6.29; Abb.6.31).

Auch das Ergebnis, dass mit Hilfe der *Bcr-Abl*-RNAi *Bcr-Abl*-positive Zellen gegenüber klinischen Therapeutika, wie z.B. Imatinib mesylate oder γ-Bestrahlung sensitiviert werden können, ist im Hinblick auf eine *in vivo* Anwendung dieser Technik interessant. Dieses Resultat zeigt, dass selbst bei einer suboptimalen Wirkung der RNAi *in vivo*, ein positiver therapeutischer Effekt erwartet werden kann. Eine entsprechende Feststellung konnte kürzlich auch von einer weiteren Arbeitsgruppe in TEL-PDGFβR-positiven Zellen gemacht werden (Chen *et al.*, 2004). Das chimäre Fusionsgen TEL-PDGFβR findet sich bei Patienten mit Chronisch Myelomonocytärer Leukämie (CMML). Durch TEL-PDGFβR-RNAi wurde eine Sensitivierung der behandelten Zellen gegenüber Imatinib und Rapamycin erreicht.

Für eine klinische Anwendung der RNAi-Technik müssen jedoch noch einige Schwierigkeiten überwunden werden. Vor allem muss gewährleistet sein, dass eine ausreichende Menge siRNA-Moleküle *in vivo* eine möglichst große Anzahl an Zielzellen erreicht. Dieses Transportproblem könnte etwa durch chemische Stabilisierung der siRNA-Moleküle gelöst werden. Für die in dieser Arbeit verwendeten gegen *Bcr-Abl* gerichteten siRNAs konnte gezeigt werden, dass es möglich ist diese durch verschiedene Modifikationen zu stabilisieren, ohne deren Effizienz zu beeinträchtigen (vgl. 7.3). Auch Modifikationen, die zu einer verbesserten Aufnahme der siRNAs in die Zielzellen führen, beispielsweise durch Anhängen von Cholesterinresten, sind denkbar. Einige Varianten derart modifizierter siRNA-Moleküle

werden derzeit gezielt auf ihre Wirkung hin überprüft, mit der Intention, funktionelle siRNAs dann auch im CML-Mausmodell zu evaluieren.

Auch wenn die effiziente Übertragung der siRNA in die Target-Zellen *in vivo* noch eine Herausforderung darstellt und noch einen großen Teil an Forschungsarbeit erfordern wird, zeigen die Resultate dieser Arbeit, dass die *Bcr-Abl*-RNAi allein oder in Kombination mit anderen Therapieansätzen von therapeutischem Wert sein kann.

8. Literaturverzeichnis

Ahuja H, Bar-Eli M, Advani SH, Benchimol S, Cline MJ. Alterations in the p53 gene and the clonal evolution of the blast crisis of chronic myelocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;86:6783-6787.

Amarzguioui M, Holen T, Babaie E, Prydz H. Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. Nucleic Acids Res. 2003;31:589-595.

Barnes DJ, Melo JV. Cytogenetic and molecular genetic aspects of chronic myeloid leukaemia.Acta Haematol. 2002;108(4):180-202.

Barnes DJ, Melo JV. Management of chronic myeloid leukemia: targets for molecular therapy. Semin Hematol. 2003;40:34-49.

Barthe C, Cony-Makhoul P, Melo JV, Mahon JR. Roots of clinical resistance to STI-571 cancer therapy.Science. 2001;293:2163.

Barthe C, Gharbi MJ, Lagarde V, Chollet C, Cony-Makhoul P, Reiffers J, Goldman JM, Melo JV, Mahon FX. Mutation in the ATP-binding site of BCR-ABL in a patient with chronic myeloid leukaemia with increasing resistance to STI571. Br J Haematol. 2002;119:109-11.

Bartram CR, de Klein A, Hagemeijer A, van Agthoven T, Geurts van Kessel A, Bootsma D, Grosveld G, Ferguson-Smith MA, Davies T, Stone M *et al.* Translocation of c-ab1 oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. Nature. 1983;306:277-280.

Berman E, Jhanwar S, McBride M, Strife A, Wisniewski D, Lambek C, Clarkson B. Characterization of two novel sublines established from a human megakaryoblastic leukemia cell line transfected with p210(BCR-ABL). Leuk Res. 2000;24:289-297.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248-254.

Branford S, Walsh S, Rudzki Z *et al.* Imatinib produces significantly superior molecular responses compared to interferon plus low-dose Ara-C in patients with newly diagnosed chronic myelogenous leukemia [abstract]. Blood. 2001;100:96a.

Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Grigg A, Arthur C, Taylor K, Herrmann R, Lynch KP, Hughes TP. High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukaemia or Ph-positive acute

lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571)resistance. Blood. 2002;99:3472-3475.

Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Parkinson I, Grigg A, Szer J, Taylor K, Herrmann R, Seymour JF, Arthur C, Joske D, Lynch K, Hughes T. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. Blood. 2003;102:276-283.

Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. Science. 2002;296:550-553.

Caplen NJ, Parrish S, Imani F, Fire A, Morgan RA. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98:9742-9747.

Chen J, Wall NR, Kocher K, Duclos N, Fabbro D, Neuberg D, Griffin JD, Shi Y, Gilliland DG. Stable expression of small interfering RNA sensitizes TEL-PDGFbetaR to inhibition with imatinib or rapamycin. J Clin Invest. 2004;113:1784-91.

Chiu Y, Rana TM. RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA. Mol Cell. 2002;10:549-561.

Chiu Y, Rana TM. siRNA function in RNAi: A chemical modification analysis. RNA. 2003;9:1034-1048.

Corbin AS, La Rosee P, Stoffregen EP, Druker BJ, Deininger MW. Several Bcr-Abl kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib. Blood. 2003;101:4611-4614.

Cowan-Jacob SW, Guez V, Fendrich G, Griffin JD, Fabbro D, Furet P, Liebetanz J, Mestan J, Manley PW. Imatinib (STI571) resistance in chronic myelogenous leukemia: molecular basis of the underlying mechanisms and potential strategies for treatment. Mini Rev Med Chem. 2004;4:285-299.

Cortes J, Kantarjian HM. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review with emphasis on biology and therapy. Cancer. 1995;76:2393-2417.

Cortez D, Reuther G, Pendergast AM. the Bcr-Abl tyrosine kinase activates mitogenic signaling pathways and stimulates G1-to-S phase transition in hematopoietic cells. Oncogene. 1997;15:2333-2342.

Cummins LL, Owens SR, Risen LM, Lesnik EA, Freier SM, McGee D, Guinosso CJ, Cook PD. Characterization of fully 2'-modified oligoribonucleotide hetero- and homoduplex hybridization and nuclease sensitivity. Nucleic Acids Res. 1995;23:2019-2024.

Daley GQ, Baltimore D. Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210bcr/abl protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988;85:9312-9316.

Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. Science. 1990;247:824-830.

Damm-Welk C, Fuchs U, Wössmann W, Borkhardt A. Targeting oncogenic fusion genes in leukemias and lymphomas by RNA interference. Semin Cancer Biol. 2003;13:283-292.

Danial NN, Rothman PB. JAK-STAT signaling activated by Abl oncogenes. Oncogene. 2000;19:2523-2531.

Doench JG, Petersen CP, Sharp PA. siRNAs can function as miRNAs. Genes Dev. 2003;17:438-442.

Drexler HG, MacLeod RAF, Uphoff CC. Leukemia cell lines: in vitro models for the study of Philadelphia chromosome-positive leukemia. Leukemia Res. 1999;23:207-215.

(A) Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. N Engl J Med. 2001;344:1031-1037.

(B) Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, Capdeville R, Talpaz M. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. N Engl J Med. 2001 Apr 5;344(14):1038-42.

Duxbury MS, Whang EE. RNA interference: a practical approach. J Surg Res. 2004;117:339-344.

(A) Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. Genes Dev. 2001;15:188-200.

(B) Elbashir SM, Martinez j, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. EMBO J. 2001;20:6877-6888.

(C) Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature. 2001;411:494-498.

Faderl S, Jeha S, Kantarjian HM. The biology and therapy of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. Cancer. 2003;98:1337-1354.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature. 1998;391:806-811.

Gambacorti-Passerini C, le Coutre P, Zucchetti M, D'Incalci M. Binding of imatinib by α1-acid glycoprotein. Blood. 2002;100:367-368.

Gambacorti-Passerini CB, Gunby RH, Piazza R, Galietta A, Rostagno R, Scapozza L. Molecular mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia-chromosome-positive leukaemias. Lancet Oncol. 2003;4:75-85.

Gesbert F, Sellers WR, Signoretti S, Loda M, Griffin JD. BCR/ABL regulates Expression of the cyclin-dependent Kinase Inhibitor p27Kip1 through the Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT Pathway. J Biol Chem. 2000;275:39223-39230.

Gil J, Esteban M. Induction of apoptosis by the dsRNA dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. Apoptosis. 2000;5:107-114.

Goekbuget N, Arnold R, Buechner T *et al.* Intensification of induction and consolidation improves only subgroups of adult ALL: analysis of 1200 patients in GMALL study 05/93 [abstract]. Blood. 2001;98:802a.

Goldman JM. Chronic myeloid leukemia-still a few questions. Exp Hematol. 2004;32:2-10.

Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, Sawyers CL. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. Science. 2001;293:876-880.

Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Taylor M, Thun M. Cancer statistics, 2001. CA Cancer J Clin. 2001;51:15-36.

Griesshammer M, Heinze B, Bangerter M, Heimpel H, Gliedner TM. Karyotype abnomalities and their clinical significance in blast crisis of chronic myeloid leukemia. J Mol Med. 1997;75;836-839.

Groffen J, Sephenson HR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. Cell. 1984;36:93-99.

Hallek M, Danhauser-Riedl S, Herbst R, Warmuth M, Winkler A, Kolb HJ, Druker B, Griffin JD, Emmerich B, Ullrich A. Interaction of the receptor tyrosine kinase p145c-kit with the p210bcr/abl kinase in myeloid cells. Br J Haematol. 1996;94:5-16.

Hamada M, Ohtsuka T, Kawaida R, Koizumi M, Morita K, Furukawa H, Imanishi T, Miyagishi M, Taira K. Effects on RNA interference in gene expression (RNAi) in cultured

mammalian cells of mismatches and the introduction of chemical modifications at the 3'-ends of siRNAs. Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 2002;12:301-309.

Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. J Immunol Methods. 1989;119:203-210.

Heidenreich O, Krauter J, Riehle H, Hadwiger P, John M, Heil G, Vornlocher HP, Nordheim A. AML1/MTG8 oncogene suppression by small interfering RNAs supports myeloid differentiation of t(8;21)-positive leukemic cells. Blood. 2003;101:3157-3163.

Heisterkamp N, Stephenson JR, Groffen J, Hansen PF, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G. Localization of the c-ab1 oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia.Nature. 1983;306:239-242.

Heisterkamp N, Jenster G, ten Hoeve J, Zovich D, Pattengale PK, Groffen J. Acute leukaemia in BCR/ABL transgenic mice. Nature. 1990;344:251-253.

Hochhaus A, Kreil S, Corbin A, La Rosee P, Lahaye T, Berger U, Cross NC, Linkesch W, Druker BJ, Hehlmann R, Gambacorti- Passerini C, Corneo G, D'Incalci M. Roots of clinical resistance to STI-571 cancer therapy. Science. 2001;293:2163.

Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, La Rosee P, Muller MC, Lahaye T, Hanfstein B, Schoch C, Cross NC, Berger U, Gschaidmeier H, Druker BJ, Hehlmann R. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. Leukemia. 2002;16:2190-2196.

Hochhaus A. Cytogenetic and molecular mechanisms of resistance to imatinib. Semin Hematol. 2003;40 Suppl 2:69-79.

Honda H, Oda H, Suzuki T, Takahashi T, Witte ON, Ozawa K, Ishikawa T, Yazaki Y, Hirai H. Development of acute lymphoblastic leukemia and myeloproliferative disorder in transgenic mice expressing p210bcr/abl: a novel transgenic model for human Ph1-positive leukemias. Blood. 1998;91:2067-2075.

Hughes T, Kaeda J, Branford S *et al.* Molecular responses to imatinib (STI571) or interferon + Ara-C as initial theraby for CML: results in the IRIS study [abstract]. Blood. 2002;100:93a

Illmer T, Schaich M, Platzbecker U, Freiberg-Richter J, Oelschlagel U, von Bonin M, Pursche S, Bergemann T, Ehninger G, Schleyer E. P-glycoprotein-mediated drug efflux is a resistance mechanism of chronic myelogenous leukemia cells to treatment with imatinib mesylate. Leukemia. 2004;18:401-408.

Jorgensen HG, Elliott MA, Allan EK, Carr CE, Holyoake TL, Smith KD. Alpha1-acid glycoprotein expressed in the plasma of chronic myeloid leukemia patients does not mediate significant in vitro resistance to STI571. Blood. 2002;99:713-715.

Jonuleit T, van der Kuip H, Miething C, Michels H, Hallek M, Duyster J, Aulitzky WE. Bcr-Abl kinase down-regulates cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in human and murine cell lines. Blood. 2000;96:1933-1939.

Kalidas M, Kantarjian H, Talpaz M. Chronic myelogenous leukemia. JAMA. 2001;286:895-898.

Kantarjian HM, Sawyers C, Hochhaus A *et al.* Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. N Engl J Med. 2002;346:645-652.

Kantarjian HM, Cortes J, O'Brien S, Giles FJ, Albitar M, Rios MB, Shan J, Faderl S, Garcia-Manero G, Thomas DA, Resta D, Talpaz M. Imatinib mesylate(STI571) therapy for Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in blast phase. Blood. 2002;99:3547-3553.

Kantarjian H, Talpaz M, O'Brien S, Garcia-Manero G, Verstovsek S, Giles F, Rios MB, Shan J, Letvak L, Thomas D, Faderl S, Ferrajoli A, Cortes J. High-dose imatinib mesylate therapy in newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic phase chronic myeloid leukemia. Blood. 2004;103:2873-1878.

Kelliher MA, McLaughlin J, Witte ON, Rosenberg N. Induction of a chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with v-abl and BCR/ABL. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990;87:6649-6653.

Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. Cell. 2003;115:209-216.

Konopka JB, Witte ON. Detection of c-abl tyrosine kinase activity in vitro permits direct comparison of normal and altered abl gene products. Mol Cell Biol. 1985;5:3116-3123.

Kipreos ET, Wang JY: Cell cycle-regulated binding of c-Abl tyrosine kinase to DNA. Science. 1992;256:382-285.

Kretschmer-Kazemi Far R, Sczakiel G. The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides. Nucl Acids Res. 2003;31:4417-4424.

Kreil S, Müller MC, Lahaye T, *et al.* Molecular and chromosomal mechanisms of resistance in CML patients after STI571 (Glivec) therapy. Blood. 2001;98(Suppl1):435a.

Kreuzer KA, Le Coutre P, Landt O, Na IK, Schwarz M, Schultheis K, Hochhaus A, Dorken B. Preexistence and evolution of imatinib mesylate-resistant clones in chronic myelogenous leukemia detected by a PNA-based PCR clamping technique. Ann Hematol. 2003;82:284-289.

Kronenwett R, Haas R, Sczakiel G. Kinetic selectivity of complementary nucleic acids: bcr-abl-directed antisense RNA and ribozymes. J Mol Biol. 1996;259:632-644.

Kurreck J. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. Eur J Biochem. 2003;270:1628-1644.

Kurzrock R, Kantarjian H, Druker BJ, Talpaz M. Philadelphia Chromosome-positive Leukemias: From basic mechanisms to molecular therapeutics. Ann Intern Med. 2003;138:819-831.

Laurent E, Talpaz M, Kantarjian H, Kurzrock R. The BCR gene and philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. Cancer Res. 2001;61:2343-2355.

le Coutre P, Tassi E, Varella-Garcia M, Barni R, Mologni L, Cabrita G, Marchesi E, Supino R, Gambacorti-Passerini C. Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification. Blood. 2000;95:1758-1766.

le Coutre P, Kreuzer KA, Il-Kang N. Blood Cell Mol dis. 2002;28:75-85.

Lewin AA. A review of issues in the pharmacokinetics and toxicology of phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides. Biochim Biophys Acta. 1999;1489:69-84.

Lewis DL, Hagstrom JE, Loomis AG, Wolff JA, Herweijer H. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. Nat Genet. 2002;418:38-39.

Lewis JM, Schwartz MA. Integrins regulate the association and phosphorylation of paxillin by c-Abl. J Biol Chem. 1998;273:14225-14230.

Li MJ, McMahon R, Snyder DS, Yee JK, Rossi JJ. Specific killing of Ph+ chronic myeloid leukemia cells by a lentiviral vector-delivered anti-bcr/abl small hairpin RNA. Oligonucleotides. 2003;13:401-409.

Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. Science. 1990;247:1079-1082.

McCaffrey AP, Nakai H, Pandey K, Huang Z, Salazar FH, Xu H, Wieland SF, Marion PL, Kay MA. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. Nat Biotechnol. 2003;21:639-644.

Melo JV. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. Blood. 1996;88:2375-2384.

Melo JV. BCR-ABL gene variants. Baillieres Clin Haematol. 1997;10:203-222.

McManus MT, Sharp PA. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. Nat Rev Genet. 2002;3:737-747.

Mittal V. Improving the efficiency of RNA interference in mammals. Nat Rev Genet. 2004;5:355-365.

Montgomery MK, Fire A. Double-stranded RNA as a mediator in sequence-specific genetic silencing and co-suppression. Trends Genet. 1998;14:255-258.

Morgenstern JP, Land H. Advanced mammalian gene transfer. High titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. Nucl Acids Res. 1990;18:3587-3586.

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

Muller AJ, Young JC, Pendergast AM, Pondel M, Landau NR, Littman DR, Witte ON. BCR first exon sequences specifically activate the BCR/ABL tyrosine kinase oncogene of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. Mol Cell Biol. 1991;11:1785-1792.

Nagar B, Bornmann WG, Pellicena P, Schindler T, Veach DR, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). Cancer Res. 2002;62:4236-4243.

Narry Kim V. RNA Interference in functional genomics and medicine. J Korean Med Sci. 2003;18:309-18.

Nelson P, Kiriakidou M, Sharma A, Maniataki E, Mourelatos Z. The microRNA world: small is mighty. Trends in Biochemical Sciences. 2003;28:534-540.

Nieborowska-Skorska M, Wasik MA, Slupianek A, Salomoni P, Kitamura T, Calabretta B, Skorski T. Signal transducer and activator of transcription (STAT)5 activation by BCR/ABL is dependent on intact Src homology (SH)3 and SH2 domains of BCR/ABL and is required for leukemogenesis. J Exp Med. 1999;189:1229-1242.

Nishimura J, Okamura J, Shibata K, Takahira H, Yufu Y, Kato S, Hirata J, Umemura T, Nawata H. Two bcr/abl fusion gene products, P210bcr/abl and P190bcr/abl, are equally sensitive to the protein tyrosine phosphatase of mature granulocytes. Int J Hematol. 1991;54:471-478.

Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. Science. 1960;132 :1497-1499.

O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F *et al.* Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. New Eng J Med. 2003;348:994-1004.

Pane F, Frigeri F, Sindona M, Luciano L, Ferrara F, Cimino R, Meloni G, Saglio G, Salvatore F, Rotoli B. Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). Blood. 1996;88:2410-2414.

Pasternak G, Hochhaus A, Schulheis B, Hehlmann R. Chronic myelogenous leukemia: molecular and cellular aspects. J Cancer Res Clin Oncol. 1998;124:643-660.

Pear WS, Miller JP, Xu L, Pui JC, Soffer B, Quackenbush RC, Pendergast AM, Bronson R, Aster JC, Scott ML, Baltimore D. Efficient and rapid induction of a chronic myelogenous leukemia-like myeloproliferative disease in mice receiving P210 bcr/abl-transduced bone marrow. Blood. 1998;92:3780-92.

Pendergast AM, Gishizky ML, Havlik MH, Witte ON. SH1 domain autophosphoylation of p210 BCR/ABL is required for transformation but not growth factor independence. Mol. Cell. Biol. 1993;13:1728-1736.

Poole TW, Silvers WK. Capacity of adult steel (SI/SId) and dominant spotting (W/Wv) mouse skin to support melanogenesis. Dev Biol. 1979;72:398-400.

Ravandi F, Cortes J, Albitar M, Arlinghaus R, Qiang Guo J, Talpaz M, Kantarjian HM. Chronic myelogenous leukaemia with p185(BCR/ABL) expression: characteristics and clinical significance. Br J Haematol. 1999;107:581-586.

Ritter U, Damm-Welk C, Fuchs U, Bohle RM, Borkhardt A, Woessmann W. Design and evaluation of chemically synthesized siRNA targeting the NPM-ALK fusion site in anaplastic large cell lymphoma. Oligonucleotides. 2003;13:365-73.

Roche-Lestienne C, Soenen-Cornu V, Grardel-Duflos N, Lai JL, Philippe N, Facon T, Fenaux P, Preudhomme C. Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment. Blood. 2002;100:1014-1018.

Rothberg PG. Imatinib: resisting the resistance. Leukemia Res. 2003;27:977-978.

Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. Nature. 1973;243:290-293.

Salloukh HF, Vowles I, Heisterkamp N, Groffen J, Laneuville P. Early events in leukemogenesis in p190Bcr-Abl transgenic mice. Oncogene. 2000;19:4362-4374.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998, Cold Spring Harbor, NY.

Sawyers CL, McLaughlin J, Goga A, Havlik M, Witte O. The nuclear tyrosine kinase c-ABl negatively regulates cell growth. Cell. 1994;77:121-131.

Sawyers CL, McLaughlin J, Witte O. Genetic requirement for Ras in the transfromation of fibroblasts and hematopoietic cells by the *Bcr-Abl* oncogene. J Exp Med. 1995;181:307-313.

Sawyers CL. Chronic myeloid leukemia. N Engl J Med. 1999;340:1330-1340.

Sawyers CL, Hochhaus A, Feldman E. Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. Blood. 2002;99:3530-3539.

Scherr M, Blattmer K, Winkler T, Heidenreich O, Ganser A, Eder M. Specific inhibition of bcr-abl gene expression by small interfering RNA. Blood. 2003;101:1566-1569.

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

Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. Science. 2000;289:1938-1942.

Schwarz DS, Hutvágner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi Enzyme complex. Cell. 2003;115:199-208.

Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, Gorre ME, Paquette RL, Kuriyan J, Sawyers CL. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. Cancer Cell. 2002;2:117-125.

Shepherd P, Suffolk R, Halsey J, Allan N. Analysis of molecular breakpoint and m-RNA transcripts in a prospective randomized trial of interferon in chronic myeloid leukaemia: No correlation with clinical features, cytogenetic response, duration of chronic phase, or survival. Br J Haematol. 1995;89:546-544.

Shuai K, Halpern J, ten Hoeve J, Rao X, Sawyers CL. Constitutive activation of STAT5 by the BCR-ABL ocogene in chronic myelogenous leukemia. Oncogene. 1996;13:247-254.

Sirard C, Laneuville P, Dick JE. Expression of bcr-abl abrogates factor-dependent growth of human hematopoietic M07E cells by an autocrine mechanism. Blood. 1994;83:1575-1585.

Skorski T, Nieborowska-Skorska M, Nicolaides NC, Szczylik C, Iversen P, Iozzo RV, Zon G, Calabretta B. Suppression of Philadelphia1 leukemia cell growth in mice by BCR-ABL antisense oligodeoxynucleotide.Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91:4504-4508.

Skorski T, Kanakaraj P, Nieborowska-Skorska M, Ratajczak MZ, Wen SC, Zon G, Gewirtz AM, Perussia B, Calabretta B. Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. Blood. 1995;86:726-736.

Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, Lieberman J. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. Nat Med. 2003;9:347-351.

Spiller DG, Giles RV, Broughton CM, Grzybowski J, Ruddell CJ, Tidd DM, Clark RE. The

influence of target protein half-life on the effectiveness of antisense oligonucleotide analog-mediated biologic responses.Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 1998;8:281-293.

Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. Annu Rev Biochem. 1998;67:227-264.

Tabara H, Sarkissian M, Kelly WG, Fleenor J, Grishok A, Timmons L, Fire A, Mello CC. The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in C. elegans. Cell. 1999;99:123-132.

Talpaz M, Silver RT, Druker BJ, Goldman JM, Gambacorti-Passerini C, Guilhot F, Schiffer CA, Fischer T, Deininger MW *et al.* Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. Blood. 2002;99:1928-1937.

Vaerman JL, Lammineur C, Moureau P, Lewalle P, Deldime F, Blumenfeld M, Martiat P. BCR-ABL antisense oligodeoxyribonucleotides suppress the growth of leukemic and normal hematopoietic cells by a sequence-specific but nonantisense mechanism. Blood. 1995;86:3891-6.

van Etten RA. Cycling, stressed-out and nervous: Cellular functions of c-Abl. Trends Cell Biol. 1999;9:179-186.

Varticovski L, Daley G, Jackson P, Baltimore D, Cantley L. Activation of PI 3-kinase in cells expressing abl oncogene variants. Mol Cel Biol. 1991;11:1107-1113.

von Bubnoff N, Schneller F, Peschel C, Duyster J. BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia-chromosome-positive leukaemia to STI571: a prospective study.Lancet. 2002;359:487-491.

Waterhouse PM, Wang MB, Lough T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. Nature. 2001;411:834-842.

Westbrook CA, Hooberman AL, Spino C, Dodge RK, Larson RA, Davey F, Wurster-Hill DH, Sobol RE, Schiffer C, Bloomfield CD. Clinical significance of the BCR-ABL fusion gene in adult acute lymphoblastic leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study (8762). Blood. 1992;80:2983-2990.

Wilda M, Fuchs U, Wössmann W, Borkhardt A. Killing leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi). Oncogene. 2002;21:5716-5724.

Wilson JA, Richardson CD. Induction of RNA interference using short interfering RNA expression vectors in cell culture and animal systems. Curr Opin in molecular Therapeutics. 2003;5:389-396.

Wong S, Witte ON. The BCR-ABL story: bench to bedside and back. Annu Rev Immunol. 2004;22:247-306.

Yang S, Tutton S, Pierce E, Yoon K. Specific double-stranded RNA interference in undifferentiated mouse embryonic stem cells. Mol Cell Biol. 2001;21:7801.

Yuan B, Latek R, Hossbach M, Tuschl T, Lewitter F. siRNA selection server: an automated siRNA ologonucleotide prediction server. Nucl Acids Res. 2004;32:Web server issue.

9. Eigene Veröffentlichungen

Wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Wohlbold L, van der Kuip H, Miething C, Vornlocher HP, Knabbe C, Duyster J, Aulitzky WE. Inhibition of *bcr-abl* gene expression by small interfering RNA sensitizes for imatinib mesylate (STI571). Blood. 2003;102:2236-2239.

Weitere Originalarbeiten und Abstracts:

van der Kuip H, Moehring A, Wohlbold L, Miething C, Duyster J, Aulitzky WE. Imatinib mesylate (STI571) prevents the mutator phenotype of Bcr-Abl in hematopoietic cell lines. Leuk Res. 2004;28:405-408.

van der Kuip H, Wohlbold L, Miething C, Duyster J, Aulitzky WE. STI571 decreases the mutation frequencies in cells expressing the active Bcr-Abl tyrosine kinase. Onkologie 2002, Vol25; Suppl.4, Abstract Nr.121:35.

Wohlbold L, van der Kuip H, Miething C, Vornlocher HP, Duyster J, Aulitzky WE. Inhibition of *bcr-abl* gene expression by RNA interference antagonizes resistance to imatinib mesylate (STI571). Onkologie 2003, Vol26; Suppl.5, Abstract Nr.P656:113-114.

Moehring A, van der Kuip H, Wohlbold L, Duyster J, Aulitzky WE. Inhibition of Bcr-Abl kinase activity with Imatinib induces poly(ADP)ribosylation in Bcr-Abl positive hematopoietic cells. Blood, Volume 102, issue 11; 2003, 45thASH annual meeting.

Moehring A, van der Kuip H, Wohlbold L, Aulitzky WE. Bcr-Abl kinase promotes cell survival partially by preventing poly(ADP)ribosylation. Proceedings of the AACR, Vol.45; 2004. Abstract Nr. 103.

10. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Walter E. Aulitzky danke ich für die Überlassung des Themas. Die stets gewährte Unterstützung und sein beständiges Interesse am Fortgang der Arbeit haben maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Peter Scheurich danke ich für seine Bereitschaft die Arbeit von Seiten der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart zu betreuen.

Herrn Prof. Dr. Michel Eichelbaum danke für die Möglichkeit diese Arbeit an seinem Institut anfertigen zu können.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Heiko van der Kuip für seine ausgezeichnete Zusammenarbeit. Seine unermüdliche Hilfs- und Diskussionsbereitschaft haben wesentlich zum Erfolg der vorliegenden Arbeit beigetragen.

Herrn Dr. Hans-Peter Vornlocher von der Anlylam Europe AG danke ich für seine hilfreichen Anregungen und Ratschläge.

Herrn Prof. Dr. Moshe Oren, dem Leiter des ‚Department of Molecular Cell Biology' am Weizmann Institute of Science (Rehovot, Israel), danke ich für die großartige Möglichkeit des Forschungsaufenthaltes in Israel und seine Bereitschaft diese Arbeit mit zu betreuen.

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre möchte ich mich bei den Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Klinische Pharmakologie bedanken. Besonders erwähnen möchte ich Frau Alexandra Möhring, Frau Kerstin Gawronski, Frau Dr. Elke Kleideiter, Frau Fabienne Fiesel und Frau Maike Sonnenberg.

Der Robert Bosch Stiftung danke ich für die finanzielle Unterstützung während der Durchführung dieser Dissertation und des Forschungsaufenthaltes in Israel.

11. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Lara Wohlbold
Anschrift:	Obere Waiblingerstr. 117
	70374 Stuttgart-Bad Cannstatt
Geburtsdatum:	22.10.1975

Schulbildung:

1982-1986	Schelling-Grundschule, Leonberg
1986-1995	Albert-Schweitzer-Gymnasium, Leonberg

Studium:

10/1995-05/2001	Diplom-Biologie an der Universität Hohenheim Studienschwerpunkte: Pflanzenphysiologie, Botanik, Biophysik, Virologie.
12/2000	Diplomarbeit am Institut für Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen, Universität Hohenheim bei Prof. Dr. D. Heß/Prof. Dr. E. Kuhn. Titel der Diplomarbeit: ‚Untersuchung des Einflusses von Startcodon flankierenden Sequenzen auf die Expressionsstärke eines chimären *uidA*-Gens in *Nicotiana tabacum*‘
05/2001	Abschluss als Diplom-Biologin mit Auszeichnung (Gesamtnote ‚Sehr gut‘).

Promotion:

09/2001-11/2004	Dissertation am Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie (Unterstützung der Dissertation durch ein Stipendium der Robert Bosch Stiftung).

Betreuung der Dissertation durch Prof. Dr. W.E. Aulitzky, Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart und Prof. Dr. M. Oren, Weizmann Institut, Rehovot, Israel.
Titel der Dissertation: ‚Expressionshemmung des humanen Onkogens *Bcr-Abl* durch RNA-Interferenz‘.

Auslandsaufenthalte:

05/1998-10/1998	Ausland-Praxissemester: Volontariat am ‘Department of Environment and Natural Resources’, Australien.
08/1999-09/1999	Praktikum an der ‚Agricultural University of Athens’, Griechenland.
11/2003-02/2004	Forschungsaufenthalt am ‚Department of Molecular Cell Biology‘, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel.

Stuttgart, den 1. Oktober 2004