

Aus der Klinik für Innere Medizin I,
Universitätsklinikum des Saarlandes,
Homburg/Saar

**Expressionsbestimmungen des Novel INHAT Repressors NIR
und des p63-Gens
mit Protokolletablierung zum NIR-Knockdown
in AML-Zelllinien**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2026

vorgelegt von: Eva Carbonero Happel
geb. am: 18.09.1997 in Bad Kissingen

Tag der Promotion: 05.05.2026
Dekan: Univ.-Prof. Dr. Matthias Hannig
Berichterstatter: PD Dr. Kristina Heyne
Prof. Dr. Dr. Philipp Staber

Meinen Eltern und meinem Bruder gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Akute Myeloische Leukämie AML	1
1.2	P63	3
1.3	Der Novel INHAT Repressor NIR	3
1.4	NIR bei Karzinomen.....	6
1.5	Auswirkungen eines NIR-Knockdowns.....	6
1.6	NIR bei der AML.....	6
1.7	Besonderheiten von Labormethoden.....	7
2	Zielsetzung	9
3	Material und Methodik.....	10
3.1	Material	10
3.1.1	Puffer und Lösungen.....	10
3.1.2	Chemikalien	11
3.1.3	Geräte, Materialien und Programme	12
3.1.4	Zellkultur.....	13
3.1.5	siRNA-Transfektion	14
3.1.6	Antisense LNA™ GapmeRs.....	14
3.1.7	Primäre Antikörper.....	15
3.1.8	Sekundäre Antikörper	15
3.1.9	Kits	15
3.1.10	Marker	15
3.1.11	Primer.....	15
3.2	Methodik.....	16
3.2.1	Zellkultur.....	16
3.2.2	Bestimmung der Wachstumskurven der Zellen	16
3.2.3	Pelletieren der Zellen	17
3.2.4	Gewinnung der Gesamtzellextrakte.....	17
3.2.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	18
3.2.6	Western Blot	19
3.2.7	Immunologischer Proteinnachweis	20
3.2.8	Transfektion mittels siRNA	20
3.2.9	Elektroporation	21
3.2.10	Gymnosis durch LNA-GapmeRs.....	21
3.2.11	Durchflusszytometrie (FACS).....	23
3.2.12	Fluoreszenzmikroskopie.....	24
3.2.13	RNA-Extraktion	24

3.2.14	Umschreiben in cDNA.....	25
3.2.15	Quantitative Real-time-PCR.....	26
3.2.16	Auswertung der RT-PCR-Daten und -Produkte.....	27
3.2.17	Mykoplasmen-PCR	29
3.2.18	Auftragen Produkte Agarosegel	30
4	Ergebnisse.....	32
4.1	Charakterisierung der Zellen	32
4.2	Genexpression	35
4.2.1	Genexpression auf Proteinebene.....	35
4.2.2	Genexpression auf Transkriptebene.....	36
4.3	Transfektionsexperimente	42
4.3.1	Ermittlung der Transfektionseffizienzen von fluoreszenzgekoppelter siRNA in AML-Zelllinien nach Lipofektion	43
4.3.2	NIR-Knockdown in AML-Zelllinien nach Lipofektion	46
4.3.3	Ermittlung der Transfektionseffizienz fluoreszenzgekoppelter siRNA in AML-Zellen mittels Elektroporation.....	46
4.4	Gymnosis mittels GapmeRs.....	48
4.4.1	Ermittlung der Effizienz der Aufnahme von LNA-GapmeRs mittels Gymnosis durch FACS-Analysen	50
4.4.2	Analyse der LNA-GapmeR-behandelten AML-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	52
4.4.3	Analyse der NIR-LNA-GapmeRs-behandelten AML-Zelllinien.....	54
5	Diskussion	65
5.1	Zusammenfassung der Hauptergebnisse	65
5.2	Diskussion der Methoden und Protokoll-Etablierung	65
5.2.1	Expressionsnachweis auf Protein- und Transkriptebene	65
5.2.2	Transfektionsexperimente	65
5.2.3	Protokoll-Etablierung der Gymnosis mittels GapmeRs.....	66
5.3	Diskussion der Ergebnisse	67
5.3.1	Genexpression auf Proteinebene.....	67
5.3.2	Genexpression auf Transkriptebene.....	69
5.3.3	Knockdownexperimente	71
5.3.4	Gesamtausblick.....	71
6	Zusammenfassung.....	72
7	Summary.....	73
8	Literaturverzeichnis	74
9	Danksagung	78
10	Lebenslauf	79
11	Abkürzungen.....	80

1 Einleitung

1.1 Die Akute Myeloische Leukämie AML

Die Akute Myeloische Leukämie ist die häufigste akute Leukämie des Erwachsenen [43]. Unbehandelt führt die Erkrankung in kurzer Zeit zum Tod [43]. Die Inzidenz der Erkrankung beträgt etwa 3,7/100.000 Einwohner pro Jahr, sie steigt mit dem Alter jedoch auf bis zu 100/100.000 Einwohner bei über 70-Jährigen an [43]. Bei unter 30-jährigen Patienten liegen die 5-Jahres-Überlebensraten bei etwa 60 %, während sie bei 55 - 64-Jährigen nur noch bei etwa 23 % liegen und im höheren Alter noch weiter abnehmen [43].

Bei der Erkrankung sind die hämatopoetischen Vorläuferzellen der myeloischen Zellreihen, sprich Zellen der Granulozytopoese, Monozytopoese, seltener der Erythrozytopoese oder Megakaryopoese, molekulargenetisch verändert [19]. Die Proliferation der leukämischen Zellklone schränkt die physiologische Hämatopoese ein, sie verdrängen das gesunde Knochenmark [19] [43]. Unreife Zellen ohne Differenzierungszeichen werden als Blasten bezeichnet [19]. In der Regel gilt ein Blastenanteil von mindestens 20 % im Knochenmark als Diagnosekriterium einer AML, Ausnahmen hiervon bilden bestimmte Translokationen, wie u. a. t(15;17) [19]. Der Mangel an ausdifferenzierten Zellen führt zu einer hämatopoetischen Insuffizienz. Klinische Symptome können unter anderem eine erhöhte Infektneigung, Zeichen der Anämie oder die disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) sein [19] [43].

Eine Einteilung der AML erfolgt anhand zytomorphologischer Kriterien mithilfe der FAB-Klassifikation. Diese wird zwar noch verwendet, sie wird jedoch zunehmend von der neueren WHO-Klassifikation abgelöst, die zusätzlich genetische und immunologische Gesichtspunkte einbezieht. Im Folgenden eine Übersicht über beide Klassifikationen.

FAB-Einteilung		Häufigkeit
M0	Akute undifferenzierte Leukämie	< 2 %
M1	AML ohne Ausreifung	15 - 20%
M2	AML mit Ausreifung	20 - 30%
M2baso	AML mit Ausreifung mit Basophilie	Selten
M3	Akute Promyelozytenleukämie (APL)	10 %
M3v	Mikrogranulozytäre APL	Selten
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie	30 - 40 %
M4Eo	Akute myelomonozytäre Leukämie mit Eosinophilie	Selten
M5	Akute Monoblastenleukämie	5 - 10 %
M6	Akute Erythroleukämie	Selten
M7	Akute Megakaryoblastenleukämie	Selten

Abb. 1.1: Einteilung der AML nach FAB-Klassifikation [36].

AML mit genetischen Aberrationen	AML mit multilinearer Dysplasie
<ul style="list-style-type: none"> - AML mit t(8;21)(q22;q22), (AML-1/ETO) - AML mit abnormen Knochenmark-Eosinophilen und inv(16)(p13q22) oder t(16;16)(p13;q22), (CBFβ/MYH11) - Akute Promyelozyten-Leukämie mit t(15;17)(q22;q12), PML/RARα und Varianten - AML mit 11q23 (MLL)-Anomalien 	<ul style="list-style-type: none"> - Mit vorausgegangenem MDS - Ohne vorausgegangenem MDS, aber mit Dysplasie in mindestens 50% der Zellen in 2 oder mehr Zellreihen
Therapiebedingte AML/MDS	Nicht anderweitig klassifizierbare AML
<ul style="list-style-type: none"> - Nach Alkylanzien-/ Strahlentherapie - Nach Topoisomerase-II-Inhibitoren - Andere Auslöser 	<ul style="list-style-type: none"> - AML mit/ohne Ausreifung - Akute myelomonozytäre Leukämie - Akute monoblastische/monozytäre Leukämie - Akute erythrozytäre Leukämie - Akute Megakaryoblastenleukämie - Akute basophile Leukämie - Akute Panmyelose mit Myelofibrose - Myeloisches Sarkom

Abb. 1.2: Einteilung der AML nach WHO-Klassifikation [49].

Durch die vielen verschiedenen bekannten Mutationen und Translokationen ist die AML eine sehr heterogene Erkrankung.

Bei AML-Erstdiagnose ist im Gegensatz zu vielen anderen Krebsarten der Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressor p53 nur selten, in ca. 8 % der Fälle, mutiert [3] [19]. Dies schließt jedoch nicht aus, dass der p53-Signalweg beteiligt sein kann. Beispielsweise liegt bei einer AML mit komplexem Karyotyp (≥ 3 Anomalien) in 70 - 80 % der Fälle eine p53-Mutation vor [3].

1.2 P63

p63 wurde erstmals 1998 als mit p53 verwandtes Gen beschrieben [55]. Aufgrund großer Sequenzähnlichkeit und Transaktivierung p53-interagierender Gene, bildet p63 zusammen mit p53 und p73 einen Teil der p53-Familie der Transkriptionsfaktoren [16] [55]. Die Transaktivierung p53-abhängiger Gene durch p63 und p73 führt zum Zellzyklusstillstand und zur Apoptose [14] [16] [55].

Es existieren transaktivierende TAp63-Isoformen und Δ Np63-Isoformen ohne N-terminale Transaktivierungsdomäne [16] [55]. Für die p53-ähnliche Wirkung des Zellzyklusstillstandes und für die Apoptose sind hauptsächlich TAp63-Isoformen verantwortlich [14] [16] [55]. Im Gegensatz dazu können Δ Np63-Isoformen bestimmte Gene aktivieren, die von TA-Isoformen nicht aktiviert werden [6] [52]. So können sie auch die Aktivität von p53, p73 und p63 hemmen [10] [28]. P63 kann also durch seine TAp63- und Δ Np63-Isoformen Gene mit unterschiedlichen, auch gegensätzlichen Funktionen, regulieren.

In der Embryonalentwicklung und der Epitheldifferenzierung spielen beide p63-Isoformen eine wichtige Rolle [16] [37] [44]. TAp63 reguliert außerdem den Lipid- und Glukosemetabolismus, was einen Effekt auf seine Tumorsuppressorfunktion hat, da Krebszellen eine hohe Stoffwechselaktivität aufweisen [4] [48].

Das im Folgenden beschriebene Protein NIR bindet direkt an Domänen von TAp63, nicht jedoch an die Δ Np63-Isoform [20].

1.3 Der Novel INHAT Repressor NIR

NIR ist ein ubiquitär exprimiertes Protein mit einer Länge von 749 Aminosäuren [23] [53]. Es ist hauptsächlich im Nukleolus lokalisiert und an der ribosomalen Biogenese beteiligt [20] [23] [53]. Die Abkürzung NIR steht für Novel INHAT Repressor, wobei INHAT wiederum für Inhibitor of Histoneacetyltransferase steht [23]. NIR besitzt 2 INHAT-Domänen, eine C- und eine N-terminale [23]. Eine weitere Bezeichnung für NIR ist NOC2L, dies steht für NOC2 like nucleolar associated transcriptional repressor [32].

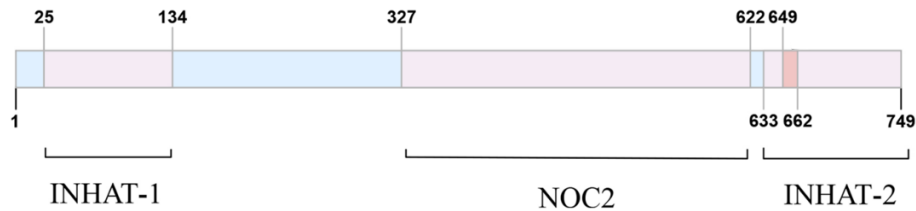


Abb. 1.3: Struktur des NIR-Proteins. Abb. modifiziert nach Lu *et al.*, 2023 [32].

Histonacetyltransferasen (HAT) transferieren Acetyl-Gruppen auf Lysinschwänze, um die DNA-Histon-Bindung zu lockern [35]. Durch diese aufgelockerte Bindung wird die Gentranskription gefördert [35] [29]. NIR inhibiert durch beide INHAT-Domänen die Acetylierung durch diese HATs jedoch, insbesondere die Acetylierung durch das HAT p300 [23]. Dies geschieht durch Bindung von NIR an Nukleosomen und Core-Histone [23]. NIR wirkt somit als Repressor der Transkriptionsinitiation [20] [23]. Im Gegensatz zu anderen INHATs arbeitet NIR unabhängig von Histon-Deacetylasen (HDACs) [20] [23].

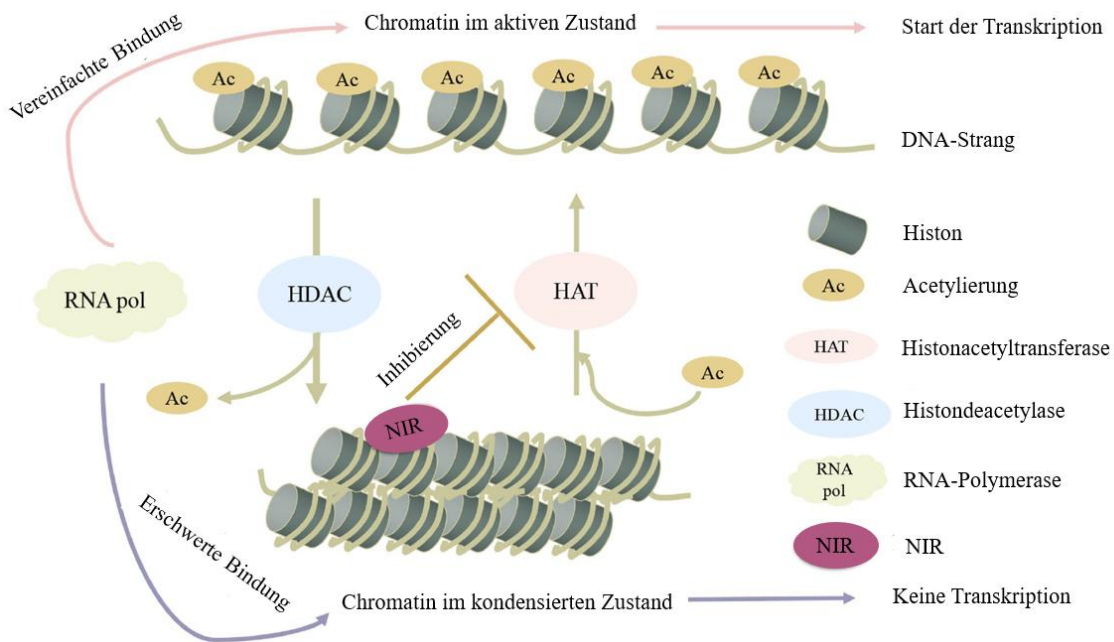


Abb. 1.4: Wirkweise des NIR-Proteins bei der Transkription. Abb. modifiziert nach Lu *et al.*, 2023 [32].

NIR bindet nicht direkt an die DNA, kann aber durch DNA-bindende Faktoren, wie etwa die p53-Familie, zu den Promotoren rekrutiert werden, um die Histonacetylierung in p53-gesteuerten Genen zu hemmen [20] [21] [23].

P53, der Tumorsuppressor und „Wächter des Genoms“, wirkt hauptsächlich als Transkriptionsfaktor [7] [30]. P53 kann durch Zellstress aktiviert werden, woraufhin es an die Promotorregion seines Zielgens bindet und weitere Transkriptionsfaktoren rekrutiert [30]. Nachgeschaltete Gene können zur Apoptose und zum Anhalten des Zellzyklus führen [50].

NIR unterdrückt die Funktion des Tumorsuppressors p53 auf mehreren Wegen: Ein Weg ist die Inhibierung der Acetylierung des p53-Proteins, wodurch es nicht mehr als Transaktivator von Genen funktionell sein kann [23]. Außerdem rekrutiert NIR Aurora B, welches p53 an bestimmten Aminosäureresten phosphoryliert und es somit inaktiviert [54]. Des Weiteren interagiert NIR mit MDM2, einem wichtigen negativen Regulator von p53 [38]. NIR stabilisiert MDM2, sodass es auch auf diesem Wege zur Unterdrückung von p53 beiträgt [21]. NIR ist der erste bekannte INHAT-Repressor, der bei der p53-Kontrolle eine Rolle spielt [23].

Es wurde nachgewiesen, dass NIR auch mit TAp63 interagiert, was zu einer p53-ähnlichen Transkriptionshemmung nachgeschalteter Gene führt [20]. NIR wird zur p63-Promotorregion rekrutiert und hemmt dort ebenfalls die Acetylierung und somit die Transkription nachgeschalteter Gene [11].

Wenn p53 und p63 acetyliert vorliegen, wird die Transkription von p21 stimuliert, welche wiederum zu einem Anhalten des Zellzyklus in der G1/S-Phase führt [12] [20] [45]. Die Acetylierung von p53 und p63 erfolgt durch das HAT p300 [18] [34]. Wie bereits beschrieben, kann diese Acetylierung durch p300 wiederum durch NIR inhibiert werden [20] [23] [53]. Somit führen geringe NIR-Level durch geringere Hemmung der p63-Acetylierung zu vermehrtem Vorliegen von p21 und damit zum Anhalten des Zellzyklus in der G1-/S-Phase [20] [33]. NIR stellt also einen Regulator der Apoptose dar [23].

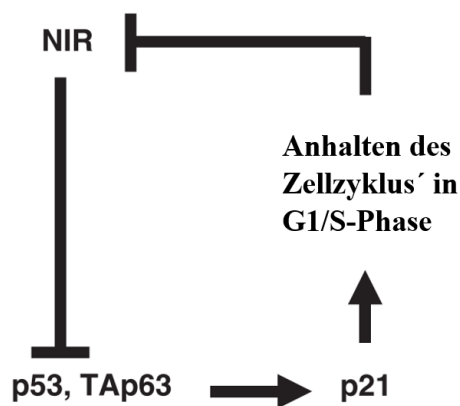


Abb. 1.5: Interaktion zwischen NIR, p53/TAp63 und dem Zellzyklus. Abb. modifiziert nach Heyne *et al.*, 2010 [20].

Während in der G1/S-Phase wenig NIR-Protein vorhanden ist, ist in der G2/M-Phase viel NIR-Protein vorhanden [20]. Es wurde außerdem untersucht, ob p63 und NIR durch eine direkte Bindung miteinander interagieren, dies war nicht der Fall [20]. Zusammengenommen lässt sich daraus schließen, dass NIR durch p53 und p63 nicht direkt reguliert wird, sondern dies über den Zellzyklus geschieht [20].

1.4 NIR bei Karzinomen

Bei einem NIR-Knockdown ist die Zellproliferation, die bekanntermaßen ein Merkmal bösartiger Tumoren darstellt, erniedrigt [32]. Insbesondere beim kolorektalen Karzinom und beim Mamma-Karzinom sind erhöhte NIR-Level zu finden [5] [31]. Diese sind vergesellschaftet mit einem schlechteren Outcome für die Patienten [5] [31]. Bei verschiedenen Karzinomen haben Patienten mit hoher NIR-Expression ein geringeres Gesamtüberleben [32]. NIR-Level sind in Tumoren im Gegensatz zu tumorangrenzenden Geweben erhöht [32]. Somit scheint NIR als Suppressor des Tumorsuppressors p53 die Zellproliferation zu fördern und als Onkogen zu wirken [23] [31] [32].

1.5 Auswirkungen eines NIR-Knockdowns

Mäuse mit systemischer NIR-Defizienz sterben noch in utero [33]. Ein nur auf Lymphozyten beschränkter Knockdown führt zu unreifen B- und T-Zellen [33]. Damit spielt NIR in der Embryonalentwicklung und in der B- und T-Zellentwicklung eine Rolle [33].

Wie bereits beschrieben, ist p63 in die Epidermalentwicklung involviert [14] [16] [44]. Durch Interaktion mit ebendiesem und mit p53 beeinträchtigt ein auf die Epidermis beschränkter NIR-Knockdown die Epidermalentwicklung und wirkt perinatal ebenfalls letal [11].

Es zeigte sich, dass ein dauerhafter NIR-Knockdown von den meisten Zelltypen schlecht toleriert wird [21]. Der Knockdown inhibiert das Zellwachstum sehr stark und führt schließlich zur Apoptose [23] [53]. NIR-Knockout-Mäuse sind bei komplettem NIR-Knockdown nicht überlebensfähig [11].

Zellen ohne das NIR-Protein scheinen somit nicht überlebensfähig zu sein.

1.6 NIR bei der AML

Im Gegensatz zu obiger Annahme, dass Zellen ohne NIR nicht überlebensfähig sind, wurden jedoch AML-Patientenproben gefunden, die NIR auf Proteinebene nicht exprimieren [8]. Damit scheint die Population der AML-Erkrankten eine Ausnahme zu bilden. NIR könnte somit eine Rolle in der Pathogenese der AML spielen.

Wie in Kapitel 1.1 bereits erwähnt, spielen Chromosomenaberrationen und Genmutationen und damit eine gestörte Genexpression eine wichtige Rolle in der Pathogenese und Prognose der AML [1]. Eine gestörte Genexpression kann die normale Genfunktion verändern und so zur leukämischen Transformation beitragen [1]. Dies betrifft vor allem die zytogenetisch unveränderte AML, die einen Anteil von etwa 50 % an allen AML-Diagnosen ausmacht [1]. Auch die Tatsache, dass bestimmte, funktionell ähnliche Gengruppen bei der AML dereguliert sind, spricht für transkriptionelle Regulationsmechanismen als Mitursache für die AML-Entstehung [8]. Diese gestörten Genexpressionen und Regulationsmechanismen könnten auch durch Transkriptions-Co-Regulatoren wie NIR mitverursacht werden [8].

Die Arbeitsgruppe um Dolnik *et al.* untersuchte diese AML-Patientenproben mit ihrer unerwarteten, da teils nicht existenten NIR-Proteinexpression [8]. Sie dichotomisierten die Proben abhängig ihrer NIR-Transkriptlevel in eine „NIR-high“ und eine „NIR-low“-Gruppe. Es konnte zwar keine signifikante Korrelation zwischen NIR-Expression und Patientenalter, der Anzahl weißer Blutzellen oder dem Gesamtüberleben gezeigt werden [8]. Es stellte sich jedoch heraus, dass niedrige NIR-RNA-Expressionslevels mit Monosomie des Chromosoms 7 oder Deletion des Chromosoms 7q [-7/del(7q)] assoziiert waren [8]. Hohe NIR-RNA-Expressionslevels waren assoziiert mit der Translokation t(15;17), bei der der Transkriptionsfaktor RARA eine Rolle spielt, und mit der Translokation t(11q23), bei der wiederum der Transkriptionsfaktor KMT2A eine Rolle spielt [19] [8]. Während -7/del(7q) und die Translokation t(11q23) mit einer schlechten Prognose einhergehen, ist t(15;17) mit einer besseren Prognose assoziiert [17]. Ob NIR mit den Transkriptionsfaktoren RARA oder KMT2A interagiert, ist nicht bekannt [8].

Bisher unveröffentlichte Daten aus der Arbeitsgruppe um Dolnik *et al.* deuteten darauf hin, dass bei hoher NIR-Expression verstärkt Gene exprimiert werden, die für Proteine kodieren, die an der Regulierung der Zellproliferation und am Zellmetabolismus beteiligt sind [8]. Diese vermehrte Expression bestimmter Gene durch hohe NIR-Level könnte die Protein-Translation beeinträchtigen [8]. Im Gegenzug könnten niedrige NIR-Level durch daraus resultierende erhöhte Expressionen bestimmter Gene die Regulierung der G2/M-Phase des Zellzyklus und die mRNA-Prozessierung beeinflussen [8]. Viele Fragen zur Rolle von NIR bei der AML bleiben also noch unbeantwortet.

1.7 Besonderheiten von Labormethoden

Suspensionszellen, wie AML-Zelllinien, sind im Gegensatz zu adhärennten Zelllinien oftmals schwierig mittels Lipofektion oder Elektroporation zu transfizieren. Selbst bei erfolgreicher Durchführung kommt es oft zu einer signifikanten Reduktion der Zellvitalität oder zu Off-Target-Effekten [25]. Diese Off-Target-Effekte können unter Umständen die Ergebnisse verfälschen. Daher beschäftigten sich Forschungsgruppen wie H. S. Soifer *et al.* [46] und Fazil *et al.* [13] mit alternativen Methoden, Fremd-DNA bzw. -RNA in betroffene Zelllinien einzubringen. So wurde das Prinzip der Gymnosis mittels GapmeRs untersucht.

Bei dieser Methode handelt es sich um eine unassistierte Aufnahme gewünschter antisense-DNA-Abschnitte ohne Transfektionsreagenz [46]. Sie werden eigenständig durch Makropinozytose in die Zelle aufgenommen [13]. Nach Bindung an die Ziel-mRNA kommt es zu einer Rekrutierung der RNase H [2]. Durch endonukleolytische Spaltung der gebundenen mRNA kommt es zu einem spezifischen Gen-Silencing [2]. Bei Versuchen mit non-targeting-GapmeRs an ebenfalls in Suspension wachsenden und damit schwer zu transfizierenden T-Lymphozyten konnten hohe Effizienzen von weit über 90 % erreicht werden [13]. Durch non-targeting-GapmeRs kam es weder zu einer signifikanten Reduktion der Zellvitalität, noch zu einer unerwünschten

Immunantwort oder zu off-target-Effekten [13]. Die Behandlung mit gegen spezifische Gene gerichteten Cas9-Molekülen führte zu einem effektiven Knock-Down ebendieser [13]. Zur Genomeditierung bei AML-Zellen lagen noch keine Daten vor.

2 Zielsetzung

Der „Novel INHAT (Inhibitor of Histonacetyltransferase) Repressor“ NIR sorgt durch seine beiden INHAT-Domänen für eine Inhibierung der Histonacetylierung [23]. Eine Histonacetylierung führt über eine aufgelockerte Histon-Bindung zu einer erleichterten Gentranskription [29]. Dadurch, dass NIR diese Histonacetylierung mit daraus resultierender aufgelockerter Histon-Bindung blockiert, wirkt NIR als Repressor der Transkriptionsinitiation [20] [23]. NIR ist ein ubiquitär exprimiertes Protein [23].

In vorausgegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass ein NIR-Knockout bei Mäusen zu einer gestörten Embryogenese führt, während der alle Maus-Embryonen sterben [11] [21]. Auch ein dauerhafter NIR-Knockdown wird von den meisten Zelltypen nicht toleriert [21]. Im Gegensatz dazu wurden jedoch in den hämatologischen Zellen von AML-Patienten mit > 80 % Blastenanteil solche gefunden, die NIR auf Proteinebene nicht exprimieren [8]. Im Zuge unserer Experimente fanden wir ebenso AML-Zelllinien, die das NIR-Protein nicht exprimieren.

Wir wollten herausfinden, welche AML-Zellen eine NIR-Expression auf Protein- und Transkriptionsebene aufweisen. Anhand der vorliegenden Ergebnisse stellte sich die Frage, ob ein antagonistischer Zusammenhang zwischen NIR- und p63-Expression in AML-Zellen existiert, sodass ein hohes Expressionslevel von NIR mit einem niedrigen Expressionslevel von p63 einhergeht und vice versa. Wir untersuchten, auf welcher Ebene ein möglicher Zusammenhang zwischen beiden Genen lokalisiert ist. Da jedoch die betroffenen Zellen aufgrund ihrer Eigenschaft als Suspensionszellen als schwer zu transfizieren gelten und somit eine Manipulation auf Protein- und Transkriptionsebene zur Untersuchung der Zusammenhänge schwer zu erreichen ist, setzten wir uns weiterhin mit der Fragestellung auseinander, durch welche Methode in den betroffenen Zellen ein Gen- und Protein-Knockdown erreicht werden kann. Hierfür wurden die Moleküle der LNA-GapmeRs eingesetzt, die mittels „Gymnosis“ unassistent von der Zelle aufgenommen werden [46]. Die Etablierung dieser Methode an AML-Zellen soll in Zukunft weitere Untersuchungen an diesen erleichtern, um durch weitere Knockdown-Experimente ein besseres Verständnis über molekulare Eigenschaften der AML-Erkrankung zu erlangen.

Um all dies zu erreichen, wurden Experimente an verschiedenen AML-Zelllinien durchgeführt. Ziel der hier beschriebenen Experimente war

- herauszufinden, welche AML-Zellen eine NIR- und eine p63-Expression auf Protein- und Transkriptionsebene aufweisen
- zu prüfen, ob ein antagonistischer Zusammenhang zwischen NIR- und p63-Expression existiert und auf welcher Ebene dieser lokalisiert ist
- die Methode der Gymnosis mittels LNA-GapmeRs zur Behandlung der AML-Zellen zu etablieren.

3 Material und Methodik

3.1 Material

3.1.1 Puffer und Lösungen

Blaumarker	Bromphenolblau 0,2 %
	in A. dest.

Entwicklerlösung	100 ml Entwicklerkonzentrat
	A. dest. ad 500 ml

DAPI	1 µl DAPI-Lösung
	in 50 ml Methanol

FACS-Fix	1 % Paraformaldehyd
	in PBS

Fixierlösung	100 ml Fixierkonzentrat Part 1
	25 ml Fixierkonzentrat Part 2
	A. dest. ad 500 ml

2 x Lyse-/Ladepuffer	10 ml Glycerol 100 %
	20 ml SDS 10 %
	5 ml Tris pH 6,8 1 M
	15 ml A. dest.

Marker mit 3 Farbstoffen	1 mg Bromphenolblau 0,1 %
	2 mg Xylencyanol 0,2 %
	2 mg Orange G 0,2 %
	0,5 g Sucrose 50 %
	2 µl EDTA (0,5 M) 1 mM

PBS-Puffer	140 mM NaCl
	25 mM KCl
	0,5 mM MgCl ₂
	1 mM CaCl ₂
	10 mM Na-K-Phosphat

10 x SDS-Laufpuffer	144 g Glycin
	30,34 g Tris-Base
	10 g SDS bzw. 100 ml 10 % SDS
	A. dest. ad 1000 ml

50 x TAE-Puffer	121 g Tris-Base
	28,5 ml Essigsäure
	50 ml EDTA [0,5 M]
	A. dest. ad 500 ml

10 x Transferpuffer	30 g TRIS-Base
	144 g Glycin
	A. dest. ad 800 ml

Trypanblau	0,1 g Trypanblau
	in 500 ml A. dest.

3.1.2 Chemikalien

30 % Acrylamidlösung Gel A	Roth
Agarose	Roth
Ammoniumperoxidsulfat APS	Merck
Beta-Mercaptoethanol	Merck
2%ige Bisacrylamidlösung Gel B	Roth
Bromphenolblau	Merck
Dako Fluorescent Mounting Medium	Dako
4',6-Diamidino-2-phenylindol DAPI	Sigma
Dimethylsulfoxid DMSO	Merck
1M 1,4-Dithiothreitol DTT	Roth
Entwicklerkonzentrat	Adefo-Chemie
Ethidiumbromid	Roth
Ethylendiamintetraacetat EDTA	Merck

Essigsäure	Merck
Fixierkonzentrat Part 1 und 2	Adefo-Chemie
Glycerol	Merck
Glycin	Merck
Methanol	Merck
Natriumhydroxid NaOH	Roth
Orange G	Merck
Paraformaldehyd	Merck
Reagent A Lumi GLO (R) (20 x)	Cell Signaling Technology
Reagent B Peroxide (20 x)	Cell Signaling Technology
Salzsäure HCl	VWR
SDS-Pellets	Roth
Sucrose	Sigma
TEMED N, N, N', N' - Tetramethylethylendiamin	Sigma
TRIS-Hydrochlorid	Roth
Xylencyanol	Sigma

3.1.3 Geräte, Materialien und Programme

Brutschrank Hera cell 240	Heraeus
CFX Connect™ Real-Time System	Bio-Rad
CFX Maestro-Programm	Bio-Rad
Cytospin 2	Shandon
Elektrophoresekammer	Hofer
FACS BD Canto™	BD Biosciences
FACS Flowing Software 2	Turku Bioscience
FACS-Tubes	Sarstedt
Filterkarten Cytospin	Thermo Fisher Scientific
Fluoreszenzmikroskop Celldiscoverer 7	Zeiss
GenePulser Xcell™	Biorad
Hard-Shell® 96 Microplate	Bio-Rad
Hyperfilm™ ECL	Amersham
Kipptisch Shaker S4	Elmi
Mikroskop DMIL	Leica
NanoDrop® ND-1000 Full-spectrum Spectrometer	Peqlab
Objektträger und Deckgläser	Menzel-Gläser
Photometer Gene Quant pro	Amersham Biosciences
PTC-200 Peltier Thermal Cycler	Bio-Rad
Rollenmischer RM-810	Sysmex

Sterilwerkbank Hera safe	Heraeus
Transfermembran Immobilon®-P	Merck Millipore
UV-Kamera	LTF Labortechnik
Vortexer REAX 2000	Heidolph
Whatman Filterpapier	VWR
Zen lite 3.6	Zeiss
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf
Zentrifuge Z 383 K	Hermle
Zytologie-Trichter Shandon	Thermo Fisher Scientific

3.1.4 Zellkultur

3.1.4.1 Zelllinien

HL60	Hierbei handelt es sich um Zellen, die 1976 aus dem Blut einer 35-jährigen AML-Patientin gewonnen wurden. Sie entsprechen einer AML der Klassifikation FAB M2.	DSMZ
TIB202 = THP-1	Die Zellen wurden 1978 aus dem Blut eines 1-jährigen Jungen mit AML-Rezidiv gewonnen. Die Zellen entsprechen der Klassifikation AML FAB M5.	
HNT34	Es handelt sich um 1994 aus dem Blut einer 47-jährigen AML- Patientin gewonnene Zellen der Klassifikation AML FAB M4.	
NB4	Es handelt sich um Zellen aus dem Knochenmark einer 23-jährigen AML-Patientin mit zweitem Rezidiv im Jahr 1989. Sie entsprechen der Klassifikation AML FAB M3.	
KG1A	Die Zellen wurden aus dem Knochenmark eines 59-jährigen AML-Patienten entnommen. Es handelt sich um die Klassifikation AML FAB M6.	
Oci-AML-3	Die Zellen wurden 1987 aus dem Blut eines 57-jährigen AML-Patienten entnommen und entsprechen einer AML FAB M4.	
Kasumi-1	Es handelt sich um 1989 aus Blut eines 7-jährigen AML-Patienten bei Rezidiv nach Knochenmarktransplantation entnommene Zellen der Klassifikation AML FAB M2.	
Mono-Mac-1	Die Zellen wurden 1985 aus dem Blut eines 64-jährigen Patienten mit einer AML der Klassifikation AML FAB M5 entnommen.	

3.1.4.2 Medien und Materialien

alpha-MEM Eagle	Pan Biotech
5'-Aza-2'-Deoxycytidinen A3656	Sigma
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline PBS	Sigma
Fetal Bovine Serum FBS/FCS	Biowest
Glutamin	Sigma
MEM non-essential amino acids Solution 100 x	Sigma
Natriumpyruvat	Pan Biotech
Penicillin-Streptomycin	Sigma
RPMI 1640	Pan Biotech
Trypsin-EDTA	Sigma
Trypanblau	Merck
6-Well-Platte, 24-Well-Platte	Sarstedt
Zählkammer Neubauer	LO-Laboroptik
75cm ² -Zellkulturflaschen	Sarstedt
15ml- und 50ml-Zentrifugenröhrchen	Sarstedt

3.1.5 siRNA-Transfektion

X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent		Roche
AllStars Negative Control siRNA	Sequenz nicht bereitgestellt	Qiagen
Alexa Fluor 488 AllStars Negative Control siRNA	Sequenz nicht bereitgestellt	
NIR1 sense	r(GACCUGAACUUCCCAGAGA)dTdT	Qiagen
NIR1 antisense	r(UCUCUGGGAAGUUCAGGUC)dTdT	
NIR2 sense	r(GACAGGAAGGAUGAAGACA)dTdT	
NIR2 antisense	r(UGUCUUCAUCCUCCUGUC)dTdT	

3.1.6 Antisense LNA™ GapmeRs

NIR1	5' TCACGGCACTAATAA 3'	Qiagen
NIR2	5' GAGATCAAGGAGTATG 3'	
NIR3	5' ATCAAGGAGTATGGAC 3'	
Negative Control A	5' AACACGTCTATACGC 3'	
Negative Control A FAM	5' 56-FAM-AACACGTCTATACGC 3'	
GAPDH (human) Control	5' AGATTCAGTGTGGTGG 3'	

3.1.7 Primäre Antikörper

Name	Antikörper	Firma	Verhältnis
4A4	p63-monoklonaler Antikörper anti-mouse	Millipore	1:1000
DO-1	p53-monoklonaler Antikörper anti-mouse	Calbiochem	1:2000
NIR-Antikörper 2910	NIR-monoklonaler Antikörper anti-rabbit	Arbeitsgruppe Prof. Schüle, Freiburg	1:1000
β-Aktin	β-Aktin-monoklonaler Antikörper anti-mouse	Sigma	1:5000

3.1.8 Sekundäre Antikörper

Name	Antikörper	Firma	Verhältnis
Goat Anti-Mouse IgG (H + L)-HRP Conjugate	Sekundärer anti-mouse-Antikörper	Bio-Rad	1:3000
Goat Anti-Rabbit IgG (H + L)-HRP Conjugate	Sekundärer anti-rabbit-Antikörper	Bio-Rad	1:3000

3.1.9 Kits

LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche
RNeasy® Mini-Kit	Qiagen
SuperScript™ III Reverse Transcriptase	Invitrogen
Venor® GeM Classic-Kit	Minerva Biolabs

3.1.10 Marker

GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific

3.1.11 Primer

NIR-RT1 forward	5' CAGCTGGTGCCTGTCTGTC 3'	460 bp	Operon
NIR-RT1 reverse	5' GCAGTGCACATACTGCCAGT 3'		
RTp63TA forward	5' TTAGCATGGACTGTATCCGC 3'	375 bp	Sigma
RTp63TA reverse	5' ATCACCTTGATCTGGATGGG 3'		
β-Aktin forward	5' CAGCACAATGAAGATCAAGATC 3'	101 bp	Operon
β-Aktin reverse	5' ACATCTGCTGGAAGGTGGACA 3'		

3.2 Methodik

3.2.1 Zellkultur

Alle Zellen wurden in sterilen 75cm²-Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C in 5%iger CO₂-Atmosphäre inkubiert. In der folgenden Tabelle sind Kulturmedien und Zusätze dargestellt.

Zelllinie	Medium	Splittingverhältnis
Kasumi-1	80 % RPMI mit 20 % hitzeinaktiviertem (h. i.) FCS + 1 % Glutamin + 1 % Penicillin-Streptomycin	1:2 - 1:3
Mono-Mac-1	90 % RPMI mit 10 % h. i. FCS + 1 % Glutamin + 1 % Penicillin-Streptomycin + 1 % nicht-essenzielle Aminosäuren + 1 mM Natriumpyruvat	
KG1A	80 % alpha-MEM mit 20 % h. i. FCS	
OCI-AML-3	+ 1 % Penicillin Streptomycin	1:3 - 1: 5
TIB202	90 % RPMI mit 10 % h. i. FCS + 1 % Glutamin + 1 % Penicillin-Streptomycin	
NB4		
HNT34		
HL60		

Zwei Mal pro Woche wurde jede Zelllinie unter sterilen Bedingungen unter der Sicherheitswerkbank im angegebenen Verhältnis passagiert.

3.2.2 Bestimmung der Wachstumskurven der Zellen

Um das Wachstum der verschiedenen Zelllinien zu beobachten und miteinander zu vergleichen, wurden Wachstumskurven erstellt. Hierfür wurden jeweils 5×10^4 Zellen in 1 ml Medium pro Well in einer 24-Well-Platte ausplattiert. Nach 24 h wurde die erste Bestimmung durchgeführt: alle Zellen eines Wells wurden in ein Zentrifugenröhrchen aufgenommen, für 3 min bei 1.200 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde gelöst und in 1 ml PBS resuspendiert. Hiervon wurden 50 µl in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Zur Differenzierung zwischen lebendigen und toten Zellen wurden 50 µl Trypanblau dazugegeben, durch Pipettieren gemischt und 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 8 µl der Lösung in eine Neubauer-Zählkammer überführt und ausgezählt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden alle Zellen in den 4 großen Quadraten gezählt. Die Gesamtzellzahl erhielt man wie folgt:

$$\frac{\text{Gesamtzellzahl aller 4 großen Quadrate}}{2} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

Um die restlichen Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden diese abermals 3 min bei 1.200 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 2 ml frischem Medium gelöst. Im Anschluss wurden die Zellen nun wieder in ein Well ausplattiert. Diese Bestimmung wurde nochmals nach 48 h und 72 h durchgeführt. All dies erfolgte unter sterilen Bedingungen unter der Sterilwerkbank. Bei allen Zählungen wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

3.2.3 Pelletieren der Zellen

Zur weiteren Verarbeitung und Untersuchung der Zellen wurden Zellpellets angefertigt. Hierfür wurde der Überstand in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und für 3 min bei 1.200 rpm abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes, Lösen des Zellpellets und Resuspendieren in PBS wurde die Zellzahl mithilfe der Neubauer-Zählkammer ermittelt und auf die gewünschte Zellzahl eingestellt. Nach einem erneuten 3-minütigen Abzentrifugieren bei 1.200 rpm und Verwerfen des Überstandes wurde ein weiteres Mal das Zellpellet gelöst und PBS hinzugefügt. Diese Lösung wurde nun in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und ein drittes Mal für 3 min bei 1.200 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen. Das Pellet wurde bei - 20 °C aufbewahrt.

3.2.4 Gewinnung der Gesamtzellextrakte

Zur Gewinnung der Zellextrakte wurden die Zellen lysiert. Dies geschah mithilfe eines Lysepuffers und durch zusätzliches mechanisches Scheren der Zellen. Das im Lysepuffer enthaltene DTT bricht Proteindisulfidbindungen auf, das SDS entfaltet die Proteine und bringt sie in eine lineare Orientierung. Durch den zusätzlich entstehenden Unterdruck beim mechanischen Scheren führen diese Punkte zum Zellaufschluss. Zum Zeitpunkt der Lyse wurde der Einfachpuffer wie folgt frisch angesetzt:

500 µl	2 x SDS-Lyse-/Ladepuffer
400 µl	A. dest.
100 µl	1 M DTT = 100 mM

1×10^7 Zellen wurden in 250 µl des vorgewärmten Lyse-/Ladepuffers aufgenommen. Diese Lösung wurde für 10 min bei 98 °C im Heizblock inkubiert und im Anschluss mithilfe einer 1ml-Spritze mit 23-gauge-Kanüle durch 10-maliges Auf- und Abziehen des Kolbens geschoren. Nach 5-minütigem Zentrifugieren bei 13.000 rpm in einer auf 4 °C gekühlten Zentrifuge wurde der Überstand in ein neues Mikroreaktionsgefäß aufgenommen und das Pellet verworfen. Zum Schutz vor Proteolyse durch Proteasen wurden die Zellysate sofort bei - 20 °C weggefroren. Bei Benutzung wurden sie auf Eis gestellt. Um eine Proteinmessung des Lysats durchzuführen, wurden 10 µl Lysat in 500 µl eines 100 mM NaOH aufgenommen. Als Referenzprobe dienten genannte Mengen des verwendeten Lyse-/Ladepuffers in 100 mM NaOH. Die Proben wurden in

Glasküvetten überführt und bei 280 nm im Photometer gemessen. Die Konzentration berechnete sich anhand folgender Formel:

$$\frac{6,4}{OD_{280}} = x \mu\text{l} \hat{=} 15 \mu\text{g Lysat}$$

3.2.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

In der SDS-PAGE werden Proteine elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. In Puffer und Gel enthaltenes SDS lagert sich an die Proteine an und führt zu deren Denaturierung. Durch das angelagerte SDS erhalten die Proteine negative Ladungen, die proportional zu ihrer Molekülgröße sind. Die Proteine wandern entsprechend ihrer Ladung durch das Gel zur Anode und trennen sich entsprechend ihrer Größe nach auf. Zusätzlich zu den Proteinen werden Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Da die Molekulargrößen seiner Markerproteine bekannt sind, kann anhand deren Banden das Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine abgeschätzt werden.

Verwendet wurden 10%ige SDS-Polyacrylamid-Gele folgender Zusammensetzung:

Laufgel		Sammelgel	
2,26 ml	H ₂ O	3,67 ml	H ₂ O
5,3 ml	30 % AA-Stock	1 ml	30 % AA-Stock
2,12 ml	2 % Bis-Stock	400 µl	2 % Bis-Stock
6 ml	1 M TRIS (pH 8,8)	750 µl	1 M TRIS (pH 6,8)
320 µl	10 % SDS	120 µl	10 % SDS
140 µl	10 % APS	50 µl	10 % APS
14 µl	TEMED	10 µl	TEMED

Zum Gießen des Gels wurden eine Glas- und eine Ohrenplatte aufeinander geklemmt, die an seitlichen und unteren Rändern durch Platzhalter aus Plastik auseinandergehalten wurden. Nach dem Aufrechtstellen dieser Apparatur wurde das Sammelgel zwischen die beiden Glasplatten pipettiert und vorsichtig eine dünne Schicht Aqua destillata aufgelegt, um eine gerade Begrenzung zu erhalten. Nach etwa 15 min war das Gel auspolymerisiert, sodass das Wasser verworfen wurde und das Sammelgel aufgeschichtet wurde. Der Kamm wurde unter Vermeidung von Luftblasen eingesteckt. Nach wiederum etwa 15 min konnte der Kamm entfernt werden. Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingespannt. Der 10-fach-Ansatz des SDS-Laufpuffers wurde durch Auffüllen mit A. dest. auf eine 1-fach-Lösung verdünnt. Damit wurden innere und äußere Kammer gefüllt. Anhand unter Punkt 3.2.4 genannter Formel wurde die Menge des Zelllysates bestimmt, die 15 µg Lysat entsprach. Diese wurde in ein 2ml-Mikroreaktionsgefäß überführt. Hinzugefügt wurden je 2 µl einer 0,2%igen Bromphenolblau-Lösung. Die Proben wurden in je

eine Tasche des SDS-Polyacrylamid-Gels unter Vermeidung von Luftbläschen pipettiert. Eine weitere Tasche wurden mit 5 µl PageRuler™ Prestained Protein Ladder befüllt. Es wurde ein 120V-Spannung angelegt, die, sobald die Proben das Laufgel erreicht hatten, auf 180 V erhöht wurde. Der Strom wurde abgeschaltet und die Glasplatten mit dem Gel entnommen, sobald die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte.

3.2.6 Western Blot

Das Prinzip des Western Blots ist die Übertragung der Proteine vom SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine Transfermembran. Dies geschieht durch eine senkrecht zum Gel angelegte Spannung. Die negativ geladenen Proteine wandern zur Anode. Zwischen Gel und Anode wird die Transfermembran gelegt, sodass die Proteine auf diese übertragen werden. Das im Gel erzeugte Bandenmuster bleibt erhalten. Durch spezifische Antikörper können die Proteine in den Banden immunologisch nachgewiesen werden. Zunächst wurde der 10 x Transferpuffer auf einen Einfachpuffer verdünnt:

1 x Transferpuffer	100 ml 10 x Puffer
	200 ml Methanol
	700 ml A. dest.

4 Whatman-Filterpapiere und eine Transfermembran wurden auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten. Die Membran wurde in Methanol aktiviert, um sie für Proteine aufnahmefähig zu machen, und auf das Gel gelegt. Je 2 in Transferpuffer getränkte Whatman-Filterpapiere wurden auf jeder Seite aufgelegt und Luftblasen mithilfe eines Glasstabs verstrichen. Diese Schichten wurden – von beiden Seiten durch ein Schwammtuch geschützt – zwischen 2 Plastikgittern fixiert. Diese Apparatur wurde in die mit Transferpuffer befüllte Kammer gegeben. Ein Strom von 380 mA wurde für 3,5 - 4 h angelegt.

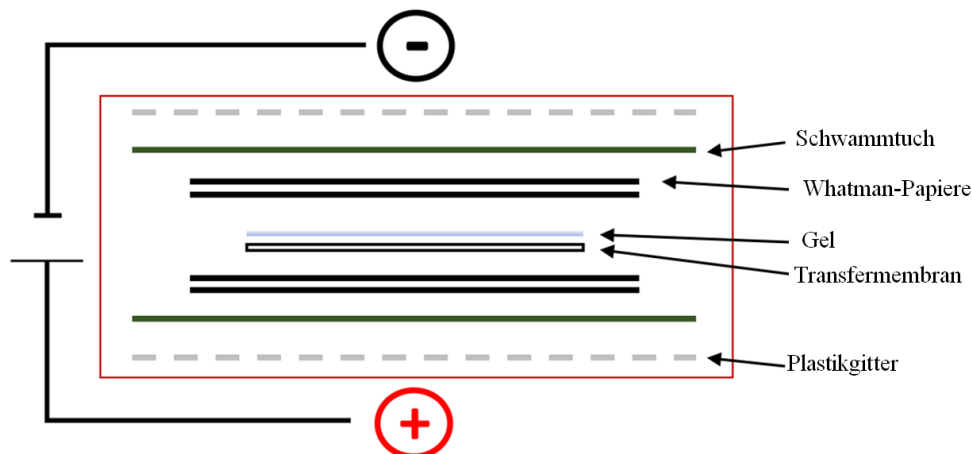


Abb. 3.1: Aufbau der Elektroforesekammer.

Nach Ablauf der Zeit wurde die Transfermembran entnommen und zwischen 2 Whatman-Filterpapieren getrocknet.

3.2.7 Immunologischer Proteinnachweis

Die Proteinbanden mussten nun sichtbar gemacht werden. Dies geschah mittels Bindung von primären und sekundären Antikörpern an das jeweilige Protein. Durch den Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper wird bei Zugabe der Peroxid-enthaltenden Entwicklerlösung eine Reduktion von H_2O_2 und gleichzeitig eine Oxidation von Luminol katalysiert. Die dabei entstehende Lichtemission wird detektiert. Die Transfermembran mit enthaltenen Proteinbanden wurde in Methanol aktiviert. Darauf folgte einstündiges Blocken in 5%iger Magermilch in PBS bei Raumtemperatur auf dem Kipptisch, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Alle Antikörper wurden im genannten Verhältnis in 5%iger Magermilch in PBS angesetzt. Der Blot wurde nach einstündigem Blocken bei Raumtemperatur in die angesetzten Antikörperlösungen gegeben und über Nacht auf dem Rollenmischer bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ im Kühlraum inkubiert. Es folgte 3-maliges Waschen mit PBS für je 10 min auf dem Kipptisch, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Im Anschluss wurde der Blot mit dem jeweiligen sekundären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte nochmals 3-maliges Waschen mit PBS für je 10 min, abermals um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Der Blot wurde auf eine Folie in die Entwicklerkassette gelegt. Bei Dunkelheit in der Dunkelkammer wurde eine Lösung, bestehend aus folgenden Komponenten, direkt auf den Blot gegeben:

25 μl	Lumi GLO (R) Reagent A (20 x)
25 μl	Peroxide Reagent B (20 x)
450 μl	A. dest.

Der Blot wurde mit der zweiten Folie überdeckt. Auf diese wurde der Entwicklerfilm gelegt, die Kassette geschlossen und je nach Antikörper unterschiedlich lange belichtet. Für das Entwickeln von β -Aktin und NIR haben sich 15 - 20 s bewährt, für die Entwicklung von p63 und p53 5 min. Der belichtete Blot wurde nach Ablauf der Zeit bis zur gewünschten Sichtbarkeit der Banden in die Entwicklerlösung gelegt, mit H_2O gewaschen und für je circa 5 min in der Fixierlösung fixiert.

3.2.8 Transfektion mittels siRNA

Das lipidbasierte Transfektionsreagenz bildet einen Komplex mit der siRNA. Mittels Endozytose gelangt die siRNA ins Zellinnere. Das Transfektionsreagenz fungiert somit als Trägersubstanz zum Transport der siRNA in die Zellen. Die Behandlung mit Negativ-Kontroll-siRNA und Alexa-488-gekoppelter siRNA erfolgte an 5×10^4 Zellen, die in 0,45 ml serumfreiem RPMI in je ein Well einer 24-Well-Platte ausplattiert wurden. In ein Mikroreaktionsgefäß wurden 40 μl

serumfreies RPMI und 10 µl Transfektionsreagenz pipettiert, in das zweite 50 µl serumfreies RPMI und 2 µl (0,3 µg/µl) der gewünschten siRNA. Beide Lösungen wurden vorsichtig gemischt. Innerhalb von 5 min wurden die Inhalte beider Mikroreaktionsgefäße vorsichtig miteinander gemischt und 15 - 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100 µl davon in jedes Well zugegeben und erneut vorsichtig gemischt. Die Zellen wurden 4 - 5 h im Brutschrank inkubiert. Die Behandlung mit NIR-siRNA und Negativ-Kontroll-siRNA erfolgte an 6×10^5 Zellen, die in 1,5 ml serumfreiem Medium in einer 6cm-Schale ausplattiert wurden. In ein Mikroreaktionsgefäß wurden 270 µl serumfreies RPMI und 30 µl Transfektionsreagenz hineinpipettiert, in das zweite 282 µl serumfreies RPMI und 54 µl (0,3 µg/µl) der gewünschten siRNA. Die NIR-siRNA setzte sich im Verhältnis 1:1 aus NIR1- und NIR2-siRNA zusammen. Beide Lösungen wurden vorsichtig gemischt. Innerhalb von 5 min wurden die Inhalte beider Mikroreaktionsgefäße miteinander gemischt und 15 - 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 600 µl davon in jedes Well zugegeben und erneut vorsichtig gemischt. Die Zellen wurden zur Untersuchung des NIR-Knockdowns 72 h im Brutschrank inkubiert.

3.2.9 Elektroporation

Durch die Pulse des GenePulsers wird kurzzeitig ein elektrisches Feld erzeugt, durch das die Permeabilität der Zellmembran erhöht wird. Dadurch kann die siRNA in die Zellen eingeschleust werden. Die zu untersuchenden Zellen wurden geerntet, direkt auf Eis gestellt und anschließend 2 x mit RPMI ohne FCS gewaschen. Die Zentrifuge wurde auf 4 °C gekühlt. Die Zellzahl wurde auf 2×10^7 Zellen pro ml eingestellt. 100 µl davon wurden zusammen mit 10 µg siRNA in eine Küvette gefüllt. Eine Küvette nur mit Zellen wurde für die Negativkontrolle bereitgestellt. Die Elektroporation erfolgte am Biorad GenePulser. Für die HL60-Zellen wurde das HL60-Programm, für alle anderen Zellen das Jurkat-Programm verwendet. Im Anschluss wurde die Küvette mit 500 µl FCS aufgefüllt und vorsichtig mit den Zellen gemischt. Ein 15ml-Zentrifugenröhrchen mit 10 ml RPMI und 20 % FCS wurde vorbereitet und die Zellen dorthin überführt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 1.200 rpm wurden die Zellen in 4 ml RPMI mit 20 % FCS in ein Well einer 6-Well-Platte überführt und im Brutschrank rekultiviert. Die Bestimmung der Transfektionseffizienz erfolgte nach 24 und 48 h im FACS.

3.2.10 Gymnosis durch LNA-GapmeRs

Wir verwendeten eine neue Methode zur Transfektion der AML-Zellen, genannt Gymnosis. Bei dieser Methode handelt es sich um eine unassistierte Aufnahme gewünschter antisense-DNA-Abschnitte ohne Transfektionsreagenz [46]. Wir verwendeten hierfür die Antisense LNATM GapmeRs von Qiagen. LNA-GapmeRs bestehen aus einer kurzen, circa 12 - 16 Nukleotide langen Sequenz, die an ihren jeweiligen Enden je 2 - 5 Locked Nucleic Acids (LNAs) enthält [46]. Dies sind Nukleinsäureanaloge mit 2'-O,4'-C-Methylenbrücke [41]. Hierdurch wird der Ribosering in

der idealen Konformation für die Watson-Crick-Bindung fixiert [42]. Somit sorgen die LNAs für eine hohe Bindungsaffinität und zusätzlich für eine hohe Nukleaseresistenz [2].

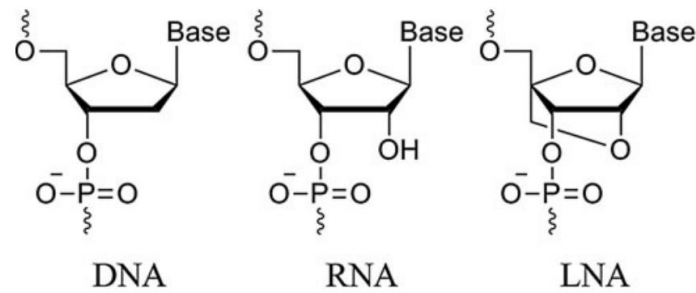


Abb. 3.2: Aufbau der LNA-GapmeRs [26].

Die LNAs rahmen eine Lücke („gap“) von zentraler DNA ein, daher auch der Name „GapmeR“ [42]. Zusätzlich besitzen GapmeRs modifizierte Phosphorothioat-Rückgrate, die eine hohe Beständigkeit gegen enzymatischen Abbau gewährleisten [41]. Durch ihre hohe Haltbarkeit können die GapmeRs ohne weiteren Zusatz, sprich ohne Transfektionsreagenz, in das Kulturmedium gegeben werden [46]. Sie werden eigenständig durch die Zelle aufgenommen, dies geschieht durch Makropinozytose [13]. Nach Bindung an die Ziel-mRNA sorgt die zentrale DNA-Sequenz für eine Rekrutierung der RNase H, die die gezielte endonukleolytische Spaltung der gebundenen mRNA katalysiert [2]. So kommt es zu einem spezifischen Gen-Silencing. Während die entstehenden Fragmente durch Exonukleasen abgebaut werden, wird das LNA-GapmeR wieder freigesetzt und katalysiert den Abbau weiterer mRNA-Moleküle [41]. Durch diese Funktionsweise kommen hohe Transfektionseffizienzen von weit über 90 % zustande [13].

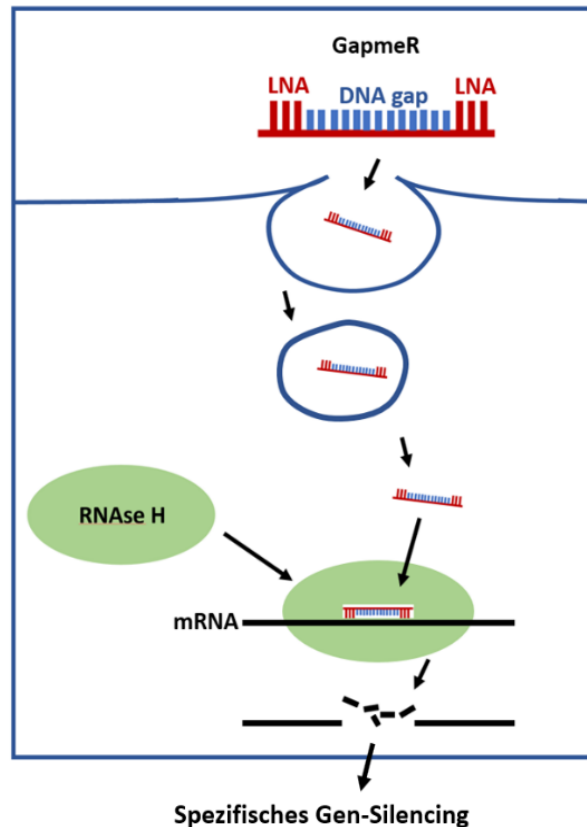


Abb. 3.3: Funktionsweise der LNA-GapmeRs.

Diese neue Methode eignet sich besonders für Zellen, die mit herkömmlichen Methoden, wie siRNA-Transfektionsreagenzien oder Elektroporation, kaum zu transfizieren sind. Dazu gehören insbesondere die in dieser Arbeit zu untersuchenden AML-Zellen als Suspensionszellen.

Vor erstmaligem Gebrauch wurden die LNA-GapmeRs in zellkultursterilem TE unter der Sterilwerkbank aufgelöst, sodass eine Stocklösung in der Konzentration von 50 μM entstand. Pro Well einer 24-Well-Platte wurden 4×10^4 Zellen in 500 μl des für sie geeigneten Mediums aufgenommen und ausplattiert. Für jede Zelllinie wurde zusätzlich eine Negativkontrolle mit ausplattiert, die mittels Negativ-Kontroll-GapmeRs behandelt wurde. In jedes zu behandelnde Well wurden 5 oder 10 μl der 50 μM -GapmeR-Stocklösung gegeben, sodass eine Konzentration von 500 nM beziehungsweise 1 μM bestand. Wenn eine mehr als 6-tägige Inkubation nötig war, wurde an Tag 6 erneut die zum Erreichen der Zielkonzentration nötige Menge der LNA-GapmeRs zugegeben, sprich erneut 5 oder 10 μl . Die Zellen wurden 48 h im Brutschrank bei 37 $^{\circ}\text{C}$ und 5%-iger CO_2 -Atmosphäre inkubiert. Es erfolgte eine Dreifachbestimmung.

3.2.11 Durchflusszytometrie (FACS)

Zum Messen der Transfektionseffizienz wurde das FACS benutzt. Hierbei handelt es sich um ein Verfahren, bei dem Fluoreszenz, Größe und Granularität der Zellen erfasst werden. Beim Auftreffen des Laserstrahls auf eine Zelle entstehen Streulicht und Fluoreszenzsignale.

Verschiedene Sensoren erfassen diese Signale und errechnen daraus die Zelleigenschaften. Die zu untersuchenden Zellen wurden in FACS-Tubes überführt und bei 1.500 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes und 2-maligem Waschen mittels PBS-Puffer und erneutem jeweils 5-minütigem Abzentrifugieren, wurden je 500 µl FACS-Fix zum Fixieren der Zellen hinzugefügt und die Zellen in diesem gelöst. Die Tubes wurden nun nacheinander mithilfe der Flowing Software 2 von Turku Bioscience gemessen, wobei immer eine Kontrolle der jeweiligen Zelllinie zuerst gemessen wurde. Es wurden je 10.000 Events gezählt. Zur Auswertung wurde um die vitalen Zellen ein Gate gelegt.

3.2.12 Fluoreszenzmikroskopie

Um die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachten zu können, mussten diese auf einem Objektträger fixiert werden. Hierfür wurde die Zellzahl auf 10^6 Zellen pro ml eingestellt. 100 µl dieser Suspension wurden auf einen Objektträger aufgebracht, dies entsprach 10^5 Zellen. Der Zytologie-Trichter wurde mit einer Filterkarte auf einen Objektträger gelegt und mithilfe von Klammern zusammengehalten. Die Suspension wurde in den Trichter hineinpipettiert. Durch das Zentrifugieren in der Cytospin-Zentrifuge für 5 min bei 600 rpm wurden die Zellen auf den Objektträger aufgebracht. Der Objektträger wurde über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag wurden die auf dem Objektträger getrockneten Zellen 10 min bei Raumtemperatur in Methanol fixiert. Im Anschluss wurde DAPI auf die Zellen gegeben und bei Dunkelheit für 5 min angefärbt. Der Objektträger wurde 10 min in PBS gewaschen, dies erfolgte ebenfalls im Dunkeln. Eingedeckelt wurde er schließlich mit einem Tropfen Dako Fluorescent Mounting Medium. Ebenfalls im Dunkeln wurde der Objektträger bei 4 °C getrocknet. Nun konnten die Zellen unter Zuhilfenahme des Programms ZEISS ZEN 3.6 unter dem Fluoreszenzmikroskop Celldiscoverer 7 der Firma Zeiss betrachtet werden.

3.2.13 RNA-Extraktion

Zur späteren PCR-Untersuchung wurde die RNA aus den Zellen isoliert. Hierzu wurde das RNeasy® Mini-Kit von Qiagen benutzt. Es wurde nach Protokoll für 5×10^6 - 1×10^7 Zellen vorgegangen. Bei diesem Verfahren werden die Zellen zunächst durch einen stark denaturierenden Puffer lysiert und homogenisiert. Dies geschieht durch die Inhaltsstoffe Guanidin, Thiocyanat und β -Mercaptoethanol. Der Puffer inaktiviert RNAsen, sodass die Aufreinigung intakter RNA gewährleistet ist. Zusätzlich werden die Zellen im QIAshredder von Qiagen lysiert und homogenisiert. Ethanol wird hinzugefügt und die Lösung auf eine RNeasy Mini-Zentrifugationssäule aufgetragen. Ethanol sorgt für eine gute Bindung der RNA an die RNeasy-Membran. Es können bis zu 100 µg RNA mit mehr als 200 Basen an die Membran gebunden werden. Durch Zentrifugieren und mehrmaliges Waschen werden Verunreinigungen entfernt, während die RNA an der Membran gebunden bleibt. Im letzten Schritt wird die RNA in 50 µl Wasser eluiert. Nach Abschluss des Prozederes wurde die Konzentration

im Spektrometer durch Auftragen von 2 µl RNA bestimmt, nachdem dieses zuerst mit 2 µl RNase-freiem Wasser als Referenz genormt wurde. Die RNA wurde bei - 70 °C aufbewahrt.

3.2.14 Umschreiben in cDNA

Als nächster Schritt folgte das Umschreiben in komplementäre DNA (cDNA) durch das Prinzip der Reversen Transkription. Verwendet wurde hierfür das SuperScript™ III Reverse Transcriptase-Kit von Invitrogen. Als Template wurde die isolierte RNA eingesetzt. Random Primers binden an zufällige RNA-Abschnitte. Die Reverse Transkriptase lagert sich an die Random Primers an und synthetisiert den komplementären DNA-Strang. Für das Umschreiben von jeweils 2 - 2,5 µg RNA wurde wie folgt vorgegangen:

1 µl	RandomPrimers
1 µl	dNTP Mix (dATP, dGTP, dCTP und dTTP je 10 mM bei neutralem pH)
x µl	RNA (die für 2 - 2,5 µg RNA errechnete Menge)
x µl	RNase-freies H ₂ O (ad 14µl)

Diese Lösung wurde für 5 min bei 65 °C inkubiert. Hierbei entfaltet sich die RNA, damit sich die Random Primer anlagern können. Anschließend wurde die Lösung mindestens 1 min auf Eis gestellt und 5 s zentrifugiert. Hinzugefügt wurden:

4 µl	5 x First-Strand Buffer
1 µl	0,1 M DTT
1 µl	SuperScript™ III RT (200 units/µl)

An der PCR-Maschine wurde folgendes Programm eingestellt:

Anlagerung Random Primers	25 °C	5 min
Reverse Transkription	50 °C	45 min
Inaktivierung	70 °C	15 min

Die umgeschriebene cDNA wurde bei - 20 °C aufbewahrt.

3.2.15 Quantitative Real-time-PCR

Bei der PCR werden spezifische DNA-Abschnitte aus einer kleinen Menge Ausgangs-DNA vervielfältigt. Hierzu wird die DNA zuerst durch Lösen der Wasserstoffbrückenbindungen bei 95 °C denaturiert, wodurch aus einem DNA-Doppelstrang 2 Einzelstränge entstehen. Beim Annealing lagern sich zugegebene Primer aus bekannter DNA-Sequenz an die Einzelstränge an. Die Temperatur ist abhängig von verwendeten Primer-Paaren, liegt jedoch im Normalfall zwischen 50 °C und 65 °C. Im Elongationsschritt bei 72 °C lagert die Taq-Polymerase die komplementären Nucleotide an, wodurch wieder doppelsträngige DNA entsteht. In der hier durchgeführten quantitativen PCR wird die Menge der neu synthetisierten DNA in Echtzeit beobachtet. Dafür wurde das LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I-Kit verwendet und nach dessen Protokoll vorgegangen. Zur Überwachung der synthetisierten PCR-Produkt-Menge wird der Farbstoff SYBR Green I benutzt. Er interkaliert in die DNA-Doppelhelix. Während der Elongation binden immer mehr Farbstoffmoleküle an die neu synthetisierte DNA. Sobald diese an der DNA binden, wird die Fluoreszenz (Wellenlänge 530 nm) verstärkt. Eine Fluoreszenzmessung findet nach jedem Elongationsschritt statt. So kann die Menge der amplifizierten DNA durch Messung des Fluoreszenzsignals in Echtzeit nachgewiesen werden. In der folgenden Schmelzkurvenanalyse wird das Reaktionsgemisch auf 95 °C erhitzt. Dies führt zum Schmelzen der doppelsträngigen DNA und damit zur Abnahme der Fluoreszenz. Diese Abnahme wird wiederum gemessen und als Schmelzpeaks angezeigt. Jeder Schmelzpeak repräsentiert die charakteristische Schmelztemperatur (T_m) eines bestimmten PCR-Produktes. Ein Ansatz bestand aus:

7,1 µl	H ₂ O (PCR-grade)
1 µl	FastStart
0,4 µl	Mg ²⁺
0,25 µl	forward Primer [10 µM]
0,25 µl	reverse Primer [10 µM]

Diese 9 µl wurden in ein Well einer 9-Well-PCR-Platte pipettiert und je 1 µl cDNA hinzugefügt. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle mitbestimmt. Diese bestand aus obigem Ansatz ohne cDNA. Von allen Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

An der PCR-Maschine wurde folgendes Programm eingestellt:

Reaktion	Temperatur	Dauer
Denaturierung	95 °C	10 min
Denaturierung	95 °C	10 s
Annealing	60 °C	10 s
Elongation	72 °C	30 s
		} 40 Zyklen
Schmelzkurven-analyse	95 °C	10 s
	65 °C - 95 °C in 0,5°C-Schritten	Schritt à 5 s

3.2.16 Auswertung der RT-PCR-Daten und -Produkte

Zur Auswertung und graphischen Darstellung der Genexpressionen wurde das Programm CFX Maestro von Bio-Rad benutzt. Hierbei wurden folgende Formeln angewandt:

Effizienz E

$$E = 10^{(-1/\text{slope})}$$

slope: Steigung der von der Standardkurve abgeleiteten Linie

Die Effizienz der Reaktion beschreibt, welche Menge des PCR-Produktes in jedem Zyklus synthetisiert wird. Eine Effizienz von 100 % würde bedeuten, dass sich die Menge des Produkts in jedem Zyklus verdoppelt. Während des RT-PCR-Laufs wird die Effizienz für jede Probe automatisch vom CFX-Maestro-Programm anhand der Steigung der von der Standardkurve abgeleiteten Linie bemessen und aufgezeichnet.

Mean Cq (Cycle quantification)

$$Cq_{\text{Mean}} = \frac{(Cq_1 + Cq_2 + \dots + Cq_n)}{n}$$

Der Cq-Wert beschreibt die Anzahl der Zyklen, die benötigt werden, um einen Grenzwert im Fluoreszenzsignal der amplifizierten DNA zu überschreiten und somit Produkte nachzuweisen.

Standardabweichung SD

$$SD = \sqrt{\frac{(M - x_1)^2 + (M_2 - x_2)^2 + \dots + (M_n - x_n)^2}{n}}$$

M: Mittelwert

x_1 : Messwert 1

Die Standardabweichung ist ein Maß für die Streuung der Messwerte rund um den Mittelwert.

Relative Quantität RQ bzw. ΔCq

$$\Delta Cq_{\text{sample(GOI)}} = E_{\text{GOI}}(Cq(\text{MIN}) - Cq(\text{sample}))$$

GOI: Gene of interest

$Cq(\text{MIN})$: Cq-Mittelwert einer Probe mit dem niedrigsten Cq-Mittelwert von GOI

$Cq(\text{sample})$: Cq-Mittelwert der auszuwertenden Probe (GOI)

Die Daten der Relativen Quantität ΔCq sind nicht normalisiert. Diese Methode wird zur Quantifizierung von Proben verwendet, die keine Referenzgene enthalten. Die relative Quantität ΔCq ist die Konzentration eines Targets im Verhältnis zu einem anderen Target.

Relative Quantität RQ bzw. ΔCq mit Kontrollprobe

$$\Delta Cq_{\text{sample(GOI)}} = E_{\text{GOI}}(Cq(\text{control}) - Cq(\text{sample}))$$

$Cq(\text{control})$: Cq-Mittelwert der Kontrollprobe

Die relative Quantität ΔCq ist die Konzentration eines Targets im Verhältnis zum gleichen Target einer Kontrollprobe.

Standardabweichung der Relativen Quantität ΔCq

$$SD \Delta Cq = SD Cq_{\text{GOI}} \times \Delta Cq_{\text{sample(GOI)}} \times \ln(E_{\text{GOI}})$$

Normalized Expression $\Delta \Delta Cq$

$$\Delta \Delta Cq_{\text{sample(GOI)}} = \frac{\Delta Cq_{\text{sample(GOI)}}}{(\Delta Cq_{\text{sample(Ref1)}} \times \Delta Cq_{\text{sample(Ref2)}} \times \dots \times \Delta Cq_{\text{sample(Ref n)}})^{1/n}}$$

Ref: Referenzgen

n: Anzahl der Referenzgene

Die Normalized Expression $\Delta\Delta Cq$ ist die relative Menge des Targetgens, normalisiert gegen die Menge des Referenzgens, in unserem Fall β -Aktin.

Normalized Expression $\Delta\Delta Cq$ mit Kontrolle (Relative Normalized Expression RNE)

Wenn eine Kontrollprobe gewählt wird, wird das Expressionslevel $\Delta\Delta Cq$ der Kontrollprobe auf 1 gesetzt. Das Expressionslevel $\Delta\Delta Cq$ des GOI wird gegen das Expressionslevel der Kontrolle normalisiert und so das Verhältnis berechnet.

Standardabweichung für die Normalized Expression $\Delta\Delta Cq$

$$SD \Delta\Delta Cq_n = \Delta\Delta Cq_n \times \sqrt{\left(\frac{SD \Delta Cq_{sample(Ref1)}}{n \times \Delta Cq_{sample(Ref1)}}\right)^2 + \left(\frac{SD \Delta Cq_{sample(Ref2)}}{n \times \Delta Cq_{sample(Ref2)}}\right)^2 + \dots + \left(\frac{SD \Delta Cq_{sample(Refn)}}{n \times \Delta Cq_{sample(Refn)}}\right)^2}$$

Standardabweichung für die Normalized Expression $\Delta\Delta Cq$ mit Kontrolle (RNE)

$$SD RNE_{sample(GOI)} = RNE_{sample(GOI)} \times \sqrt{\left(\frac{SD \Delta\Delta Cq_{sample}}{\Delta\Delta Cq_{sample}}\right)^2 + \left(\frac{SD \Delta Cq_{sample(GOI)}}{\Delta Cq_{sample(GOI)}}\right)^2}$$

3.2.17 Mykoplasmen-PCR

Um eine Kontamination der Zellkulturen mit Mykoplasmen auszuschließen, wurden Mykoplasmen-PCRs durchgeführt. Verwendet wurde hierfür das Venor GeM Classic-Kit von Minerva Biolabs und nach dessen Protokoll vorgegangen.

Bei dieser PCR wird Mykoplasmen-DNA durch Amplifizierung einer für sie hochspezifischen Sequenz detektiert, während eukaryotische oder andere bakterielle DNA nicht amplifiziert wird. Die Größe des PCR-Produktes beträgt zwischen 265 und 278 bp. Das Kit beinhaltet eine interne Kontrolle der Größe 191 bp und eine positive Kontroll-DNA. Benutzt wurde das Medium kurz vor dem Splitten der Zellen. Das Medium mit Zellen wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt, 3 min bei 1.200 rpm abzentrifugiert und der Überstand entnommen. Dieser wurde für 5 min bei 95 °C inkubiert und im Anschluss 15 s bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert.

Ein PCR-Ansatz bestand aus:

7,65 µl	H ₂ O (PCR-grade)
1,35 µl	10 x Puffer
1,25 µl	Primer/Nukleotide
0,1 µl	Interne Kontrolle
1,25 µl	Taq-Polymerase (5 U/ µl)

Dieser Ansatz wurde in PCR-Gefäße pipettiert und 1 µl des behandelten Überstandes hinzugefügt. Von allen Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Negativ- und eine Positivkontrolle mitbestimmt. Das PCR-Programm bestand aus folgenden Schritten:

Reaktion	Temperatur	Dauer
Denaturierung	94 °C	8 min
Denaturierung	94 °C	30 s
Annealing	55 °C	30 s
Elongation	72 °C	30 s
		} 39 Zyklen
Pause	4 °C	

3.2.18 Auftragen Produkte Agarosegel

Zur Überprüfung, ob die in der PCR entstandenen Produkte den gewünschten Produkten entsprechen, wurden diese auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt mithilfe eines elektrischen Feldes. Durch ihre Phosphatgruppen ist die DNA negativ geladen und wandert zur Anode. Da jede Base eines Moleküls eine Phosphatgruppe enthält, entsteht ein proportionales Masse-Ladungsverhältnis. Die DNA-Fragmente werden so entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Je kleiner das Fragment, desto schneller wandert es zur Anode. Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid, der dem Gel zugesetzt ist, bindet an die DNA und kann unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Das Gießen des 2%igen Agarosegels erfolgte wie folgt:

2 g	Agarose
100 ml	1-fach-TAE-Puffer
Zugabe nach Erhitzen:	
100 µl	Ethidiumbromid

Diese Lösung aus Agarose und 1-fach-TAE-Puffer wurde 3 min bei Stufe 1 in der Mikrowelle erwärmt, geschwenkt und im Anschluss nochmals 3 min erwärmt. Die verdunstete Menge wurde

mit A. dest. nachgefüllt. Die quadratische Plastikform wurde am oberen und unteren Rand durch einsteckbare Plastikstreifen geschlossen und zusätzlich mit einigen Tropfen der obigen Lösung abgedichtet. Nachdem die Lösung leicht abgekühlt war, wurden unter dem Abzug 100 µl Ethidiumbromid hinzugefügt und die Lösung in die Form gefüllt. Zur Herstellung der Probestaschen wurden Plastikkämme eingesteckt. Nach etwa 30 min war das Gel ausgehärtet. Plastikberandung und Kämmen wurden entfernt. Zur Benutzung wurde das Gel in eine mit TAE-Puffer befüllte Kammer gelegt. Die aufzutragenden Proben wurden mit je 1 µl Blaumarker versetzt und in die Taschen pipettiert. Zum Ablesen der Fragmentgrößen wurde der GeneRuler DNA Ladder mitlaufen gelassen. Eine Spannung von 100 V wurde angelegt. Nach etwa 1 h wurde das Gel entnommen und unter der UV-Kamera ausgewertet.

4 Ergebnisse

Obwohl in verschiedenen Arbeiten gezeigt wurde, dass bei dauerhaftem NIR-Knockdown Mäuse nicht überlebensfähig sind und auch Zellen einen NIR-Knockdown nicht tolerieren, wurden in AML-Patientenproben Zellen gefunden, die ohne das NIR-Protein überlebensfähig sind [11] [21] [8]. Daher wollten wir mit dieser Arbeit AML-Zelllinien hinsichtlich ihrer NIR-Expression auf Protein- und Transkriptebene untersuchen und herausfinden, welche Zelllinien trotz fehlender NIR-Expression überlebensfähig sind. Aus den Ergebnissen ergaben sich weitere Fragestellungen, wie z. B. die Frage nach einem möglichen Zusammenhang zwischen NIR- und p63-Expression. Da wir NIR-Knockdown-Experimente an AML-Zelllinien durchführen wollten, etablierten wir außerdem ein Protokoll für die Methode der Gymnosis an AML-Zellen.

4.1 Charakterisierung der Zellen

Die untersuchten Zellen zählten zu den AML-Zelllinien. Alle untersuchten Zelllinien stammten ursprünglich aus dem peripheren Blut oder dem Knochenmark verschiedener Patienten mit einer AML-Erkrankung. Da sich die Zellen der Myelopoese im menschlichen Körper physiologisch im Blut befinden, wuchsen auch die untersuchten AML-Zelllinien „schwimmend“ im Kulturmedium, sie waren somit ohne Ausnahme Suspensionszellen.

Für die Interpretation der nachfolgenden Ergebnisse war es wichtig, sich zu vergegenwärtigen, dass es sich zwar bei allen untersuchten Zelllinien um AML-Zelllinien handelte, diese jedoch verschiedenen Differenzierungsgraden entstammten. Sie lassen sich nicht präzise nach ihrem Differenzierungsgrad sortieren. Jedoch lässt sich eine grobe Einteilung nach „weniger differenziert“ und „mehr differenziert“ vornehmen. Im Folgenden ein grobes Differenzierungsschema.

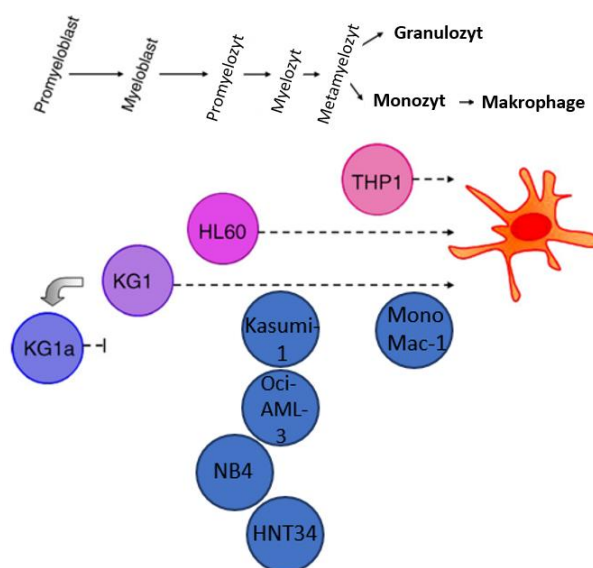


Abb. 4.1: Differenzierungsgrade der AML-Zelllinien. Schema modifiziert nach Hsu *et al.*, 2007 [22].

Die Zellen ließen sich verschiedenen AML-FAB-Klassifikationen zuordnen. So waren der AML mit Ausreifung (FAB M2) HL60- und Kasumi-1-Zellen zugehörig, der Akuten Promyelozytenleukämie (FAB M3) ließen sich NB4-Zellen zuordnen. Zur Akuten myelomonozytären Leukämie (FAB M4) gehörten HNT34- und Oci-AML-Zellen, zur Akuten Monoblastenleukämie (FAB M5) TIB202- und MonoMac1-Zellen. Der Akuten Erythroleukämie (FAB M6) ließen sich KG1A-Zellen zuordnen.

Aufgrund ihrer unterschiedlichen Differenzierung und Eigenschaften wiesen die Zelllinien unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten auf, die im Folgenden graphisch dargestellt wurden.

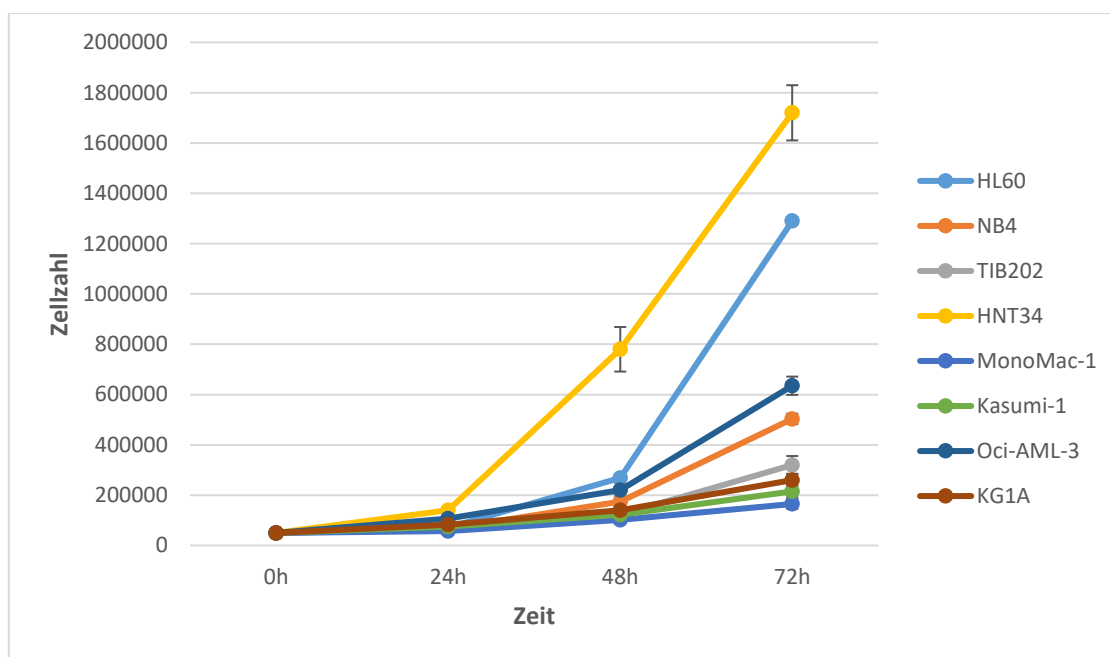


Abb. 4.2: Wachstum der AML-Zelllinien. Nach Ausplattieren von 5×10^4 Zellen in 1 ml Medium pro Well einer 24-Well-Platte wurde die Zellzahl nach 24, 48 und 72 h bestimmt.

Alle Zelllinien wiesen für sich typische Wachstumsgeschwindigkeiten auf. So wuchsen HNT34-Zellen mit einer absoluten Zellzahl von etwa $1,7 \times 10^6$ Zellen nach 72 h am schnellsten, darauf folgten HL60-Zellen mit etwa $1,3 \times 10^6$ Zellen nach 72 h. HNT34- und HL60-Zellen waren die beiden mit Abstand am schnellsten wachsenden Zellen. Es folgten Oci-AML-3- und NB4-Zellen mit etwa 6×10^5 Zellen nach 72 h. In absteigender Reihenfolge bewegten sich TIB202-, KG1A- und Kasumi-1-Zellen im Bereich von $2 - 3,5 \times 10^5$ Zellen nach 72 h. Die langsamste Wachstumsgeschwindigkeit zeigten MonoMac-1-Zellen mit etwa $1,8 \times 3,5 \times 10^5$ Zellen nach 72 h.

Wir wollten vor Beginn unserer Experimente eine Kontaminierung der untersuchten Zelllinien mit Mykoplasmen ausschließen. Diese Bakterien sind ein häufiges Problem in Zellkulturen. Sie

sind auch deshalb so problematisch, weil bei einer Kontamination die in Kultur genommenen Zellen nicht sofort absterben, wie es bei anderen Kontaminationen der Fall sein kann. Auch werden sie nicht durch die üblichen in der Zellkultur eingesetzten Antibiotika, wie etwa Penicillin oder Streptomycin, abgetötet. Sie können den Zellen auf unterschiedliche Weise schaden. Mykoplasmen als Bakterien benötigen beispielsweise Glukose und Nährstoffe zum Stoffwechsel, die sie dem Medium entziehen. Das Kulturmedium hat für die unterschiedlichen Zellen eine bestimmte, möglichst ideale Nährstoff-Zusammensetzung, die durch Mykoplasmen verändert wird. So kann es beispielsweise zu einer Beeinflussung des Zellwachstums und zu veränderten Wachstumseigenschaften kommen. Auch hätte eine Kontamination mit Mykoplasmen unter Umständen zu einer ungewollten Interaktion mit den Zellen führen können. Dies hätte wiederum in einem veränderten Expressionsmuster oder einer Nicht-Wiederholbarkeit der Experimente resultieren können. Daher war es von Bedeutung, vor den Experimenten eine solche Mykoplasmen-Kontamination auszuschließen. Dies geschah mithilfe des Venor® GeM Classic-Kits.

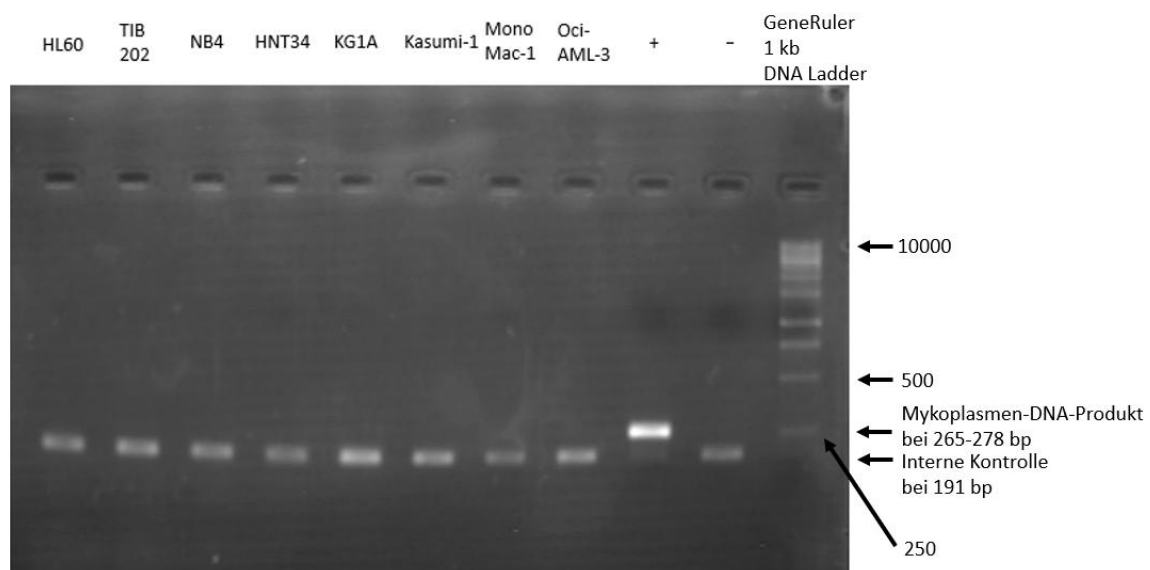


Abb. 4.3: Überprüfung der eingesetzten Zelllinien auf Mykoplasmen-Kontamination. Bei keiner der getesteten Zelllinien war ein Mykoplasmen-PCR-Produkt nachweisbar.

In der durchgeführten PCR zeigte sich bei keiner der untersuchten Zelllinien ein Mykoplasmen-PCR-Produkt, was bedeutete, dass alle Zelllinien frei von Mykoplasmen waren. Durch diesen Nachweis konnte eine ungewollte Interaktion zwischen Zellen und Mykoplasmen ausgeschlossen werden sowie die daraus möglicherweise resultierenden veränderten Wachstumsgeschwindigkeiten oder Ergebnisverfälschungen.

4.2 Genexpression

4.2.1 Genexpression auf Proteinebene

Als nächstes sollten mittels Western Blots die Expressionslevel auf Proteinebene bestimmt werden. Aus den Zellpellets der einzelnen Zelllinien wurden durch Aufreinigung mittels SDS-Lysepuffer Proteinextrakte gewonnen. Es wurden jeweils 15 µg Lysat für die Gelelektrophorese eingesetzt. Die anschließende Inkubation erfolgte mit NIR-AK 2910, p53-AK DO-1, β-Aktin-AK und p63-AK 4A4. Der verwendete p63-Antikörper war gerichtet gegen die Isoform TAp63. Die zweite existente Isoform ΔNp63 wurde hiervon nicht erfasst.

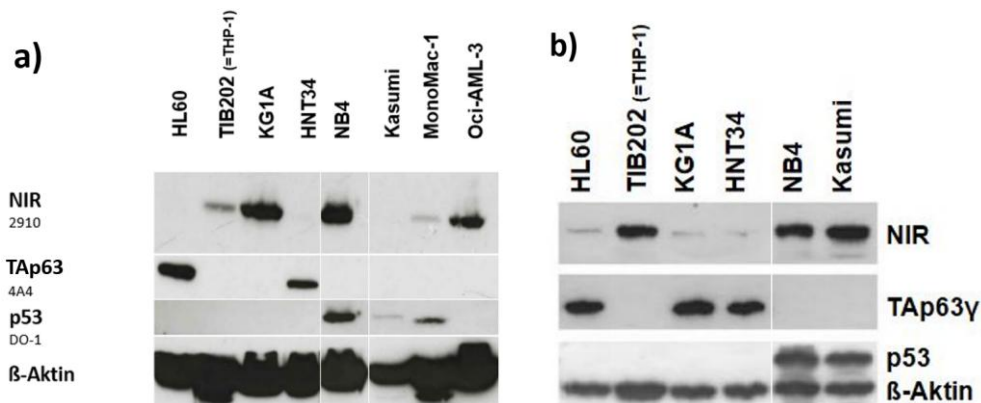


Abb. 4.4: Genexpression aller eingesetzten Zelllinien auf Proteinebene. (a) Es wurden jeweils 15 µg Lysat auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen. Der NIR 2910-anti-rabbit-Antikörper und der TAp63-anti-mouse-Antikörper 4A4 wurden jeweils im Verhältnis 1:1000, der p53 anti-mouse-DO-1-Antikörper im Verhältnis 1:2000 und der β-Aktin-anti-mouse-Antikörper im Verhältnis 1:2000 verdünnt. Die sekundären anti-mouse- und anti-rabbit-Antikörper wurden im Verhältnis 1:3000 verdünnt. (b) Nicht publizierter Western Blot aus AG Römer, José-Carreras-Zentrum, 2008, mit Genehmigung von Klaus Römer. Es wurden ebenfalls 15 µg Lysat aus den angezeigten AML-Zelllinien aufgetragen.

Eine sehr geringe Expression oder gar Abwesenheit des NIR-Proteins zeigte sich bei HL60- und HNT34-Zellen. Die Blots unterstrichen damit die Hypothese, dass entgegen vorheriger Annahme Zellen existieren, die kein NIR exprimieren [8]. Besonders eindrücklich war dies in HL60- und HNT34-Zellen. In beiden Western Blots zeigte sich bei 7 von 8 AML-Zelllinien ein antagonistischer Zusammenhang zwischen NIR- und p63-Expression. Bei Expression von p63 wurde kein bzw. kaum NIR exprimiert und vice versa. Die Proteinexpression in KG1A-Zellen unterschied sich zwischen beiden Blots, das antagonistische Expressionsmuster blieb jedoch erhalten. Somit wurde ebenso die Hypothese bestätigt, dass bei den hier eingesetzten Zelllinien ein antagonistisches Expressionsmuster von NIR und p63 auf Proteinebene existiert. Einzig bei Kasumi-1-Zellen konnte dieses Phänomen im Vergleich zu Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe nicht wiederholt nachgewiesen werden.

Außerdem fiel auf, dass die beiden Zelllinien, welche eine hohe p63- und keine NIR-Expression aufwiesen, nämlich HNT34 und HL60, mit Abstand am schnellsten wuchsen (vgl. Abb. 4.2). Im

Vergleich mit Abb. 4.1 ließ sich kein Zusammenhang zwischen ähnlichen Differenzierungsstadien und NIR- bzw. p63-Proteinexpression zeigen.

4.2.2 Genexpression auf Transkriptebene

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die Proteinexpressions-Daten mit den Genexpressions-Daten auf Transkriptebene übereinstimmen. Hierzu wurde zuerst von jeder Zelllinie durch die Anwendung des RNeasy® Mini-Kits die RNA isoliert und aufgereinigt. Mithilfe des SuperScript™ III Reverse Transkriptase-Kits wurde die RNA durch die Technik der Reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. Für die Analyse der unbehandelten Zellen wurden 2 - 2,5 µg RNA in cDNA umgeschrieben. Durch das LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I - Kit wurde die RT-PCR mit jeweils 1 µl der cDNA durchgeführt.

4.2.2.1 Auswertung der RT-PCR-Daten und -Produkte

Um sicherzustellen, dass es sich bei den synthetisierten RT-PCR-Produkten tatsächlich um die gewünschten Produkte handelte und nicht um z.B. Primerdimere oder unspezifische Produkte, wurden die produktspezifischen Schmelztemperaturen abgeglichen. Außerdem wurden die Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen, um deren Fragmentgröße abzuschätzen.

Zur späteren Berechnung der Normalized Expression $\Delta\Delta Cq$ bestimmter Gene wurde ein Housekeeping-Gen benötigt. Wir wählten hierfür β -Aktin. Da für spätere Expressionsberechnungen die für β -Aktin bestimmten Werte verwendet wurden, musste sichergestellt werden, dass es sich bei den für β -Aktin angezeigten Werten tatsächlich um Werte für β -Aktin-Produkte handelte.

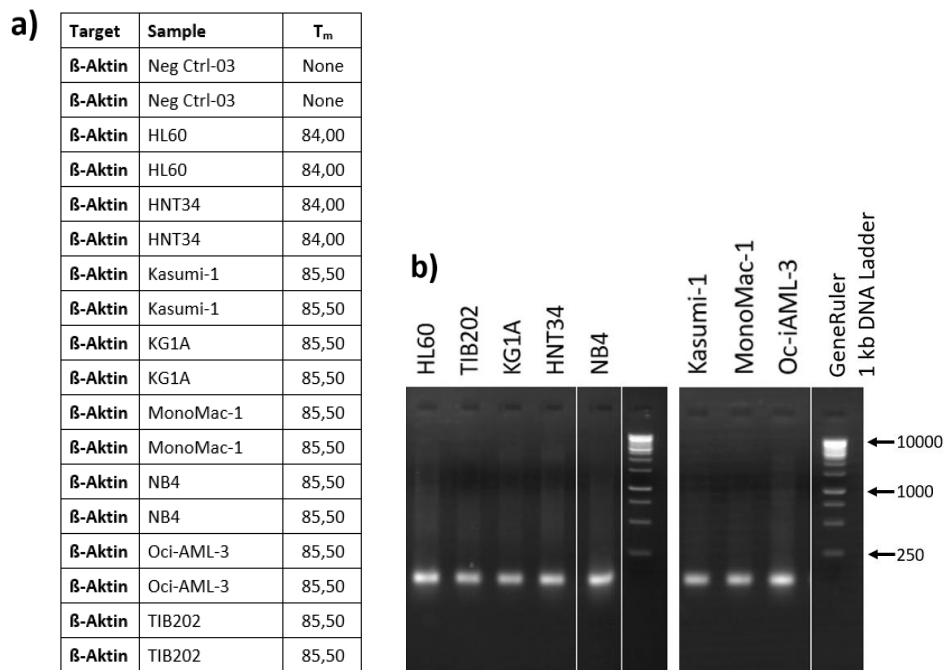


Abb. 4.5: Quantitative RT-PCR-Analysen für das β-Aktin-Gen in verschiedenen AML-Zelllinien. (a) Schmelztemperaturen der β-Aktin-PCR-Amplifikate. **(b)** Auftrennung der β-Aktin-PCR-Amplifikate im Agarosegel.

Target	Sample	Normalized Expression $\Delta\Delta Cq$	Normalized Expression $\Delta\Delta Cq$ SD	Mean Cq	Cq SD
β-Aktin	HL60			18,13	0,03613
β-Aktin	HNT34			17,75	0,10463
β-Aktin	Kasumi-1			16,37	0,13136
β-Aktin	KG1A			15,45	0,23676
β-Aktin	MonoMac-1			15,63	0,09774
β-Aktin	NB4			14,23	0,09211
β-Aktin	Oci-AML-3			14,73	0,00067
β-Aktin	TIB202			13,37	0,01292

Abb. 4.6: Für β-Aktin ermittelte Cq-Werte mit Standardabweichung.

Die Schmelztemperatur T_m von β-Aktin lag bei HL60- und HNT34-cDNA bei 84 °C, bei allen anderen Zelllinien war die T_m mit 85,5 °C etwas höher. Im Agarosegel zeigten die PCR-Amplifikate aller Zelllinien eine Fragmentgröße von etwa 101 bp. Trotz der leicht unterschiedlichen Schmelztemperaturen sprach dies dafür, dass das synthetisierte PCR-Produkt dem gewünschten β-Aktin-Produkt entsprach. Für spätere Expressionsberechnungen wurde somit sichergestellt, dass es sich bei den im CFX-Maestro-Programm für β-Aktin angezeigten Werten tatsächlich um Werte von β-Aktin-Produkten handelte.

4.2.2.2 NIR-Expression auf Transkriptebene

Um herauszufinden, ob bei den zu untersuchenden AML-Zellen die NIR-Expression auf Transkriptebene der auf Proteinebene entsprach, wurden RT-PCRs mit den cDNAs der Zelllinien vorgenommen.

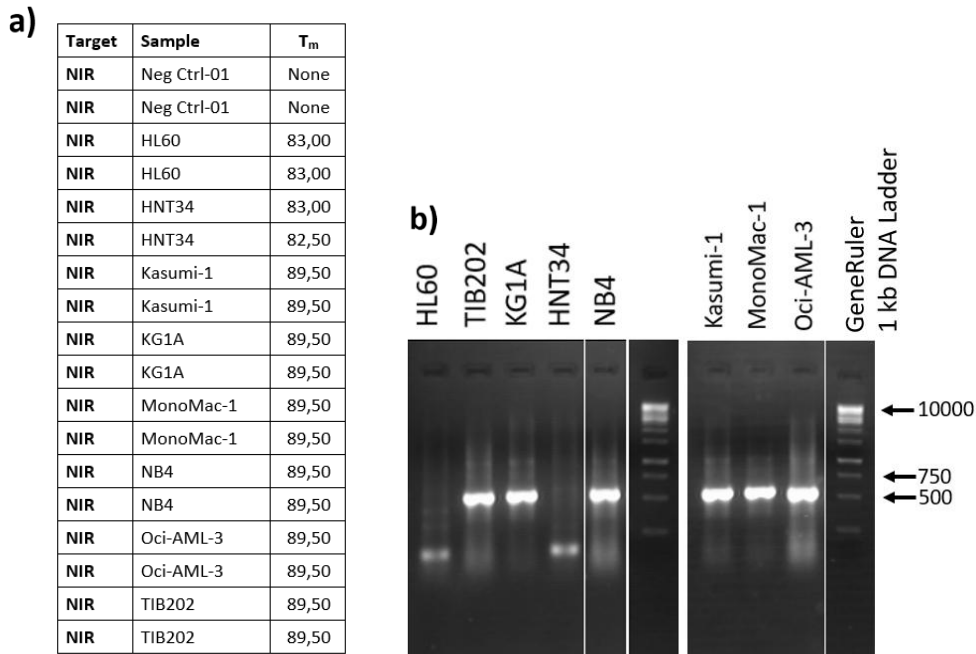
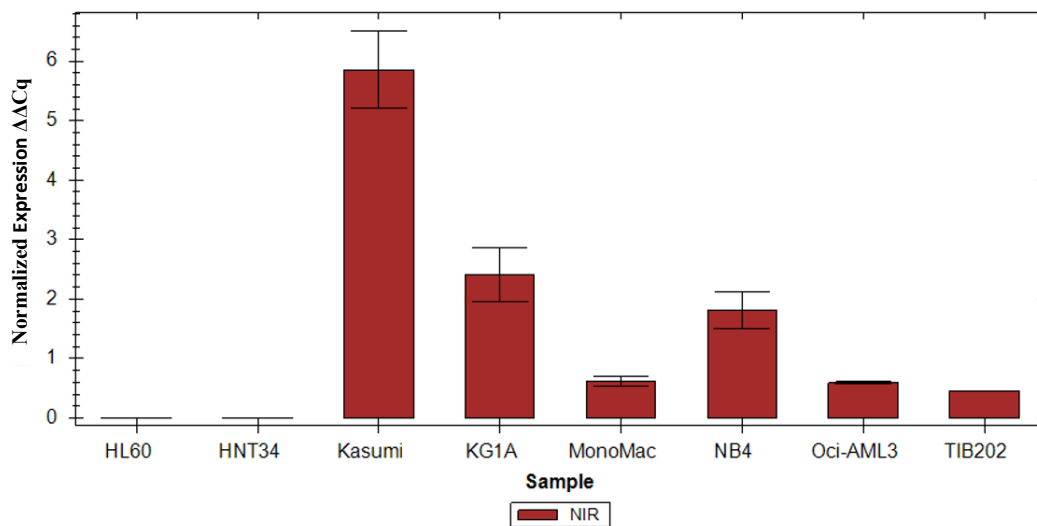


Abb. 4.7: Quantitative RT-PCR-Analysen für das NIR-Gen in verschiedenen AML-Zelllinien. (a) Schmelztemperaturen der NIR-PCR-Amplifikate. **(b)** Auftrennung der NIR-PCR-Amplifikate im Agarosegel.

Die Schmelztemperatur von NIR lag bei 89,5 °C. Die Produkte der HL60- und HNT34-Proben lagen mit 82,5 - 83 °C nicht im Bereich dieser Schmelztemperatur, bereits ein Anzeichen, dass es sich hier nicht um NIR-Amplifikate handelte. Im Agarosegel hatte das NIR-PCR-Amplifikat eine Fragmentgröße von 460 bp. Dies traf für alle Zelllinien mit Ausnahme von HL60 und HNT34 zu. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei den PCR-Produkten von HL60- und HNT34-Zellen nicht um NIR-cDNA handelte.



Target	Sample	Normalized Expression ΔΔCq	Normalized Expression ΔΔCq SD	Mean Cq	Cq SD
NIR	HL60	0,00335	0,00068	32,43	0,28989
NIR	HNT34	0,00580	0,00155	31,26	0,37207
NIR	Kasumi-1	5,85875	0,64331	19,90	0,08854
NIR	KG1A	2,40802	0,44681	20,26	0,12491
NIR	MonoMac-1	0,62366	0,08121	22,39	0,16044
NIR	NB4	1,81415	0,31133	19,45	0,22982
NIR	Oci-AML3	0,59328	0,01609	21,56	0,03912
NIR	TIB202	0,45294	0,00434	20,60	0,00491

Abb. 4.8: NIR-Expression auf Transkriptebene.

Die bei HL60- und HNT34-Zellen hohen Cq-Werte von über 30 waren mit unspezifischen Produkten vereinbar (vgl. auch Abb. 4.7). Somit exprimierten mit HL60- und HNT34-Zellen zwei Zelllinien, wie bereits im Western Blot (s. Abb. 4.4) gezeigt, auch auf Transkriptebene kein NIR. Dieses Ergebnis bestätigte erneut die Hypothese, dass Zellen existieren, die eine NIR-Abwesenheit tolerieren. Alle anderen Zelllinien zeigten unterschiedliche $\Delta\Delta Cq$ -Werten mit unterschiedlich starker NIR-Expression. Bei Kasumi-1-Zellen zeigte sich bei einem $\Delta\Delta Cq$ -Wert von 5,85875, der den höchsten Wert unter allen untersuchten Zelllinien darstellte, eine starke NIR-Expression auf Transkriptebene. Dies stellte eine Diskrepanz dar zur einmalig auf Proteinebene nicht vorhandenen NIR-Expression (s. Abb. 4.4). Bei allen anderen Zelllinien stimmten Expression auf Transkript- und Proteinebene überein. Zusammenfassend zeigten 7 von 8 AML-Zelllinien auf Transkriptebene das gleiche NIR-Expressionsmuster wie auf Proteinebene (s. Abb. 4.4).

4.2.2.3 p63-Expression auf Transkriptebene

Mit identischer Fragestellung nach gleicher p63-Expression auf Transkript- wie auf Proteinebene wurde nun die p63-Expression in der RT-PCR untersucht.

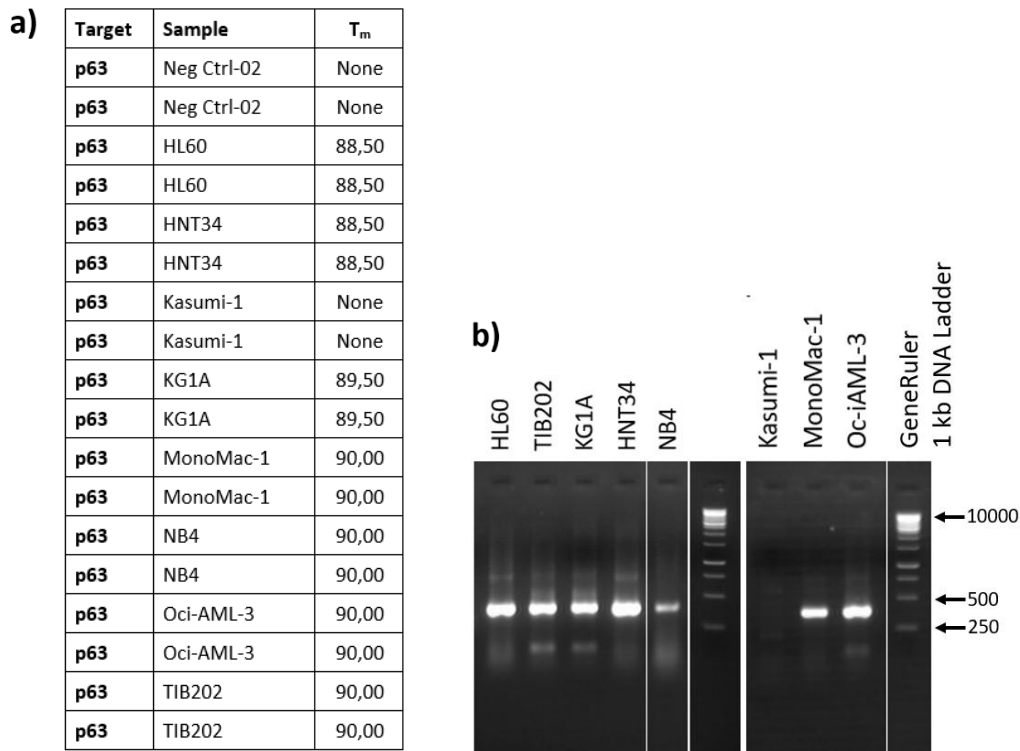
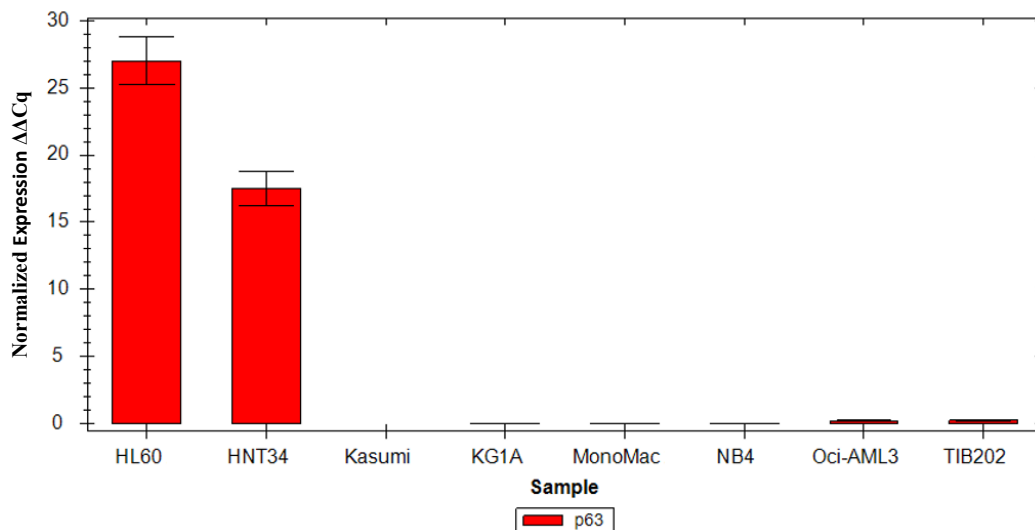


Abb. 4.9: Quantitative RT-PCR-Analysen für das p63-Gen in verschiedenen AML-Zelllinien. (a) Schmelztemperaturen der p63-PCR-Amplifikate. **(b)** Auftrennung der p63-PCR-Amplifikate im Agarosegel.

Die Schmelztemperatur von p63 lag bei HL60- und HNT34-Zellen bei 88,5 °C. Diese beiden Zelllinien zeigten auch eine besonders starke Bande beim p63-Protein. Die Schmelztemperatur der Produkte der anderen Zelllinien lag mit 89,5 - 90 °C etwas darüber. Im Agarosegel zeigten die PCR-Produkte eine Fragmentgröße von etwa 375 bp, was auch bei TIB202-, KG1A-, MonoMac-1-, Kasumi-1- und NB4-Zellen für das Vorhandensein von p63-Produkten sprach. Einzig Kasumi-1-Zellen zeigten keinerlei synthetisierte p63-Produkte.



Target	Sample	Normalized Expression $\Delta\Delta Cq$	Normalized Expression $\Delta\Delta Cq$ SD	Mean Cq	Cq SD
p63	HL60	27,02421	1,76329	23,35	0,08692
p63	HNT34	17,52904	1,29372	23,59	0,01977
p63	Kasumi-1				0,00000
p63	KG1A	0,01397	0,00387	31,58	0,32159
p63	MonoMac-1	0,00955	0,00287	32,31	0,42186
p63	NB4	0,00021	0,00008	36,43	0,52637
p63	Oci-AML3	0,21546	0,01238	26,92	0,08287
p63	TIB202	0,24170	0,01611	25,40	0,09528

Abb. 4.10: p63-Expression auf Transkriptebene.

Bei HL60- und HNT34-Zellen zeigten sich mit $\Delta\Delta Cq$ -Werten von etwa 27,02421 und 17,52904 besonders hohe Expressionslevel des p63-Gens. Dass diese beiden Zelllinien auch auf Transkriptebene viel p63 exprimierten, stimmte mit den Ergebnissen des Western Blots (s. Abb. 4.4) überein. Oci-AML-3- und TIB202-Zellen zeigten mit Expressionswerten von unter 0,25 eine sehr schwache p63-Expression, was im Vergleich zur hohen p63-Expression von HL60 weniger als 1 % darstellte. Alle anderen Zelllinien exprimierten p63 in nur sehr geringem Maße, Kasumi-1-Zellen überhaupt nicht. Auch diese Ergebnisse aller anderen Zelllinien mit im Vergleich sehr geringen oder bei Kasumi-1-Zellen nicht nachweisbaren p63-Expressionslevel entsprachen den Ergebnissen des Western Blots. Somit stimmte die p63-Expression auf Transkriptebene bei allen untersuchten AML-Zelllinien mit der auf Proteinebene überein (s. Abb. 4.4).

4.2.2.4 Zusammenfassung der Genexpression auf Transkriptebene

Es lässt sich konstatieren, dass der auf Proteinebene dargestellte antagonistische Zusammenhang zwischen NIR und p63 auch auf Transkriptebene nachweisbar war und die p63-NIR-Antikorrelation auf Gen- und nicht auf Proteinebene reguliert ist.

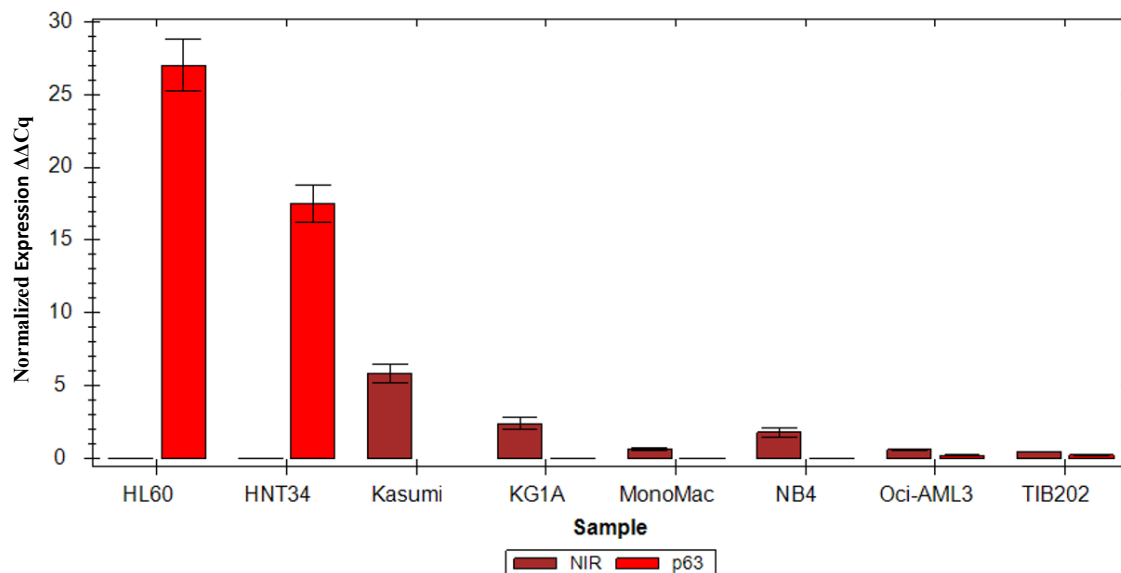


Abb. 4.11: Der antagonistische Zusammenhang zwischen NIR und p63 ist auf Transkriptebene lokalisiert.

Mit HL60- und HNT34-Zellen existieren entgegen vorheriger Annahmen [8] Zellen, die kein NIR-Protein exprimieren. Alle getesteten AML-Zelllinien zeigten zudem in unterschiedlicher Ausprägung eine p63-NIR-Antikorrelation auf Transkriptebene, sprich, bei starker NIR-Expression ist keine oder nur eine geringe p63-Expression vorhanden und umgekehrt. Somit lässt sich in Zusammenschau mit den Ergebnissen aus Abb. 4.4 sagen, dass dieser antagonistische Zusammenhang zwischen NIR und p63 bereits auf Transkriptebene lokalisiert ist. Dies gilt insbesondere für die Zelllinie Kasumi-1, die dieses Expressionsmuster einmalig auf Proteinebene nicht zeigte. Der Zusammenhang auf Transkriptebene konnte jedoch dargestellt werden.

4.3 Transfektionsexperimente

Nachdem wir herausgefunden hatten, dass in AML-Zelllinien intrinsisch ein antagonistischer Zusammenhang zwischen p63- und NIR-Expression existiert, wollten wir in weiteren Knockdown-Experimenten herausfinden, ob es auch bei einem artifiziell herbeigeführten Knockdown von NIR- oder p63 in AML-Zellen zu einem messbaren Effekt auf die Expression des jeweils anderen Gens kommt. Uns war jedoch bewusst, dass es zu Schwierigkeiten beim Herbeiführen eines Knockdowns kommen könnte, da die untersuchten AML-Zelllinien zu den Suspensionszellen gehörten. Es ist bekannt, dass Suspensionszellen mittels herkömmlicher Methoden, wie Lipofektion oder Elektroporation, nur schwierig zu transfizieren sind. Um später

Knockdown-Versuche an AML-Zelllinien durchführen zu können, versuchten wir daher, eine Methode hierfür zu etablieren. Wir entschieden uns, die nachfolgenden Etablierungs-Experimente nur mit einigen robust wachsenden Zelllinien fortzuführen.

	NIR-Expression	p63-Expression
HL60	keine	stark
NB4	stark	kaum nachweisbar
TIB202	schwach	sehr schwach

Abb. 4.12: NIR- bzw. p63-Genexpression der für Etablierungsexperimente verwendeten Zelllinien auf Transkriptebene.

Diese 3 Zelllinien wurden aufgrund ihres guten Wachstums und ihres unterschiedlichen Expressionsmusters gewählt, sodass wir von jedem Expressionstyp exemplarisch eine Zelllinie für weitere Experimente auswählten.

4.3.1 Ermittlung der Transfektionseffizienzen von fluoreszenzgekoppelter siRNA in AML-Zelllinien nach Lipofektion

Um bereits vor dem eigentlichen Transfektions-Experiment mit NIR-spezifischer siRNA abzuklären, ob die Transfektion in den entsprechenden AML-Zelllinien erfolgsversprechend ist, wurde die Transfektionseffizienz mit Hilfe einer Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelter siRNA bei den betreffenden Zelllinien überprüft. Nur in Zellen, in denen eine hohe Transfektionseffizienz mit farbstoffgekoppelten Alexa488-Kontroll-siRNA erreicht wurde, war später ein nachweisbarer spezifischer Protein-Knockdown zu erwarten. Bei nur geringer Effizienz und damit kleiner Anzahl erfolgreich behandelter Zellen wäre eine spätere Proteinreduktion vor dem Hintergrund vieler unveränderter Zellen mit für sie üblicher Proteinmenge kaum sichtbar gewesen.

Somit waren die FACS-Untersuchungen wichtiger Bestandteil der Etablierung. Hierbei wurden die Zellen – wie in Kapitel 3.2.8 beschrieben – mit Alexa488-gekoppelter Kontroll-siRNA und X-tremeGENE-siRNA-Transfektionsreagenz behandelt. Die Transfektionseffizienz wurde nach 5 h Inkubation bestimmt. Als Referenz dienten jeweils Zellen, die unter gleichen Bedingungen mit Kontroll-siRNA, welche nicht an einen Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt war, behandelt wurden.

Um sicherzugehen, dass die Alexa-488-gekoppelten siRNAs nicht nur extrazellulär an der Zelle haften, sondern tatsächlich die Zellmembran durchdrungen hatten und intrazellulär vorlagen, wurden 2 zusätzliche Waschschrte mit PBS-Puffer durchgeführt.

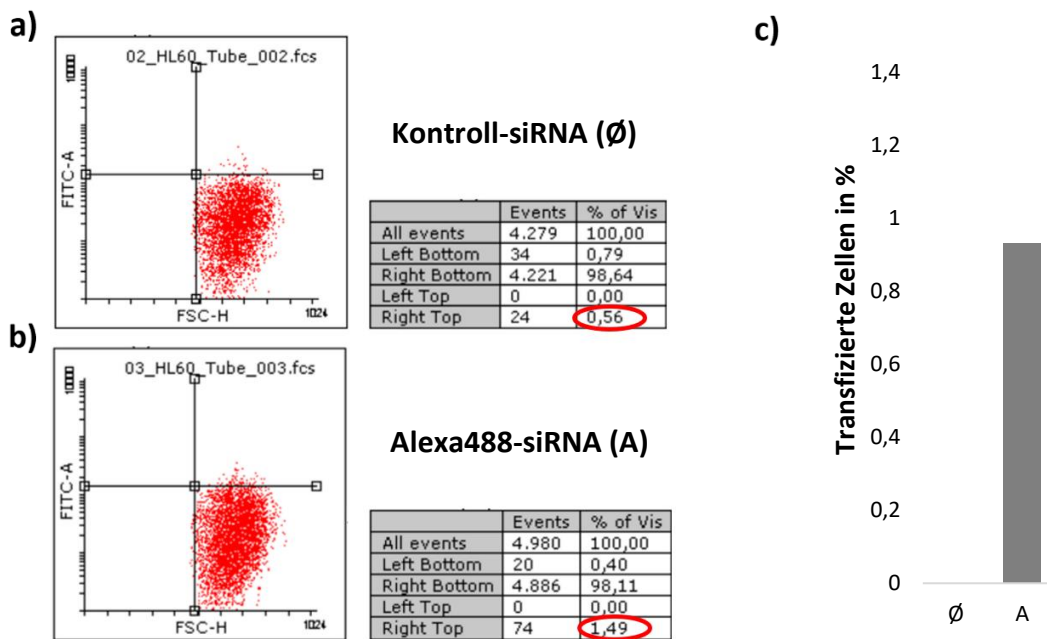


Abb. 4.13: Transfektionseffizienz bei TIB202-Zellen. 5×10^4 Zellen wurden in 0,45 ml serumfreiem RPMI in 24-Well-Platten mit 2 μ l (0,3 μ g/ μ l) **(a)** Negativ-Kontroll-siRNA (\emptyset) oder **(b)** Alexa488-gekoppelter siRNA (A) behandelt. Nach 5 h wurde die Transfektionseffizienz mithilfe einer FACS-Analyse untersucht. **(c)** Transfizierte Zellen in Prozent.

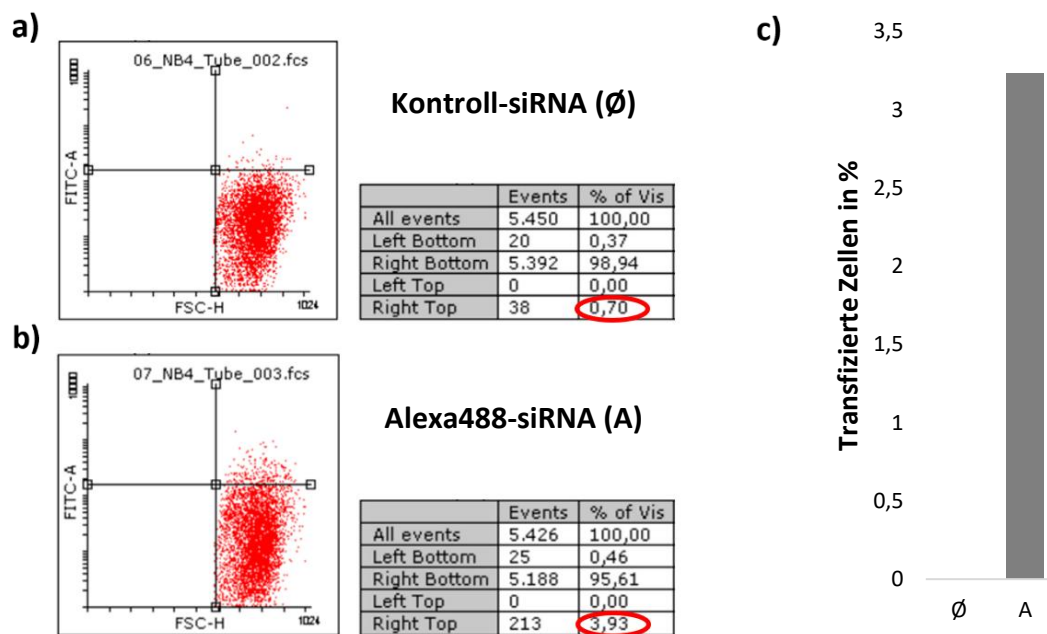


Abb. 4.14: Transfektionseffizienz bei NB4-Zellen. 5×10^4 Zellen wurden in 0,45 ml serumfreiem RPMI in 24-Well-Platten mit 2 μ l (0,3 μ g/ μ l) **(a)** Negativ-Kontroll-siRNA (\emptyset) oder **(b)** Alexa488-gekoppelter siRNA (A) behandelt. Nach 5 h wurde die Transfektionseffizienz mithilfe einer FACS-Analyse untersucht. **(c)** Transfizierte Zellen in Prozent.

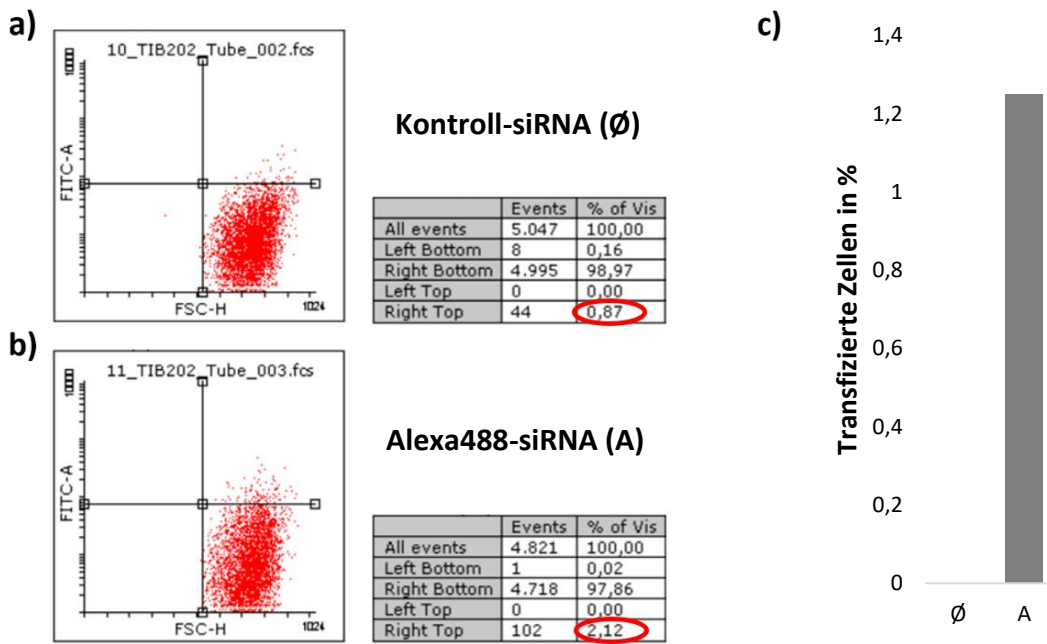


Abb. 4.15: Transfektionseffizienz bei TIB202-Zellen. 5×10^4 Zellen wurden in 0,45 ml serumfreiem RPMI in 24-Well-Platten mit $2 \mu\text{l}$ ($0,3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) **(a)** Negativ-Kontroll-siRNA (\emptyset) oder **(b)** Alexa488-gekoppelter siRNA (A) behandelt. Nach 5 h wurde die Transfektionseffizienz mithilfe einer FACS-Analyse untersucht. **(c)** Transfizierte Zellen in Prozent.

Bei diesen geringen Transfektionseffizienzen zwischen etwa 1 % und 4 % wäre eine Proteinreduktion vor dem Hintergrund vieler unveränderter Zellen mit der für sie üblichen Proteinmenge nicht sichtbar gewesen. Somit erwies sich die Methode der Lipofektion in den untersuchten HL60, TIB202- und NB4-Zellen als nicht erfolgsversprechend.

4.3.2 NIR-Knockdown in AML-Zelllinien nach Lipofektion

Um zu untersuchen, ob trotz der geringen Transfektionseffizienzen ein NIR-Knockdown auf Proteinebene detektierbar ist, wurden probeweise HL60- und NB4-Zellen transient mit gegen NIR gerichteter siRNA transfiziert. Die Zellen wurden, wie in Kap. 3.2.8 beschrieben, behandelt. Wir wählten diese beide Zelllinien aufgrund ihres unterschiedlichen Expressionsmusters (s. Abb. 4.4).

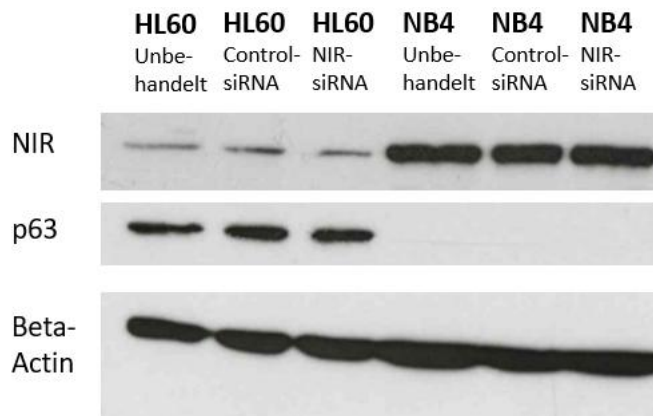


Abb. 4.16: NIR-Knockdown bei NIR-siRNA-behandelten HL60- und NB4-Zellen führt nicht zu verminderter NIR-Protein-Expression. 6×10^5 Zellen wurden in einer 6cm-Schale in 1,5 ml serumfreiem Medium ausplattiert und mit 30 μ l X-tremeGENE siRNA Transfektionsreagenz und 54 μ l (0,3 μ g/ μ l) NIR-siRNA oder Negativ-Kontroll-siRNA behandelt.

Wie zu erwarten kam es nach 72 h zu keinem NIR-Knockdown auf Proteinebene.

4.3.3 Ermittlung der Transfektionseffizienz fluoreszenzgekoppelter siRNA in AML-Zellen mittels Elektroporation

Aufgrund der ungenügenden Transfektionseffizienz mittels Lipofektion durch das X-tremeGENE siRNA-Transfektionsreagenz wandten wir nun die Elektroporation an. Hierbei wurden die Zellen – wie in Kapitel 3.2.9 beschrieben – mit Alexa488-gekoppelten Kontroll-siRNA behandelt, mithilfe des Jurkat- bzw. des HL60-Programmes elektroporiert und ihre Absorptionsrate nach 24 und 48 h bestimmt. Als Referenz dienten jeweils Zellen, die unbehandelt elektroporiert wurden.

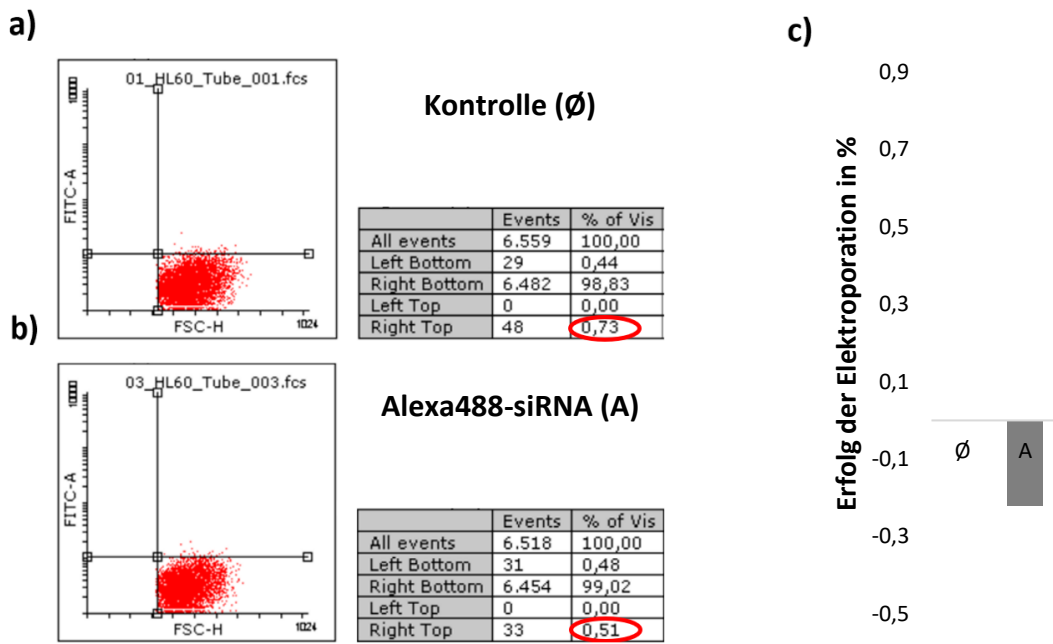


Abb. 4.17: Transfektionseffizienz von fluoreszenzgekoppelter siRNA in HL60-Zellen nach Elektroporation. Je 2×10^6 Zellen wurden elektroporiert. Dies erfolgte an (a) als Kontrolle (\emptyset) unbehandelten Zellen und an (b) mit $10 \mu\text{g}$ Alexa488-siRNA (A) behandelten Zellen. Nach je 24 und 48 h wurde die Transfektionsrate mithilfe einer FACS-Analyse untersucht. Hier wurden exemplarisch nur die Ergebnisse nach 48 h gezeigt, da sie sich nur marginal von denen nach 24 h unterschieden. (c) Erfolgreich elektroporierte Zellen in Prozent.

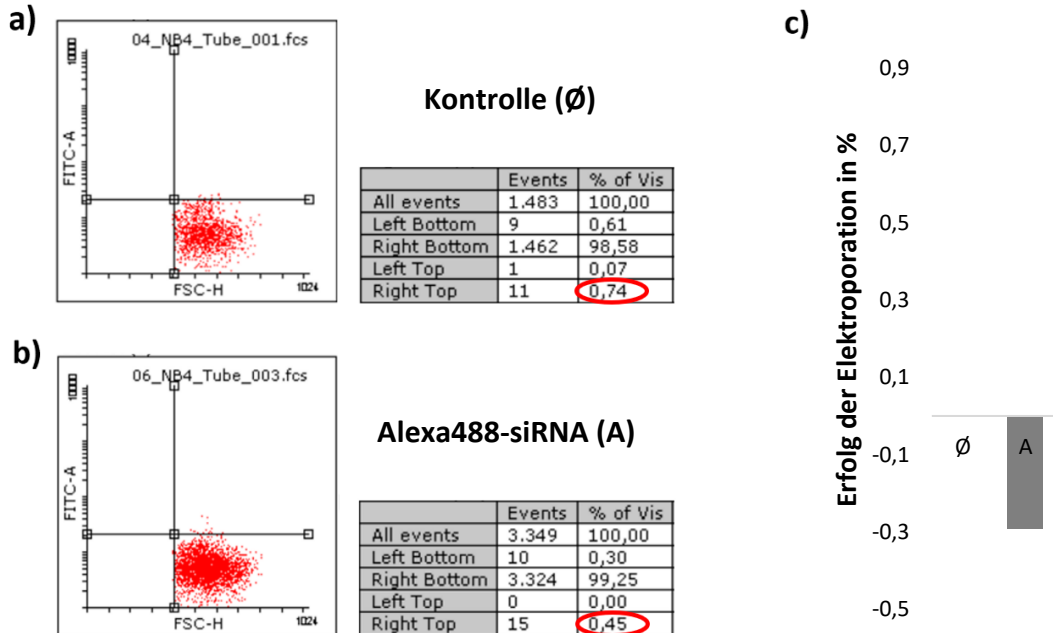


Abb. 4.18: Transfektionseffizienz von fluoreszenzgekoppelter siRNA in NB4-Zellen nach Elektroporation. Je 2×10^6 Zellen wurden elektroporiert. Dies erfolgte an (a) als Kontrolle (\emptyset) unbehandelten Zellen und an (b) mit $10 \mu\text{g}$ Alexa488-siRNA (A) behandelten Zellen. Nach je 24 und 48 h wurde die Transfektionsrate mithilfe einer FACS-Analyse untersucht. Hier wurden exemplarisch nur die Ergebnisse nach 48 h gezeigt, da sie sich nur marginal von denen nach 24 h unterschieden. (c) Erfolgreich elektroporierte Zellen in Prozent.

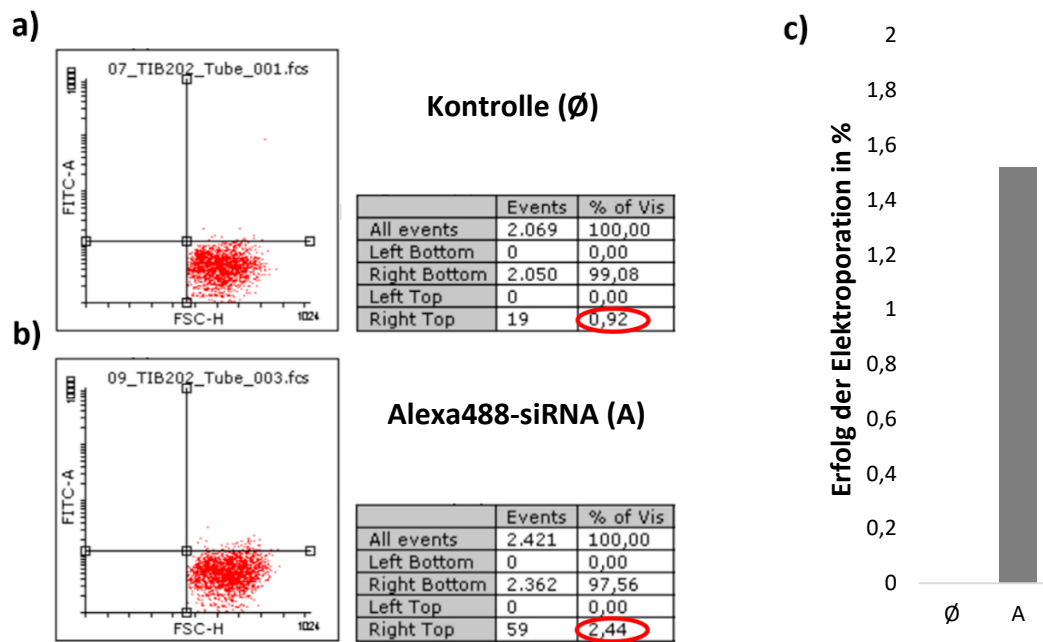


Abb. 4.19: Transfektionseffizienz von fluoreszenzgekoppelter siRNA in TIB202-Zellen nach Elektroporation. Je 2×10^6 Zellen wurden elektroporiert. Dies erfolgte an **(a)** als Kontrolle (\emptyset) unbehandelten Zellen und an **(b)** mit $10 \mu\text{g}$ Alexa488-siRNA (A) behandelten Zellen. Nach je 24 und 48 h wurde die Transfektionsrate mithilfe einer FACS-Analyse untersucht. Hier wurden exemplarisch nur die Ergebnisse nach 48 h gezeigt, da sie sich nur marginal von denen nach 24 h unterschieden. **(c)** Erfolgreich elektroporierte Zellen in Prozent.

Alle Zelllinien wiesen Transfektionseffizienzen von unter 2 % auf. Bei diesen geringen Transfektionseffizienzen wäre auch hier eine Proteinreduktion vor dem Hintergrund vieler unveränderter Zellen mit für sie üblicher Proteinmenge nicht sichtbar gewesen. Somit erwies sich die Methode mittels Elektroporation als nicht erfolgsversprechend.

4.4 Gymnosis mittels GapmeRs

AML-Zellen gelten aufgrund ihrer Eigenschaft als Suspensionszellen als schwer zu transfizierende Zellen, was sich mit den bisherigen Ergebnissen bestätigt hat. Herkömmliche Methoden wie Transfektion und Elektroporation zeigten keine Erfolge, sodass wir eine Alternative suchten. Wir stießen auf das Prinzip der Gymnosis mittels GapmeRs von Qiagen. Hierbei handelt es sich um eine unassistierte Aufnahme gewünschter Antisense-DNA-Abschnitte ohne Transfektionsreagenz [46]. LNA-GapmeRs bestehen aus einer kurzen, circa 12 - 16 Nukleotide langen Sequenz, die an ihren jeweiligen Enden je 2 - 5 Locked Nucleic Acids, sogenannte LNAs, enthält [46].

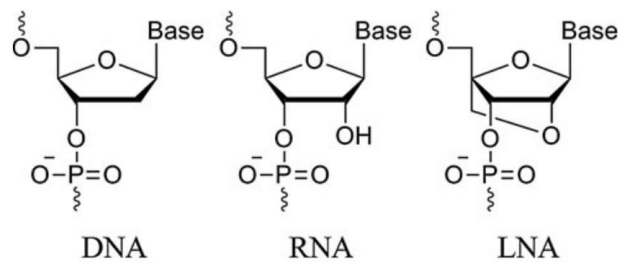


Abb. 4.20: Locked Nucleic Acids (LNAs) [26].

LNAs sind Nukleinsäureanaloge mit 2'-O,4'-C-Methylenbrücke [41]. Die LNAs rahmen eine Lücke („gap“) von zentraler DNA ein [42].

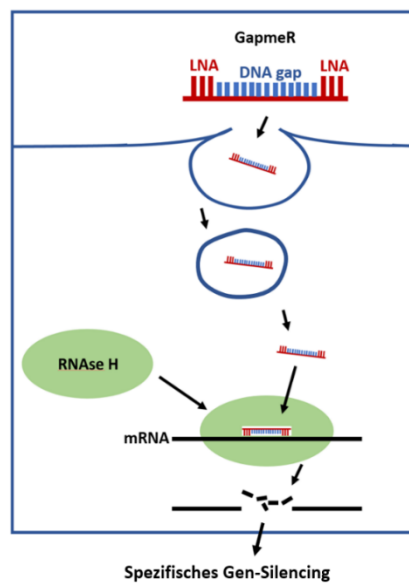


Abb. 4.21: Funktionsweise der LNA-GapmeRs.

Die GapmeRs werden eigenständig durch Makropinozytose in die Zelle aufgenommen [13]. Nach Bindung an die Ziel-mRNA sorgt die zentrale DNA-Sequenz für eine Rekrutierung der RNase H, die die gezielte endonukleolytische Spaltung der gebundenen mRNA katalysiert [2]. So kommt es zu einem spezifischen Gen-Silencing. Während die entstehenden Fragmente durch Exonukleasen abgebaut werden, wird das LNA-GapmeR wieder freigesetzt und katalysiert den Abbau weiterer mRNA-Moleküle [2]. Zur Etablierung der Gymnosis an AML-Zellen orientierten wir uns an den Versuchen von Fazil *et al.*, die in ihrer Veröffentlichung T-Zellen mittels GapmeRs transfizierten [13]. Diese zählten ebenso wie die hier untersuchten AML-Zellen aufgrund ihrer Eigenschaft als Suspensionszellen zu den schwer zu transfizierenden Zelllinien. In ihrem Paper stellte sich eine Konzentration von 500 nM und eine Zeitspanne von 72 h als am wirksamsten heraus [13].

4.4.1 Ermittlung der Effizienz der Aufnahme von LNA-GapmeRs mittels Gymnosis durch FACS-Analysen

Vor einem ersten Experiment wurde überprüft, ob sich die Methode der unassistierten Aufnahme von ausgewählten DNA-Sequenzen mittels Makropinozytose in AML-Zellen umsetzen lässt. Dazu wurden die entsprechenden Zelllinien mit GapmeRs, die mit dem Reporterfarbstoff 6-FAM-Phosphoramidit (FAM) gekoppelt waren, behandelt und danach mittels Durchflusszytometrie die Effizienz der Aufnahme der GapmeRs bestimmt. Nur in Zellen, in denen eine hohe Gymnosis-Effizienz erreicht wurde, war später ein nachweisbarer spezifischer Protein-Knockdown zu erwarten. Bei nur geringer Effizienz und damit kleiner Anzahl erfolgreich behandelter Zellen wäre eine spätere Proteinreduktion vor dem Hintergrund vieler unveränderter Zellen mit üblicher Proteinmenge kaum sichtbar gewesen.

Hierfür wurden die Zellen – wie in Kapitel 3.2.10 beschrieben – mit FAM-gekoppelten Kontroll-GapmeRs behandelt und ihre Absorptionsrate nach 48 h bestimmt. Als Referenz dienten jeweils Zellen, die mit Kontroll-LNA-GapmeRs ohne den Reporterfarbstoff behandelt wurden. Um sicherzugehen, dass die GapmeRs nicht nur extrazellulär an der Zelle hafteten, sondern tatsächlich intrazellulär vorlagen, wurden 2 zusätzliche Waschschrte mit PBS-Puffer durchgeführt.

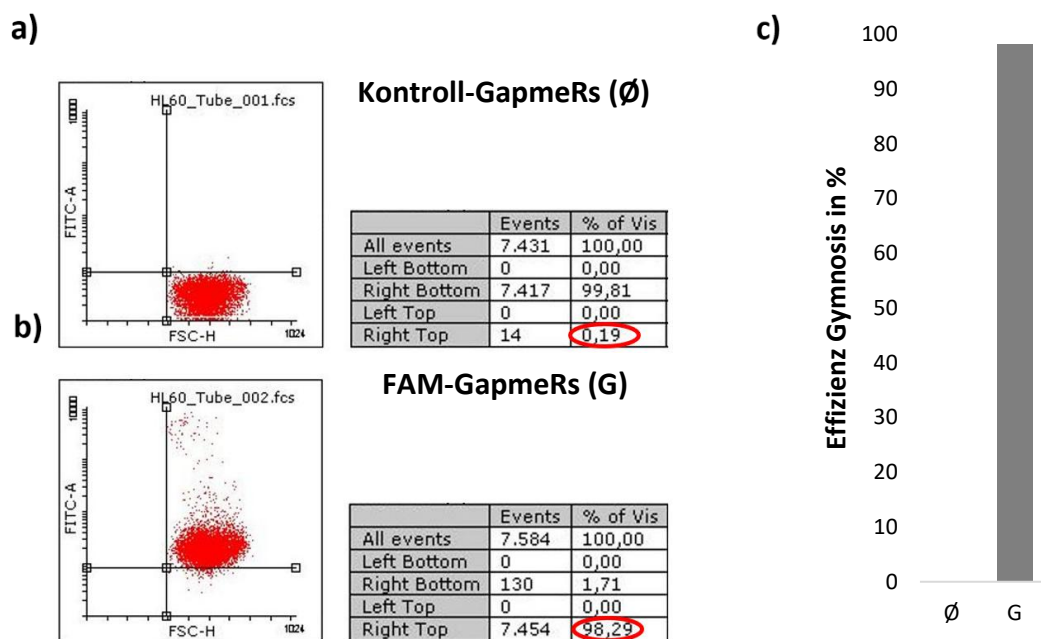


Abb. 4.22: Effizienz der Gymnosis mittels LNA-GapmeRs bei HL60-Zellen. 4×10^4 Zellen wurden in 500 μ l Medium, bestehend aus 90 % RPMI mit 10 % FCS, in 24-Well-Platten ausplattiert. Es wurden **(a)** Negativ-Kontroll-GapmeRs (\emptyset) oder **(b)** FAM-GapmeRs (G) zur Herstellung einer Konzentration von 500 nM zugegeben. Nach 48 h wurde die Emissionsrate mithilfe einer FACS-Analyse untersucht. **(c)** Effizienz der Gymnosis in Prozent.

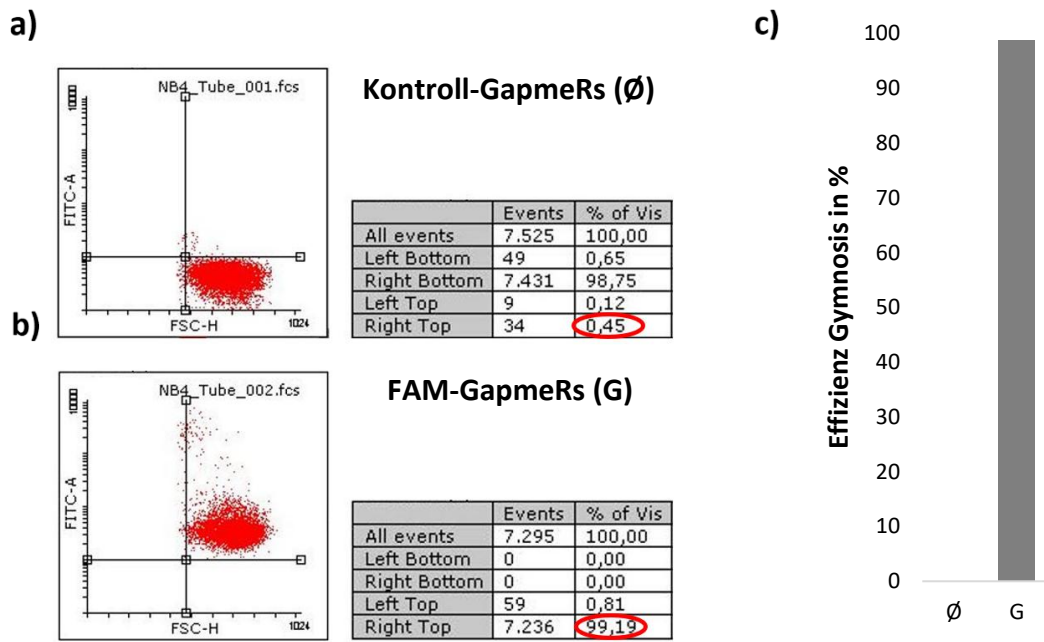


Abb. 4.23: Effizienz der Gymnosis mittels LNA-GapmeRs bei NB4-Zellen. 4×10^4 Zellen wurden in 500 μ l Medium, bestehend aus 90 % RPMI mit 10 % FCS, in 24-Well-Platten ausplattiert. Es wurden **(a)** Negativ-Kontroll-GapmeRs (\emptyset) oder **(b)** FAM-GapmeRs (G) zur Herstellung einer Konzentration von 500 nM zugegeben. Nach 48 h wurde die Emissionsrate mithilfe einer FACS- Analyse untersucht. **(c)** Effizienz der Gymnosis in Prozent.

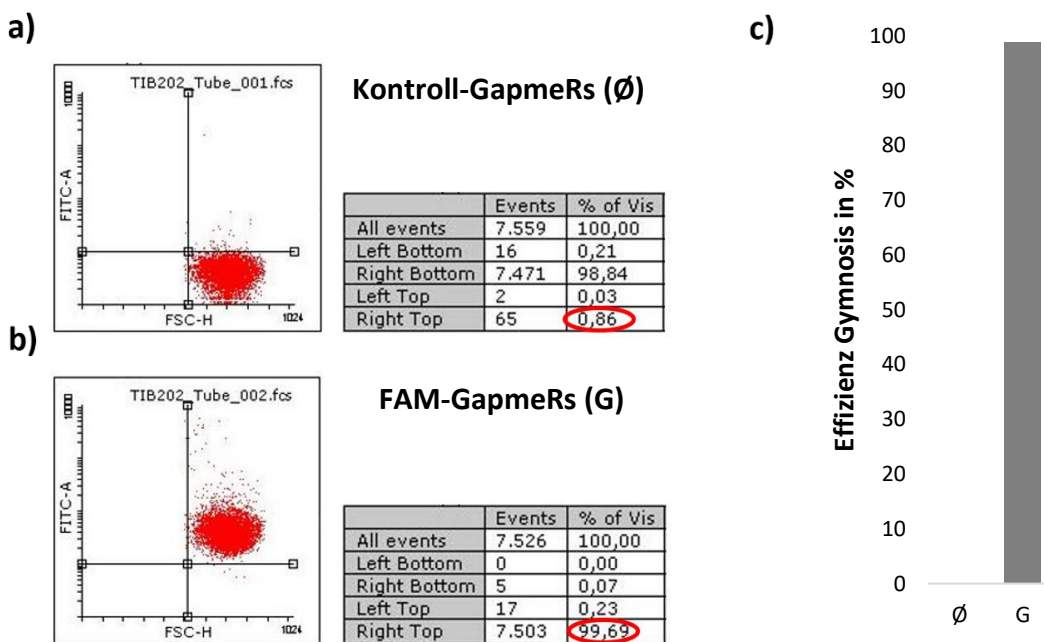


Abb. 4.24: Effizienz der Gymnosis der LNA-GapmeRs bei TIB202-Zellen. 4×10^4 Zellen wurden in 500 μ l Medium, bestehend aus 90 % RPMI mit 10 % FCS, in 24-Well-Platten ausplattiert. Es wurden **(a)** Negativ-Kontroll-GapmeRs (\emptyset) oder **(b)** FAM-GapmeRs (G) zur Herstellung einer Konzentration von 500 nM zugegeben. Nach 48 h wurde die Emissionsrate mithilfe einer FACS- Analyse untersucht. **(c)** Effizienz der Gymnosis in Prozent.

Bei HL60-Zellen lag die Effizienz der Gymnosis bei ca. 98 %, bei NB4- und TIB202-Zellen bei je ca. 99 %. Damit zeigten alle 3 Zelllinien mit weit über 90 % hinreichend hohe Gymnosis-Effizienzen. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die spätere Behandlung der entsprechenden Zelllinien mit GapmeRs, die gegen die RNA von NIR gerichtet sind, zu Ergebnissen führen würden, die nicht durch unzureichende Aufnahme der NIR-LNA-GapmeRs limitiert ist.

4.4.2 Analyse der LNA-GapmeR-behandelten AML-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie

Zum Sichern des oben beschriebenen vielversprechenden Ergebnisses der LNA-GapmeR-Behandlung behandelten wir die Zellen für die Betrachtung in der Fluoreszenzmikroskopie identisch. Auch hier sollte ein Trugschluss durch ein Anheften der FAM-Farbstoffe an die Zellmembran durch 2 Waschschriffe mit PBS-Puffer verhindert werden. Die Zellen wurden zur Detektion der Zellkerne zusätzlich mit DAPI angefärbt und mittels Cytospin-Methode auf Objektträger aufgebracht. Die Zellen konnten nun unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

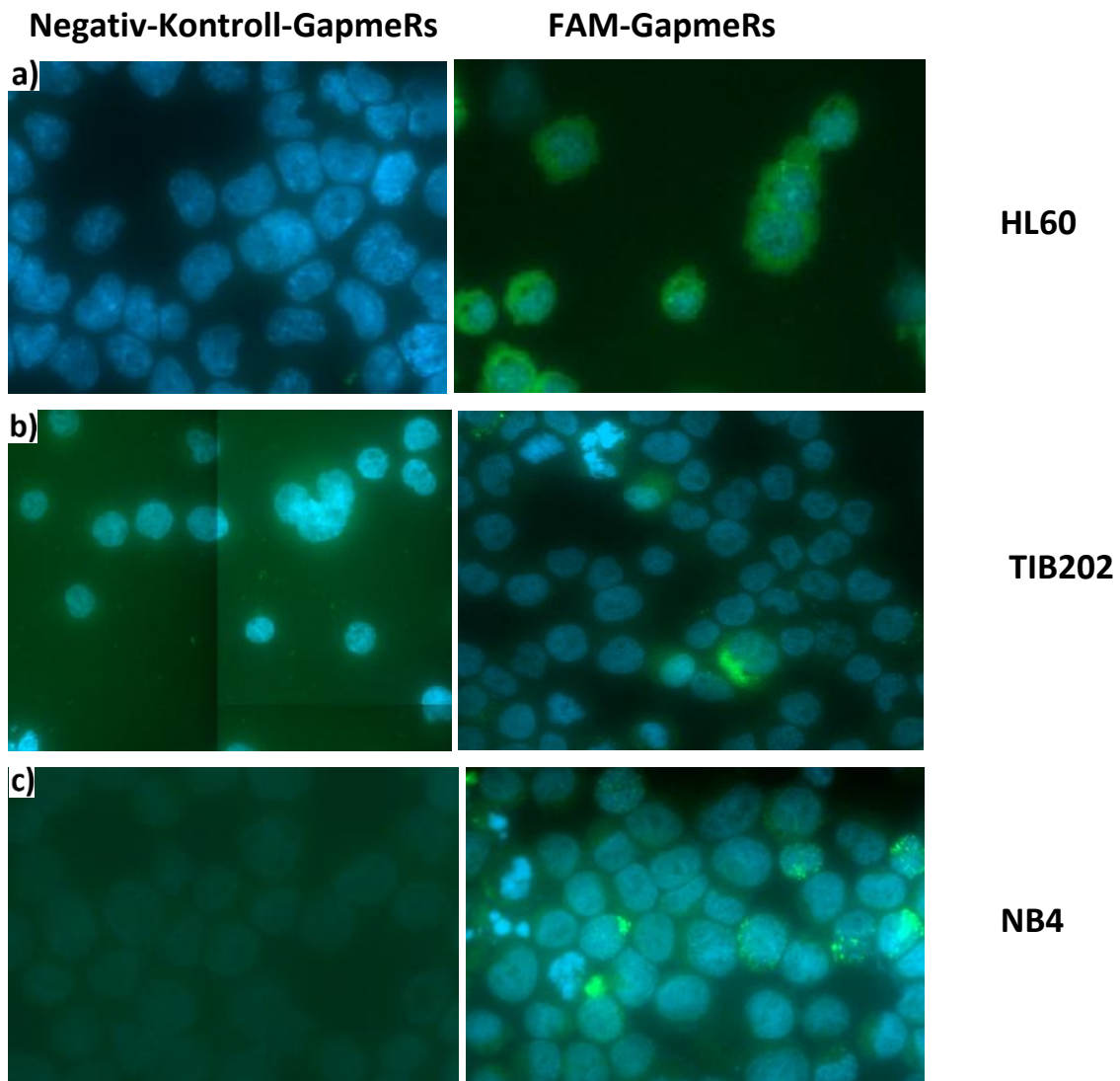


Abb. 4.25: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der mit FAM-LNA-GapmeRs-behandelten (a) HL60-Zellen, (b) TIB202-Zellen und (c) NB4-Zellen. Es wurden 4×10^4 Zellen in 500 μ l Medium, bestehend aus 90 % RPMI mit 10 % FCS, in 24-Well-Platten ausplattiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit Negativ-Kontroll-GapmeRs behandelte wurden. FAM-GapmeRs wurden zur Herstellung einer Konzentration von 500 nM zugegeben. 48 h nach Behandlung wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die unter ultraviolettem Licht blauen Signale beschreiben Areale, in denen sich der Fluoreszenzfarbstoff DAPI angesammelt hat, dies entspricht vorwiegend den Zellkernen. Die unter ultraviolettem Licht grünen Signale beschreiben Ansammlungen des Reporter-Farbstoffs FAM.

Bei HL60-Zellen zeigten sich vor allem flächige, grüne Fluoreszenzsignale um die Zellkerne herum, die vereinbar waren mit dem Bereich des Zytoplasmas. Außerdem war zu erkennen, dass sich grün fluoreszierenden Signale in punktförmigen Arealen zusammenlagerten. Diese Areale waren am ehesten vereinbar mit Endosomen. Die FAM-GapmeRs, die für diese grünen Fluoreszenzsignale verantwortlich waren, schienen sich somit in HL60-Zellen sowohl im Zytoplasma als auch intrazellulär in Endosomen zu befinden. Bei NB4-Zellen ließen sich im Gegensatz zu HL60-Zellen vor allem punktförmige grüne Fluoreszenzen erkennen, ebenso vereinbar mit einer FAM-GapmeRs-Ansammlung in Endosomen. Auch diese Zellen zeigten eine scheinbar leicht erhöhte Fluoreszenz um die Zellkerne herum, vereinbar mit FAM-

Reporterfarbstoff im Zytoplasma. Bei TIB202-Zellen zeigten sich am wenigsten grüne fluoreszierende Signale. Jedoch waren auch hier grüne punktförmige Fluoreszenzen, a. e. Endosomen, und eine leicht erhöhte Fluoreszenz, a. e. im Bereich des Zytoplasmas, zu erkennen. Somit schien auch bei diesen Zellen eine Aufnahme des FAM-Reporterfarbstoffs ins Zytoplasma und in die Endosomen nach Intrazellulär möglich.

Aufgrund der Tatsache, dass die Durchflusszytometrie wesentlich sensitiver für die schwachen intrazellulären Signale des FAM-Farbstoffes ist als das menschliche Auge, kann nur ein geringer Anteil der tatsächlich fluoreszierenden Zellen in der Fluoreszenzmikroskopie wahrgenommen werden. Nur Orte, wo FAM stark konzentriert ist, können als fluoreszierend wahrgenommen werden. Trotz alledem zeigte sich im obigen Experiment eine Fluoreszenz innerhalb der Zellen. Somit kann auch in diesem Experiment davon ausgegangen werden, dass das Prinzip der Gymnosis an AML-Zellen funktioniert.

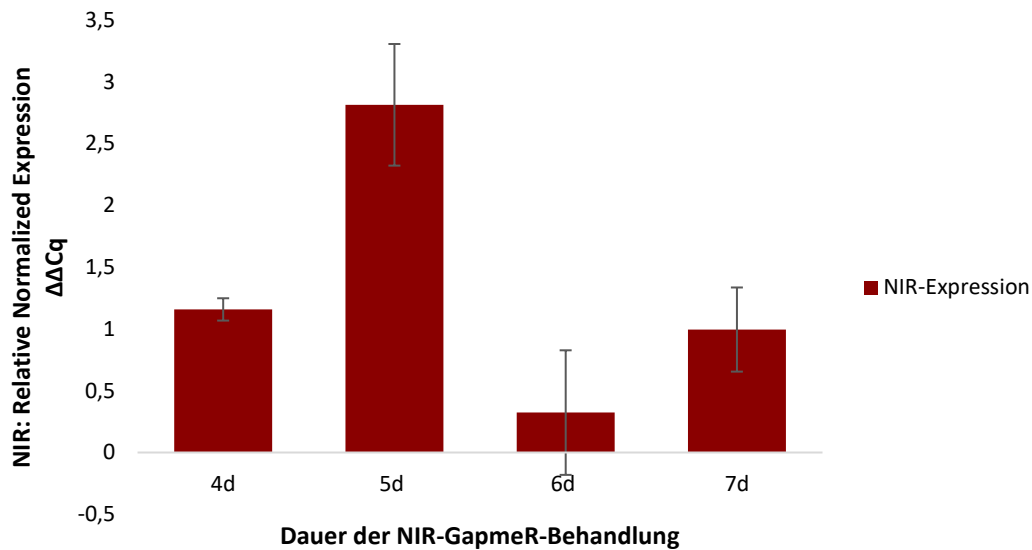
4.4.3 Analyse der NIR-LNA-GapmeRs-behandelten AML-Zelllinien

Um zu untersuchen, ob mithilfe der Gymnosis-Methode ein NIR-Knockdown in AML-Zellen hervorgerufen werden kann, ließen wir spezifische, gegen das NIR-Protein gerichtete LNA-GapmeRs mit der Gensequenz 5' TCACGGCACTAATAA 3' synthetisieren. Die 3 Zelllinien NB4, HL60 und TIB202, an denen bereits obige Vorexperimente durchgeführt worden waren, wurden über Zeiträume von 4 - 7 Tagen mit einer Konzentration von 0,5 oder 1 μ M behandelt.

4.4.3.1 NIR-Knockdown mit 0,5 μ M LNA-GapmeRs-Behandlung

Wir starteten aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse in den Vorexperimenten mit einer GapmeR-Konzentration von 0,5 μ M.

HL60: NIR-GapmeR-Konzentration 0,5 μ M

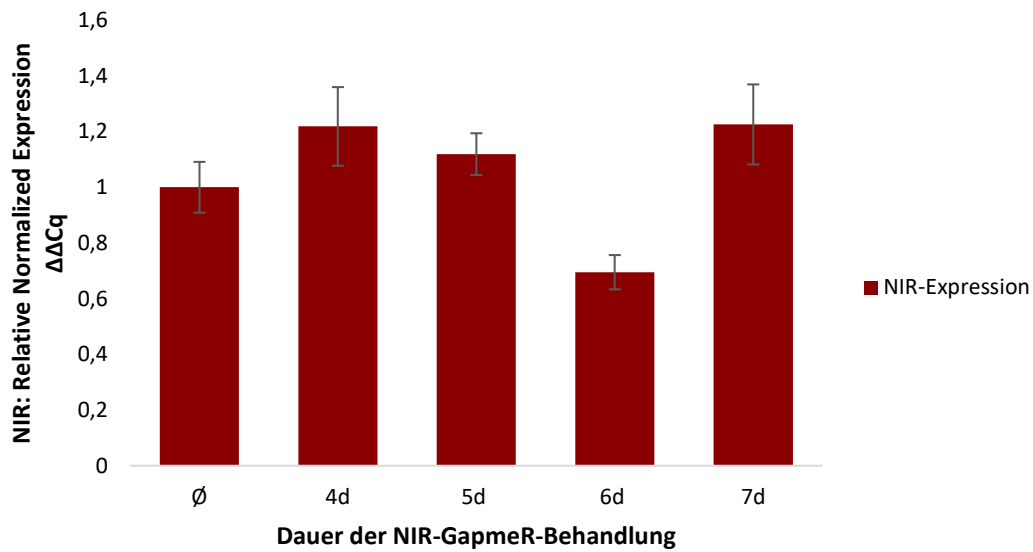


Target	Sample	Relative Normalized Expression $\Delta\Delta Cq$	Relative Normalized Expression $\Delta\Delta Cq$ SD	Mean Cq	Cq SD
β -Aktin	HL60 Kontrolle 4d			21,70	0,25715
β -Aktin	HL60 NIR-GapmeR 4d			22,02	0,02506
β -Aktin	HL60 Kontrolle 5d			16,27	0,00000
β -Aktin	HL60 NIR-GapmeR 5d			16,06	0,06674
β -Aktin	HL60 Kontrolle 6d			17,47	0,17916
β -Aktin	HL60 NIR-GapmeR 6d			17,39	0,12928
β -Aktin	HL60 Kontrolle 7d			19,72	0,33374
β -Aktin	HL60 NIR-GapmeR 7d			19,32	0,13418
NIR	HL60 Kontrolle 4d	1,00000	0,41107	35,93	0,53440
NIR	HL60 NIR-GapmeR 4d	1,15852	0,09038	36,04	0,10973
NIR	HL60 Kontrolle 5d	1,00000	1,08962	36,14	1,57199
NIR	HL60 NIR-GapmeR 5d	2,81494	0,49230	34,44	0,24333
NIR	HL60 Kontrolle 6d	1,00000	0,38424	36,85	0,52459
NIR	HL60 NIR-GapmeR 6d	0,32319	0,50440	38,40	2,24786
NIR	HL60 Kontrolle 7d	1,00000	0,57991	36,14	0,76719
NIR	HL60 NIR-GapmeR 7d	0,99555	0,34063	35,75	0,47504

Abb. 4.26: RT-PCR nach Behandlung von HL60-Zellen mit 0,5 μ M NIR-LNA-GapmeRs. Es wurden 4×10^4 Zellen in 500 μ l Medium, bestehend aus 90 % RPMI mit 10 % FCS, in 24-Well-Platten ausplattiert. 5 μ l NIR-GapmeRs wurden zur Herstellung einer Konzentration von 500 nM zugegeben. Bei mehr als 6-tägiger Inkubation wurde an Tag 6 erneut 5 μ l NIR-LNA-GapmeRs zur erneuten Herstellung einer 500nM-Konzentration zugegeben. Als Kontrolle (\emptyset) dienen mit Negativ-Kontroll-GapmeRs behandelte NB4-Zellen. 4, 5, 6 und 7 Tage (d) nach Behandlung der Zellen wurde die NIR-Expression auf Genebene mithilfe der quantitativen RT-PCR untersucht. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde graphisch im Diagramm nur die NIR-Expression der Kontrolle nach 4 Tagen eingezeichnet. Die NIR-Expressions-Werte der weiteren Tage sind der Tabelle zu entnehmen.

Es zeigten sich stark voneinander abweichende Mean Cq-Werte mit teils großer Standardabweichung. Die $\Delta\Delta Cq$ -Werte und damit die Expressionslevel von NIR in HL60-Zellen waren aufgrund der vorherigen Ergebnisse als nicht aussagekräftig zu bewerten. Vorversuche hatten bereits gezeigt, dass HL60-Zellen kein NIR auf Transkriptebene exprimieren (s. Abb. 4.8). Somit sind die für die vermeintlichen NIR-Produkte gemessenen sehr hohen Cq-Werte am ehesten mit unspezifischen Produkten oder Primerdimeren vereinbar, nicht mit NIR-Produkten.

TIB202: NIR-GapmeR-Konzentration 0,5 μ M

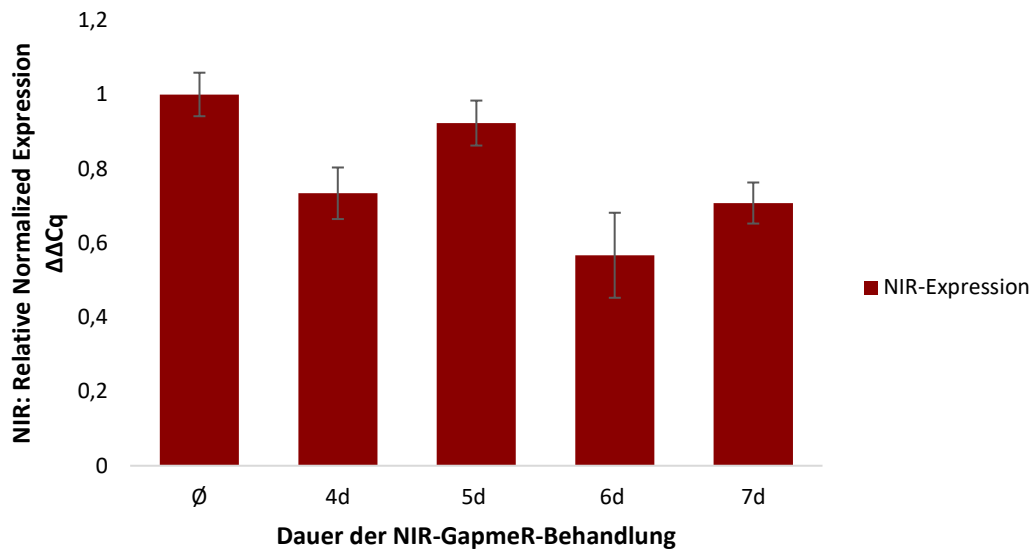


Target	Sample	Relative Normalized Expression $\Delta\Delta Cq$	Relative Normalized Expression $\Delta\Delta Cq$ SD	Mean Cq	Cq SD
β -Aktin	TIB202 Kontrolle 4d			16,04	0,42213
β -Aktin	TIB202 NIR-GapmeR 4d			15,92	0,14615
β -Aktin	TIB202 Kontrolle 5d			13,05	0,19034
β -Aktin	TIB202 NIR-GapmeR 5d			13,24	0,07791
β -Aktin	TIB202 Kontrolle 6d			13,80	0,05970
β -Aktin	TIB202 NIR-GapmeR 6d			13,88	0,11565
β -Aktin	TIB202 Kontrolle 7d			15,35	0,11167
β -Aktin	TIB NIR-GapmeR 7d			15,57	0,14217
NIR	TIB202 Kontrolle 4d	1,00000	0,37797	22,77	0,34518
NIR	TIB202 NIR-GapmeR 4d	1,21842	0,14127	22,37	0,08137
NIR	TIB202 Kontrolle 5d	1,00000	0,14362	21,17	0,08188
NIR	TIB202 NIR-GapmeR 5d	1,11889	0,07513	21,20	0,05758
NIR	TIB202 Kontrolle 6d	1,00000	0,04145	21,37	0,00339
NIR	TIB202 NIR-GapmeR 6d	0,69498	0,06152	21,97	0,05417
NIR	TIB202 Kontrolle 7d	1,00000	0,09129	22,73	0,06982
NIR	TIB NIR-GapmeR 7d	1,22566	0,14372	22,66	0,09169

Abb. 4.27: RT-PCR nach Behandlung von TIB202-Zellen mit 0,5 μ M NIR-LNA-GapmeRs. Es wurden 4×10^4 Zellen in 500 μ l Medium, bestehend aus 90 % RPMI mit 10 % FCS, in 24-Well-Platten ausplattiert. 5 μ l NIR-GapmeRs wurden zur Herstellung einer Konzentration von 500 nM zugegeben. Bei mehr als 6-tägiger Inkubation wurde an Tag 6 erneut 5 μ l NIR-LNA-GapmeRs zur erneuten Herstellung einer 500nM-Konzentration zugegeben. Als Kontrolle (\emptyset) dienen mit Negativ-Kontroll-GapmeRs behandelte NB4-Zellen. 4, 5, 6 und 7 Tage (d) nach Behandlung der Zellen wurde die NIR-Expression auf Genebene mithilfe der quantitativen RT-PCR untersucht. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde graphisch im Diagramm nur die NIR-Expression der Kontrolle nach 4 Tagen eingezeichnet. Die NIR-Expressions-Werte der weiteren Tage sind der Tabelle zu entnehmen.

Die Werte für die relativ normalisierte Expression $\Delta\Delta Cq$ divergierten je nach Beobachtungsdauer zwischen etwa 0,7 und 1,2. Es ließ sich keine Tendenz zeigen. In diesem Experiment konnte somit keine NIR-Reduktion mittels GapmeRs in TIB202-Zellen nachgewiesen werden.

NB4: NIR-GapmeR-Konzentration 0,5 μ M



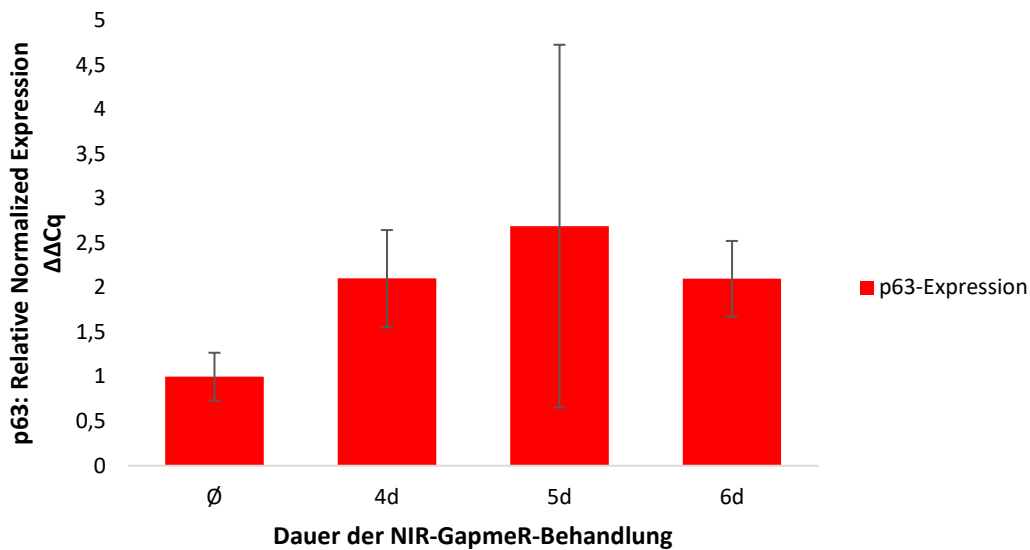
Target	Sample	Relative Normalized Expression $\Delta\Delta Cq$	Relative Normalized Expression $\Delta\Delta Cq$ SD	Mean Cq	Cq SD
β -Aktin	NB4 Kontrolle 4d			17,96	0,24424
β -Aktin	NB4 NIR-GapmeR 4d			17,99	0,07212
β -Aktin	NB4 Kontrolle 5d			15,08	0,08580
β -Aktin	NB4 NIR-GapmeR 5d			14,64	0,04538
β -Aktin	NB4 Kontrolle 6d			15,33	0,03101
β -Aktin	NB4 NIR-GapmeR 6d			15,23	0,27816
β -Aktin	NB Kontrolle 7d			19,32	0,02635
β -Aktin	NB4 NIR-GapmeR 7d			18,60	0,10898
NIR	NB4 Kontrolle 4d	1,00000	0,27120	22,88	0,30567
NIR	NB4 NIR-GapmeR 4d	0,73386	0,06942	23,36	0,11586
NIR	NB4 Kontrolle 5d	1,00000	0,18047	21,44	0,24582
NIR	NB4 NIR-GapmeR 5d	0,92293	0,06054	21,11	0,08304
NIR	NB4 Kontrolle 6d	1,00000	0,02162	21,23	0,00332
NIR	NB4 NIR-GapmeR 6d	0,56684	0,11450	21,95	0,08692
NIR	NB Kontrolle 7d	1,00000	0,05857	25,37	0,08029
NIR	NB4 NIR-GapmeR 7d	0,70757	0,05530	25,15	0,02894

Abb. 4.28: RT-PCR-Daten nach Behandlung von NB4-Zellen mit 0,5 μ M NIR-LNA-GapmeRs. Es wurden 4×10^4 Zellen in 500 μ l Medium, bestehend aus 90 % RPMI mit 10 % FCS, in 24-Well-Platten ausplattiert. 5 μ l NIR-GapmeRs wurden zur Herstellung einer Konzentration von 500 nM zugegeben. Bei mehr als 6-tägiger Inkubation wurde an Tag 6 erneut 5 μ l NIR-LNA-GapmeRs zur erneuten Herstellung einer 500nM-Konzentration zugegeben. Als Kontrolle (\emptyset) dienten mit Negativ-Kontroll-GapmeRs behandelte NB4-Zellen. 4, 5, 6 und 7 Tage (d) nach Behandlung der Zellen wurde die NIR-Expression auf Genebene mithilfe der quantitativen RT-PCR untersucht. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde graphisch im Diagramm nur die NIR-Expression der Kontrolle nach 7 Tagen eingezeichnet. Die NIR-Expressions-Werte der weiteren Tage sind der Tabelle zu entnehmen.

Bei NB4-Zellen zeigten sich – abhängig von der Beobachtungsdauer – unterschiedliche $\Delta\Delta Cq$ -Werte und damit eine unterschiedlich starke Reduktion der NIR-Expression je nach Beobachtungsdauer. Während die Reduktion nach 4 Tagen etwa 27 % betrug, ließ sie sich, möglicherweise durch die erneute GapmeRs-Zugabe an Tag 6, auf bis zu ca. 43 % nach 6 Tagen steigern.

Da es zu einem Rückgang der NIR-Expression kam, stellten wir uns die Frage, ob es bei NB4-Zellen nach NIR-GapmeR-Behandlung auch zu einer Veränderung der p63-Expression kam.

NB4: NIR-GapmeR-Konzentration von 0,5 μ M



Target	Sample	Relative Normalized Expression $\Delta\Delta Cq$	Relative Normalized Expression $\Delta\Delta Cq$ SD	Mean Cq	Cq SD
β -Aktin	NB4 Kontrolle 4d			17,96	0,24424
β -Aktin	NB4 NIR-GapmeR 4d			17,99	0,07212
β -Aktin	NB4 Kontrolle 5d			15,08	0,08580
β -Aktin	NB4 NIR-GapmeR 5d			14,64	0,04538
β -Aktin	NB4 Kontrolle 6d			15,33	0,03101
β -Aktin	NB4 NIR-GapmeR 6d			15,23	0,27816
β -Aktin	NB Kontrolle 7d			19,32	0,02635
β -Aktin	NB4 NIR-GapmeR 7d			18,60	0,10898
p63	NB4 Kontrolle 4d	1,00000	0,26775	37,39	0,29928
p63	NB4 NIR-GapmeR 4d	2,10110	0,54386	36,35	0,36641
p63	NB4 Kontrolle 5d	1,00000	0,77569	35,43	1,11578
p63	NB4 NIR-GapmeR 5d	2,68879	2,03575	33,56	1,09136
p63	NB4 Kontrolle 6d	1,00000	1,32830	37,88	1,91609
p63	NB4 NIR-GapmeR 6d	2,09788	0,42456	36,71	0,08873

Abb. 4.29: RT-PCR-Daten nach Behandlung von NB4-Zellen mit 0,5 μ M NIR-LNA-GapmeRs. Es wurden 4×10^4 Zellen in 500 μ l Medium, bestehend aus 90 % RPMI mit 10 % FCS, in 24-Well-Platten ausplattiert. 5 μ l NIR-GapmeRs wurden zur Herstellung einer Konzentration von 500 nM zugegeben. Bei mehr als 6-tägiger Inkubation wurde an Tag 6 erneut 5 μ l NIR-LNA-GapmeRs zur erneuten Herstellung einer 500nM-Konzentration zugegeben. Als Kontrolle (\emptyset) dienten mit Negativ-Kontroll-GapmeRs behandelte NB4-Zellen. 4, 5, 6 und 7 Tage (d) nach Behandlung der Zellen wurde die p63-Expression auf Genebene mithilfe der quantitativen RT-PCR untersucht. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde graphisch im Diagramm nur die p63-Expression der Kontrolle nach 4 Tagen eingezeichnet. Die Werte der p63-Expression der weiteren Tage sind der Tabelle zu entnehmen.

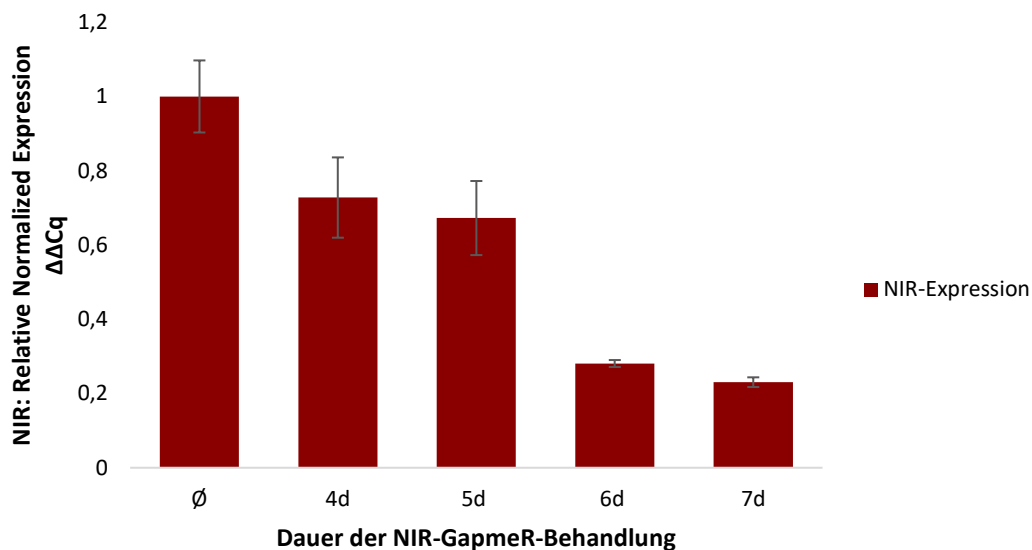
Für die vermeintlichen p63-RT-PCR-Produkte zeigten sich stark voneinander abweichende Mean Cq-Werte mit teils großer Standardabweichung. Wie bereits in Kapitel 4.2.2.3 gezeigt, exprimierten unbehandelte NB4-Zellen mit einer relativ normalisierten Expression von 0,00021 (vgl. Abb. 4.10) eine außerordentlich geringe Menge an p63-Transkript. Die hier gemessenen sehr hohen Cq-Werte waren daher v. a. mit unspezifischen Produkten oder Primerdimeren vereinbar, nicht mit p63-Produkten. Die $\Delta\Delta Cq$ -Werte und damit die Expressionslevel von p63 in NB4-Zellen waren als nicht aussagekräftig zu bewerten. Bei Behandlung mit NIR-LNA-GapmeRs kam es also zu keiner nachweisbaren Veränderung der in NB4-Zellen sowieso kaum vorhandenen p63-Expression.

Zur Optimierung der Ergebnisse sollten sich weitere Experimente anschließen, die nur an einer Zelllinie fortgeführt wurden. Hierfür schieden HL60-Zellen aus, da diese kein NIR-Protein exprimierten. Die in der Graphik für diese Zelllinie dargestellten Werte waren als Primerdimere oder unspezifische Produkte zu werten. TIB202-Zellen zeigten keinen Rückgang des NIR-Expressionslevels. Bei NB4-Zellen jedoch ließ sich eine Reduktion der NIR-Expression von bis zu 43 % zeigen. Somit entschieden wir uns für NB4-Zellen, die aufgrund oben beschriebener Ergebnisse am ehesten erfolgsversprechend erschienen.

4.4.3.2 NIR-Knockdown mit 1 μ M LNA-GapmeRs-Behandlung

Aufgrund der nicht verwertbaren Ergebnisse der p63-Expression konzentrierten wir uns darauf, ein Protokoll für die Gymnosis von AML-Zellen zu etablieren. Da bereits bei einer NIR-GapmeR-Konzentration von 0,5 μ M ein NIR-Rückgang in NB4-Zellen zu verzeichnen war, konzentrierten wir uns vorerst auf eine Etablierung eines Gymnosis-Protokolls in diesen Zellen. Bei Wiederholung des obigen Experiments wurden die NB4-Zellen zur Verstärkung des Knockdowns unter ansonsten identischen Bedingungen mit der doppelten GapmeR-Konzentration von 1 μ M behandelt.

NB4: NIR-GapmeR-Konzentration 1 μ M



Target	Sample	Relative Normalized Expression ΔΔCq	Relative Normalized Expression ΔΔCq SD	Mean Cq	Cq SD
β-Aktin	NB4 Kontrolle 4d			16,29	0,12314
β-Aktin	NB4 NIR-GapmeR 4d			16,14	0,02071
β-Aktin	NB Kontrolle 5d			16,29	0,12314
β-Aktin	NB4 NIR-GapmeR 5d			17,10	0,18561
β-Aktin	NB4 Kontrolle 6d			15,68	0,12786
β-Aktin	NB4 NIR-GapmeR 6d			15,26	0,01753
β-Aktin	NB4 Kontrolle 7d			15,68	0,12786
β-Aktin	NB4 NIR-GapmeR 7d			16,23	0,04507
NIR	NB4 Kontrolle 4d	1,00000	0,09706	21,25	0,06665
NIR	NB4 NIR-GapmeR 4d	0,72771	0,10817	21,56	0,21344
NIR	NB4 Kontrolle 5d	1,00000	0,09706	21,25	0,06665
NIR	NB4 NIR-GapmeR 5d	0,67251	0,09977	22,63	0,10659
NIR	NB4 Kontrolle 6d	1,00000	0,09529	20,43	0,05051
NIR	NB4 NIR-GapmeR 6d	0,28065	0,00943	21,84	0,04522
NIR	NB4 Kontrolle 7d	1,00000	0,09529	20,43	0,05051
NIR	NB4 NIR-GapmeR 7d	0,23040	0,01308	23,10	0,06839

Abb. 4.30: Reduktion der NIR-Expression in der RT-PCR nach Behandlung von NB4-Zellen mit 1 μ M NIR-LNA-GapmeRs. Identisch zu obigen Vorversuchen wurden 4×10^4 Zellen in 500 μ l Medium, bestehend aus 90 % RPMI mit 10 % FCS, in 24-Well-Platten ausplattiert. 10 μ l NIR-GapmeRs wurden zur Herstellung einer Konzentration von 1 μ M zugegeben. Bei mehr als 6-tägiger Inkubation wurde an Tag 6 erneut 10 μ l NIR-LNA-GapmeRs zur erneuten Herstellung einer 1 μ M-Konzentration zugegeben. Als Kontrolle (\emptyset) dienen mit Negativ-Kontroll-GapmeRs behandelte NB4-Zellen. 4, 5, 6 und 7 Tage (d) nach Behandlung der Zellen wurde die NIR-Expression auf Genebene mithilfe der quantitativen RT-PCR untersucht. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde graphisch im Diagramm nur die NIR-Expression der Kontrolle nach 4 Tagen eingezeichnet. Die NIR-Expressions-Werte der weiteren Tage sind der Tabelle zu entnehmen.

Bei NB4-Zellen zeigte sich auch mit der Konzentration von 1 μM – abhängig von der Beobachtungsdauer – eine unterschiedliche relativ normalisierte Expression anhand der $\Delta\Delta\text{Cq}$ -Werte. Das bedeutete einen unterschiedlich starken Rückgang der NIR-Expression. Während die NIR-Reduktion beispielsweise nach 4 Tagen noch etwa 27 % betrug, ließ sie sich, möglicherweise beeinflusst durch die erneute GapmeRs-Zugabe an Tag 6, auf bis zu ca. 77 % nach 7 Tagen steigern.

Die Ergebnisse des NIR-Knockdowns in AML-Zellen mittels Gymnosis durch NIR-LNA-GapmeRs stammten aus 2 unabhängigen Experimenten. Es ließ sich somit zeigen, dass das Prinzip der Gymnosis an NB4-Zellen mit der Konzentration von 1 μM nach 6 - 7 Tagen sehr gut funktioniert. Dieses Ergebnis sollte weiteren Knockdown-Experimenten als Grundlage dienen.

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Es konnte gezeigt werden, dass entgegen vorheriger Annahme Zellen existieren, die NIR weder auf Protein- noch auf Transkriptebene exprimieren. Dies galt insbesondere für HL60- und HNT34-Zellen. Es stellte sich heraus, dass diese beiden Zelllinien, welche p63 in hohem Maße und gleichzeitig NIR nicht exprimierten, die höchsten Wachstumsraten aufwiesen.

Alle getesteten AML-Zelllinien zeigten eine Antikorrelation zwischen NIR- und p63-Expression. Es ließ sich anhand von Western-Blots und RT-PCRs feststellen, dass dieser antagonistische Zusammenhang zwischen NIR und p63 auf Transkriptebene lokalisiert war.

Da der NIR-Knockdown mittels siRNA-Transfektion und Elektroporation nicht erfolgreich waren, sollte der NIR-Knockdown mit Hilfe des Gymnosis-Protokolls an AML-Suspensionszellen untersucht werden. Wir etablierten erfolgreich ein Protokoll für NB4-Zellen. An diesen ließen sich mit speziell hierfür synthetisierten NIR-GapmeRs gute NIR-Knockdown-Ergebnisse von bis zu 77 % zeigen.

5.2 Diskussion der Methoden und Protokoll-Etablierung

5.2.1 Expressionsnachweis auf Protein- und Transkriptebene

Die von uns benutzten Methoden zur Feststellung der Expressionsmuster beinhalteten Western-Immunoblots und quantitative RT-PCRs. Diese Methoden wurden nach Standard-Protokollen durchgeführt, waren daher bereits vielfach etabliert und benötigten keine weiteren Etablierungsexperimente unsererseits.

In bisherigen Arbeiten wurde zwar festgestellt, dass Proben von AML-Patienten sich hinsichtlich ihrer NIR-Expression unterschieden [8], systematische Experimente an AML-Zelllinien diesbezüglich und hinsichtlich zusammenhängender p63-Expressionsmuster wurden jedoch noch nicht durchgeführt. Es lagen also noch keine Erkenntnisse über die sich unter Umständen beeinflussenden NIR- und p63-Expressionslevel in AML-Zelllinien vor.

Die hier vorliegenden Ergebnisse beziehen sich auf 8 der vielen vorhandenen AML-Zelllinien, sodass eine Übertragbarkeit auf alle AML-Zelllinien noch nicht gewagt werden kann. Zukünftige Untersuchungen könnten sich mit der Frage beschäftigen, ob die hier vorliegenden Ergebnisse auf weitere AML-Zelllinien übertragbar sind.

5.2.2 Transfektionsexperimente

Zur Untersuchung der Auswirkung unterschiedlicher NIR-Expressionslevel in AML-Zelllinien auf die Expression anderer Gene sollten zur Beeinflussung der NIR-Expression siRNA-Transfektion oder Elektroporation zum Einsatz kommen. Unsere Transfektionsexperimente

fürten dabei leider nicht zum erhofften Erfolg: alle Versuche, siRNA in die AML-Zellen einzubringen, scheiterten. Wir führten dies darauf zurück, dass unsere Zellen Suspensionszellen waren. Zwar wurden beispielsweise von Heyne *et al.* bereits NIR-Knockdown-Experimente an Zellen mittels siRNA durchgeführt, diese erfolgten jedoch an adhären Zellen [21]. Adhären Zellen haben im Gegensatz zu in Suspension wachsenden AML-Zellen den Vorteil, dass sie einfacher mittels Lipofektion zu transfizieren sind. Bei diesen auf dem Boden der Kulturflasche wachsenden Zellen „legt“ sich das zugegebene Transfektionsmedium mit der siRNA auf die Zellen auf. Es besteht längerer Kontakt zur Zellmembran und die siRNA kann so von der Zelle aufgenommen werden. Im Gegensatz dazu wuchsen unsere Zellen frei „schwimmend“ im Kulturmedium. Dadurch ließ sich durch Absinken des Transfektionsmediums mit der siRNA im Kulturmedium kein verlängerter Kontakt zwischen diesem und den in der Flüssigkeit befindenden Zellen herstellen, wodurch es zu keiner Aufnahme der NIR-siRNA ins Zellinnere kam. Aus diesem Grund gelten die Protokolle zur Lipofektion in der Regel für adhären wachsende Zelllinien. Die Ergebnisse unserer Transfektionsexperimente sind daher als nicht aussagekräftig und als nicht geeignet für weitere Untersuchungen anzusehen.

Da es oft selbst bei erfolgreicher Durchführung der Lipofektion oder Elektroporation zu einer signifikanten Reduktion der Zellvitalität oder zu Off-Target-Effekten kommt [25], suchten wir nach einer Alternative.

5.2.3 Protokoll-Etablierung der Gymnosis mittels GapmeRs

Das Problem der nicht mittels Lipofektion und Elektroporation transfizierbaren Suspensionszellen versuchten wir mittels des noch nicht allzu sehr bekannten Prinzips der Gymnosis zu umgehen. Aufgrund der geringen Größe der für die Gymnosis verwendeten GapmeRs sollte auch bei in Suspension wachsenden Zellen eine Aufnahme ins Zellinnere möglich sein.

Für erste Versuche orientierten wir uns an Experimenten von Fazil *et al.* [13]. Die Forschungsgruppe führte bereits erfolgreiche Gymnosis-Etablierungsexperimente an menschlichen T-Lymphozyten durch, die – ebenso wie AML-Zellen – zu den Suspensionszellen zählen und somit ebenfalls als „schwierig zu transfizieren“ gelten. Bei diesen konnten sie hohe Effizienzen von weit über 90 % erreichen [13]. Es kam weder zu einer signifikanten Reduktion der Zellvitalität, noch zu einer ungewünschten Immunantwort oder zu Off-Target-Effekten [13]. Bisher lagen jedoch zur Gymnosis bei AML-Zellen noch keine Daten vor. Daher konzentrierten wir uns auf die Etablierung eines Gymnosis-Protokolls für AML-Zellen. Wir konnten mittels FAM-gekoppelter GapmeRs in der Fluoreszenzmikroskopie und im FACS zeigen, dass bei gemessenen Gymnosis-Effizienzen von über 97% eine Behandlung mit GapmeRs bei HL60-, NB4- und TIB202-Zellen erfolgsversprechend scheint.

Ein weiteres Problem stellte jedoch die Tatsache dar, dass aufgrund der noch wenig etablierten Methode der Gymnosis die hierfür eingesetzten GapmeRs recht teuer sind und für bestimmte

Gene eigens synthetisiert werden mussten. Daher war es nicht möglich, die Etablierungsexperimente an allen bisher in dieser Arbeit betrachteten AML-Zelllinien durchzuführen. Wir mussten uns schließlich auf einige wenige Zelllinien und für die letztendliche Untersuchung eines NIR-Knockdowns mittels eigens synthetisierter GapmeRs schließlich auf eine Zelllinie beschränken. Wir entschieden uns für NB4-Zellen: bei gleicher Behandlung wie in den Vorexperimenten ließ sich nach 6 und 7 Tagen ein Rückgang des NIR-Proteins von über 70% zeigen. Somit etablierten wir ein Protokoll für die erfolgreiche Gymnosis-Behandlung an NB4-Zellen: es sollte eine Behandlung der Zellen mit einer GapmeR-Konzentration von 1 μM stattfinden. Bei mehr als 6-tägiger Inkubation sollte am Tag 6 erneut die ursprünglich für die Konzentration von 1 μM benötigte Menge der GapmeRs zugegeben werden. Auf diese Weise kann ein Knockdown des Zielgens von über 70 % erreicht werden.

Das Protokoll war bei unseren Experimenten vorerst nur an NB4-Zellen erfolgreich. Möglicherweise könnte die Ursache dafür das in NB4-Zellen verhältnismäßig hohe NIR-Expressionslevel sein. Zukünftige Experimente könnten folglich anhand unseres Protokolls der Frage nachgehen, ob ein NIR-Knockdown mittels GapmeRs bei weiteren AML-Zellreihen zu vergleichbaren Ergebnissen führt.

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 Genexpression auf Proteinebene

Bisher galt die Hypothese, dass Zellen ohne NIR nicht überlebensfähig sind [8]. Bei Mäusen wirkt sowohl ein systemisches Fehlen von NIR als auch ein nur auf die Epidermis beschränkter NIR-Knockdown letal [11]. Auch die meisten Zelltypen tolerieren einen dauerhaften NIR-Knockdown nicht [21]. Der NIR-Knockdown inhibiert das Zellwachstum sehr stark und führt schließlich zur Apoptose [23] [53]. Im Gegensatz zu dieser bisherigen Hypothese stellten wir fest, dass mit HL60 und HNT34 Zellen existieren, die ebendieses NIR-Protein nicht exprimieren und trotzdem überlebensfähig sind. Sie wiesen nicht nur reguläre Wachstumsgeschwindigkeiten auf, sondern zeigten im Vergleich zu anderen AML-Zelllinien sogar die mit Abstand höchsten Wachstumsgeschwindigkeiten. Es wäre denkbar, dass das schnelle Zellwachstum in NIR-defizienten AML-Zellen mit einer höheren Aggressivität der Leukämie und/oder einer schlechteren Prognose korrelieren könnte. Dies wiederum stünde der Tatsache entgegen, dass bei anderen Karzinomen, beispielsweise beim kolorektalen Karzinom oder beim Mamma-Karzinom, eine erhöhte NIR-Expression mit einem schlechteren Outcome für die Patienten korreliert [5] [31], NIR also als Onkogen wirkt [23] [31]. Diese Spekulation und die Frage, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen nicht vorhandener NIR-Expression und schnellem Zellwachstum in AML-Zellen existiert und welche Mechanismen diesem zugrunde liegen, könnten Inhalte weiterer Experimente sein.

Beide NIR-defizienten überlebensfähigen Zelllinien gehören zu den AML-Zelllinien. Da wir bei unseren Betrachtungen AML-Zelllinien sowohl mit als auch ohne NIR-Expression fanden, kommt eine NIR-Defizienz zwar nicht per se als Mitursache der Erkrankung in Betracht. Da die AML-Erkrankung durch viele verschiedene Mutationen und Translokationen jedoch eine sehr heterogene Erkrankung ist, stellt sich die Frage, ob eine NIR-Defizienz bei der Entstehung bestimmter AML-Unterformen mit bestimmten Mutationen oder Translokationen beteiligt sein könnte.

Bei HL60- und HNT34-Zellen fiel außerdem auf, dass sie bei nicht vorhandener NIR-Proteinexpression eine gleichzeitig starke TAp63-Proteinexpression aufwiesen. Eine sich auf Proteinebene beeinflussende Wechselwirkung von NIR- und TAp63-Menge oder eine direkte Interaktion der beiden Proteine konnten bisher nicht gezeigt werden [20]. So stellten bisherige Experimente zur NIR- und TAp63-Expression von Heyne *et al.* zwar fest, dass ein Knockdown von NIR mittels siRNA nicht zu einer Veränderung der Proteinmenge von TAp63 führte [20]. Auch eine Überexpression des Transkriptionsfaktors TAp63 mittels anschaltbaren Vektors führte zwar zu einer vermehrten Expression TAp63-nachgeschalteter Gene, nicht jedoch zu einer Veränderung der NIR-Menge [20]. Diese Betrachtungen, ob sich die Expressionslevel von TAp63 und NIR gegenseitig beeinflussen, erfolgten allerdings artifiziell. Unsere Untersuchungen fokussierten sich jedoch auf die intrinsische, natürlich vorhandene TAp63- und NIR-Proteinexpressionsmuster der AML-Zelllinien. Da sich in diesen bisherigen Untersuchungen NIR- und TAp63-Level nicht gegenseitig zu beeinflussen schienen, überraschte uns der in Kapitel 4.2.1 dargestellte Blot. Dieser zeigte, dass in AML-Zellen, in denen eine TAp63-Expression auf Proteinebene vorliegt, keine NIR-Expression vorzuliegen scheint. Auch andersherum zeigte sich bei NIR-exprimierenden Zellen keine TAp63-Expression. Insbesondere aufgrund der Tatsache, dass einige AML-Zellen – wie bereits oben beschrieben – von bisher bekannten Mustern abwichen, war diese Entdeckung im Hinblick auf eventuell bestehende Wechselwirkungen von NIR und TAp63 in AML-Zellen für uns interessant. Die Beobachtung dieser antagonistischen Expression von NIR und TAp63 traf auf Proteinebene bei 7 von 8 untersuchten AML-Zelllinien zu. Einzig Kasumi-1-Zellen wiesen dieses Muster nur einmal, nicht jedoch wiederholt auf. Ein Grund für die Diskrepanz bei Kasumi-1-Zellen ließ sich hier zwar nicht eruieren, zur weiteren Abklärung führten wir jedoch auch Untersuchungen auf Transkriptebene durch, siehe folgendes Kapitel.

Eine weitere Besonderheit wiesen KG1A-Zellen auf: sie zeigten einmal eine NIR-Expression bei gleichzeitig nicht vorhandener TAp63-Expression, einmal jedoch eine TAp63-Expression bei nicht vorhandener NIR-Expression. Bekanntermaßen können kultivierte Zelllinien im Laufe der Zeit ohne äußeres Zutun durch Zellstress mutieren. Möglicherweise könnte dieser Mechanismus auch hier zugrunde gelegen haben. Der Gegensatz bleibt jedoch erhalten: wenn die Zellen das NIR-Protein enthalten, enthalten sie kein TAp63-Protein und umgekehrt.

Es lässt sich festhalten, dass bei AML-Zellen auf Proteinebene ein antagonistischer Zusammenhang zwischen NIR- und TAp63-Expression zu existieren scheint. Dieses nachgewiesene antagonistische Expressionsmuster stützt die Hypothese von Heyne *et al.* und Duteil *et al.*, dass eine NIR-Expression die Acetylierung und somit die Transkription von p63 hemmt [20] [11]. Auf intrinsischem Wege scheint es in den Zellen zu einer gegenseitigen Beeinflussung von NIR und TAp63 zu kommen.

5.3.2 Genexpression auf Transkriptebene

Auch auf Transkriptebene zeigten HL60- und HNT34-Zellen keinerlei NIR-Expression. Dies bestätigte unsere bereits nach Durchsicht der Western Blots getätigte Hypothese, dass einige AML-Zellen trotz fehlender NIR-Expression überlebensfähig sind.

Anhand des Vergleiches von Western Blot und RT-PCR, sprich des Vergleiches der Analysen auf Protein- und RNA-Ebene, zeigte sich, dass sich die Effektivität der Translation von RNA hin zum Protein innerhalb der AML-Zelllinien unterschied. In TIB202-, Oci-AML-3- und MonoMac-1-Zellen war jeweils wenig NIR-Transkript vorhanden, NIR-Protein jedoch war bei all diesen Zelllinien in unterschiedlicher Ausprägung nachweisbar. Bei diesen schien, wie auch bei NB4-Zellen, eine effiziente Umschreibung zu Protein zu erfolgen. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei Kasumi-1-Zellen eine ineffiziente Umschreibung: obwohl auf Transkriptebene zwar viel – von allen Zelllinien sogar am meisten – NIR-Transkript vorhanden war, ließ sich in einem Western Blot kein NIR-Protein nachweisen. Trotz Transkript fand keine Translation zu Protein statt. Die Translation des NIR-Transkripts zum Protein könnte also reguliert sein.

Es gibt mehrere Mechanismen, die die Translationsinitiation hemmen oder beeinflussen können. Allerdings sind diese insbesondere in myeloischen Zellen noch nicht sehr gut untersucht. Es ist bekannt, dass an der Translationsinitiation in Eukaryonten etwa 10 eukaryotische Initiationsfaktoren (eIFs) beteiligt sind [27]. Einer dieser Translationsinitiationsfaktoren ist beispielsweise eIF4-E. Es wurde festgestellt, dass im Knochenmark von AML-Patienten eine Überexpression dieses Faktors vorliegt, was zu einer erhöhten Zellproliferation führt [27]. Khanna-Gupta zeigte 2 Wege der Regulation der Translationsinitiation in myeloischen Zellen auf: zum Einen gibt es die Möglichkeit der eIF4E-bindenden Proteine (4E-BPs), welche die Translation durch Bindung an den Translationsinitiationsfaktor eIF4E hemmen können [27] [40]. Eine weitere Möglichkeit ist die Phosphorylierung eines anderen Translationsinitiationsfaktors, nämlich eIF2 α , was ebenfalls zu einem Translationsstop führt [27].

Eine weitere Erklärung könnten die circa 19 - 23 Nukleotide langen miRNAs sein, die bestimmte Basensequenzen der mRNA erkennen, an sie binden und die Translation von der mRNA zum Protein in unterschiedlicher Weise beeinflussen [9] [47]. Je nach Grad der Sequenz-Übereinstimmung zwischen miRNA und mRNA kann die Ziel-mRNA gespalten und abgebaut oder lediglich die Translation zum Protein inhibiert werden, ohne dass es zur mRNA-Degradation

kommt [9] [24]. Durch miRNAs werden über 60 % der menschlichen RNA reguliert [15], sodass diese ein häufiges Phänomen darstellen.

Diese Mechanismen könnten der unterschiedlichen Effektivität der Translation vom mRNA-Transkript zum Protein zugrunde liegen. In Zellen mit ineffizienter Translation, wie Kasumi-1, könnte die Translation durch oben genannte Mechanismen stärker reguliert sein als in Zellen mit effizienter Translation, wie TIB202, Oci-AML-3, MonoMac-1 oder NB4.

Wir fragten uns zudem, ob sich das bereits auf Proteinebene festgestellte antagonistische Expressionsmuster zwischen NIR und TAp63 mittels RT-PCR auch auf Transkriptebene nachweisen lässt. HL60- und HNT34-Zellen zeigten, wie bereits im Western Blot, eine hohe p63-Expression bei nicht vorhandener NIR-Expression. Alle anderen Zelllinien wiesen bei unterschiedlich stark vorhandener NIR-Expression keine oder eine nur sehr geringe p63-Expression auf. Dies galt insbesondere für die Zelllinien Kasumi-1 und KG1A. In Zusammenschau mit den Ergebnissen des Western Blots lässt sich sagen, dass die Antikorrelation zwischen NIR und p63 auf Transkriptebene lokalisiert ist. Dies traf auf alle getesteten AML-Zelllinien zu.

Dieses Ergebnis stützt erneut die Hypothese von Heyne *et al.* und Duteil *et al.*, dass NIR die Acetylierung und daraus resultierend die Transkription von p63 hemmt, auch wenn sich in deren Untersuchungen NIR- und TAp63-Level nicht gegenseitig zu bedingen schienen [20] [11]. Umgekehrt wird jedoch nach Heyne *et al.* NIR selbst nicht direkt durch TAp63 beeinflusst [20]. Auf welche Weise umgekehrt eine vorhandene p63-Expression das Vorhandensein von NIR-Transkript reguliert, muss in nachfolgenden Experimenten weiter bestimmt werden.

Da p63 und NIR nicht durch eine direkte Bindung miteinander interagieren [20], könnte eine weitere Ursache für dieses auf Transkriptebene lokalisierte antagonistische Expressionsmuster beispielsweise eine Methylierung sein. Bei dieser werden Cytosinreste in der DNA an ihrer 5'-Position durch DNA-Methyltransferasen methyliert [51]. Dadurch kommt es zur Hemmung der Transkription von entsprechenden Genen, sodass nicht alle in der DNA vorhandenen Gene gleichzeitig exprimiert werden [51]. So würde ein möglicherweise in der DNA der AML-Zellen existierendes NIR- bzw. p63-Gen durch eine Methylierung nicht transkribiert werden, sodass es auf RNA-Ebene nicht mehr nachweisbar wäre. Die sich gegenseitig beeinflussende NIR- und p63-Expression könnte auf diesem Mechanismus beruhen, sodass möglicherweise bei vorhandener NIR-Expression das p63-Gen methyliert vorliegt und umgekehrt.

Eine Methylierung der DNA kann durch die DNA-Methyltransferase-Inhibitoren 5-Azacytidin oder 5-Aza-2'-Deoxycytidin, auch bekannt als Decitabine, verhindert werden [39]. Beide verwendet man bereits in der AML-Therapie. So könnte in nachfolgenden Arbeiten herausgefunden werden, ob die nicht gleichzeitig vorliegende NIR- und p63-Expression durch eine sich gegenseitig beeinflussende Methylierung zustande kommt.

5.3.3 Knockdownexperimente

Um oben genannter Entdeckung der sich gegenseitig scheinbar antagonistisch beeinflussbaren p63- und NIR-Expression weiter auf den Grund zu gehen, versuchten wir, einen NIR-Knockdown in den AML-Zellen herbeizuführen, um zu untersuchen, wie dies die p63-Expression beeinflusst. Unserer Hypothese zufolge könnte ein Knockdown von NIR mit einer erhöhten Expression von p63 einhergehen.

NB4-Zellen wiesen im unbehandelten Zustand keine p63-Expression auf. Wir konnten in NB4-Zellen zwar einen erfolgreichen NIR-Knockdown durchführen, anstelle von p63-Produkten waren jedoch sowohl im unveränderten Zustand als auch nach NIR-Knockdown nur unspezifische PCR-Produkte nachweisbar. Auch in anderen Arbeiten (Heyne *et al.*, 2010) konnte dieser Effekt gezeigt werden, in artifiziell veränderten Zellen gab es bei einem NIR-Knockdown ebenfalls keine Veränderung der p63-Level [20]. Es lässt sich festhalten, dass zwar intrinsisch eine Beeinflussung von NIR- und TAp63-Leveln zu existieren scheint, diese jedoch in NB4-Zellen nicht artifiziell beeinflussbar ist. Da wir die Knockdown-Experimente lediglich an genannten NB4-Zellen durchführten, sollten weitere Experimente zeigen, ob diese Tatsache auch auf weitere AML-Zelllinien übertragbar ist.

5.3.4 Gesamtausblick

Alle in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse hinsichtlich NIR- und p63-Expression auf Protein- und Transkriptebene sowie die Erkenntnis des antagonistischen Expressionsmusters beziehen sich auf 8 der vielen existierenden AML-Zelllinien. Zukünftige Untersuchungen könnten sich mit der Frage beschäftigen, ob die hier vorliegenden Ergebnisse auf weitere AML-Zelllinien übertragbar sind. Dabei wird es von Vorteil sein, einen Knockdown bestimmter Gene herbeiführen zu können. Hierfür kann unser Protokoll zu Hilfe genommen werden. Es war jedoch zunächst nur an NB4-Zellen erfolgreich, sodass zukünftige Experimente der Frage nachgehen könnten, ob ein NIR-Knockdown mittels GapmeRs bei weiteren AML-Zellreihen ebenfalls zum Erfolg führt.

Weitere Untersuchungen am NIR-Protein in AML-Zellen und ein gezielter Knockdown ebendieses Proteins dürften zu einer verbesserten Erkenntnis des Einflusses von NIR auf die Krankheit der AML beitragen. Es bleibt zu hoffen, dass eine eventuelle Rolle in der Krankheitsentstehung und der Einfluss auf das Wachstum dieser malignen Zellen weiter beleuchtet werden und möglicherweise Wege für neue Therapeutika eröffnet werden können.

6 Zusammenfassung

In hämatologischen Zellen von Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie (AML) wurden Zellen gefunden, die den Novel INHAT Repressor NIR auf Proteinebene nicht exprimierten [8]. Dieses ubiquitär exprimierte Protein sorgt für eine Inhibierung der Histonacetylierung [23], blockiert so eine Auflockerung der Histonbindungen und daraus resultierend eine erleichterte Gentranskription [29]. NIR wirkt zusammengefasst als Repressor der Transkriptionsinitiation [20] [23]. Auch nach weiteren Untersuchungen stellten wir fest, dass manche AML-Zelllinien NIR nicht exprimieren. Diese Entdeckung war verwunderlich, da bis zu diesem Zeitpunkt davon ausgegangen wurde, dass Zellen ohne das NIR-Protein nicht überlebensfähig sind [33] [11] [21]. Vorausgegangene Arbeiten hatten gezeigt, dass es durch einen NIR-Knockout bei Mäusen zu einer gestörten Embryogenese kommt, sodass alle Maus-Embryonen sterben [11] [21]. Ein dauerhafter NIR-Knockdown wird auch von den meisten Zelltypen nicht toleriert [21]. Eine Ausnahme von dieser Regel scheint die AML zu bilden.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, welche der untersuchten AML-Zellen eine NIR- und eine p63-Expression auf Protein- und Transkriptionsebene aufweisen. Wir untersuchten, ob ein Zusammenhang zwischen NIR- und p63-Expression existiert und auf welcher Ebene dieser lokalisiert ist. Nach Kultivierung der AML-Zelllinien verwendeten wir hierfür Standard-Wester-Immunoblots und quantitative Real-Time-PCRs. Außerdem sollte ein Protokoll für die Methode der Gymnosis mittels LNA-GapmeRs zum Herbeiführen eines Knockdowns in AML-Zellen etabliert werden. Hierbei handelte es sich um eine unassistierte Aufnahme von antisense-DNA-Molekülen, d. h. ohne den Einsatz von Transfektionsreagenzien in die Zelle [46].

Wir konnten zeigen, dass mit den beiden AML-Zelllinien HL60 und HNT34 entgegen vorheriger Annahmen Zellen existieren, die weder NIR-Protein noch -Transkript exprimieren. Alle getesteten AML-Zelllinien zeigten außerdem eine unterschiedlich stark ausgeprägte NIR-p63-Antikorrelation auf Protein- und Transkriptebene, sodass bei starker NIR-Expression keine oder nur eine geringe p63-Expression vorhanden ist und vice versa. Es ließ sich feststellen, dass dieser antagonistische Zusammenhang zwischen NIR und p63 auf Transkriptebene lokalisiert ist. Desweiteren konnten wir erfolgreich ein Protokoll für die Gymnosis mittels LNA-GapmeRs an der AML-Zelllinie der NB4-Zellen etablieren. Nach einer bis zu 7-tägigen Behandlung der AML-Zellen ließ sich die Menge des NIR-Transkriptes um bis zu 77 % reduzieren.

Zukünftige Studien mit der Frage nach Ausweitung der hier vorhandenen Ergebnisse auf weitere AML-Zelllinien könnten zu einem besseren Verständnis des NIR-Proteins, dessen Rolle bei der AML und möglicherweise zu neuen therapeutischen Ansätzen führen. Mit der Etablierung eines Protokolls zur Herbeiführung eines Knockdowns in AML-Zellen konnten wir für weitere Untersuchungen diesbezüglich ein Werkzeug an die Hand geben.

7 Summary

It was discovered that the Novel INHAT Repressor NIR was not expressed at the protein level in some of the hematological cells from patients with acute myeloid leukaemia [8]. This ubiquitously expressed protein inhibits histone acetylation [23], thus blocking loosened histone binding and resulting in facilitated gene transcription [29]. In summary, NIR acts as a repressor of transcription initiation [20] [23]. Our further investigation also revealed that some AML cell lines do not express NIR. This discovery was surprising, since up to this point it was assumed that cells and organisms are not able to survive without NIR protein [33] [11] [21]. Previous work had shown that NIR knockout in mice leads to impaired embryogenesis, resulting in the death of all mouse embryos [11] [21]. Most cell types also cannot withstand permanent NIR knockdown [21]. AML appears to be an exception to this rule.

This study named „Expression pattern of Novel INHAT repressor NIR and p63 gene with protocol establishment for NIR knockdown in AML cell lines“ addresses the issue of which examined AML cells express p63 and NIR at the transcriptional and protein levels. We looked into whether NIR and p63 expression are related, as well as where this relationship is localised. The level at which any correlation is localised should be investigated. After cultivating the AML cell lines, we used standard Western immunoblots and quantitative real-time PCRs for this purpose. In addition, a protocol for the method of gymnosis using LNA-GapmeRs to induce knockdown in AML cells was to be established. This involved unassisted uptake of antisense DNA segments without transfection reagent into the cell [46].

We were able to show that, contrary to previous assumptions, the two AML cell lines HL60 and HNT34 contain cells that express neither NIR protein nor NIR transcript. Additionally, all investigated AML cell lines exhibited variable degrees of antagonistic connection between NIR and p63 expression at the transcript and protein levels, meaning that when NIR expression is strong, p63 expression is very low or absent, and vice versa. The antagonistic connection between p63 and NIR was discovered to be transcript-level localised. Furthermore, we were able to successfully establish a protocol for gymnosis using LNA-GapmeRs on the AML cell line of NB4 cells. After treatment of the AML cells for up to 7 days, the amount of NIR transcript was reduced by up to 77 %.

Future studies with the question of extending the results obtained here to other AML cell lines could lead to a better understanding of the NIR protein, its role in AML and possibly to new therapeutic approaches. By establishing a protocol for inducing knockdown in AML cells, we were able to provide a tool for further investigations in this regard.

8 Literaturverzeichnis

1. Baldus CD, Bullinger L (2008) Gene Expression With Prognostic Implications in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia. *Semin Oncol* 35:356–364
2. Bennett CF, Swayze EE (2010) RNA Targeting Therapeutics: Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides as a Therapeutic Platform. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 259–295
3. Bullinger L, Döhner K, Dohner H (2017) Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways. *J Clin Oncol* 35:934–946
4. Candi E, Agostini M, Melino G, Bernassola F (2014) How the TP53 Family Proteins TP63 and TP73 Contribute to Tumorigenesis: Regulators and Effectors. *Hum Mutat* 35:702–714
5. Chen B, Dong C, Wang F, Wu J (2021) Knockdown of NIR Suppresses Breast Cancer Cell Proliferation via Promoting FOXO3. *Onco Targets Ther* 14:637–651
6. Dohn M, Zhang S, Chen X (2001) p63alpha and deltaNp63alpha can induce cell cycle arrest and apoptosis and differentially regulate p53 target genes. *Oncogene* 20:3193–3205
7. Dolgin E (2017) The greatest hits of the human genome. *Nature* 427–431
8. Dolnik A, Thurner L, Bewarder M, Schlenk RF, Döhner K, Schüle R, Metzger E, Bullinger L, Roemer K, Heyne K Differential expression and co-expressed gene signature suggest pathogenic relevance of NIR, a regulator of the p53/p63/p73 family of transcription factors, in AML. Unveröffentlichtes Manuskript.
9. Dong H, Lei J, Ding L, Wen Y, Ju H, Zhang X (2013) MicroRNA: Function, detection, and bioanalysis. *Chem Rev* 113:6207–6233
10. Douc-rasy S, Ahomadegbe J (2003) TP53 Family Members and Human Cancers. *Hum Mutat* 191:182–191
11. Duteil D, Tourrette Y, Eberlin A, Willmann D, Patel D, Friedrichs N, Müller JM, Schüle R (2018) The histone acetyltransferase inhibitor Nir regulates epidermis development. *Development* 145:dev158543
12. El-deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B (1993) WAF1, a Potential Mediator of p53 Tumor Suppression. *Cell* 75:817–825
13. Fazil MHUT, Ong ST, Chalasani MLS, Low JH, Kizhakeyil A, Mamidi A, Lim CFH, Wright GD, Lakshminarayanan R, Kelleher D, Verma NK (2016) GapmeR cellular internalization by macropinocytosis induces sequence-specific gene silencing in human primary T-cells. *Sci Rep* 6:1–13
14. Flores ER, Tsai KY, Crowley D (2002) p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Lett to Nat* 416:560–564
15. Friedman RC, Farh KKH, Burge CB, Bartel DP (2009) Most mammalian mRNAs are

- conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19:92–105
16. Gonfloni S, Caputo V, Iannizzotto V (2015) P63 in health and cancer. *Int J Dev Biol* 93:87–93
 17. Grimwade D, Hills RK, Moorman A V., Walker H, Chatters S, Goldstone AH, Wheatley K, Harrison CJ, Burnett AK (2010) Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* 116:354–365
 18. Gu W, Roeder RG (1997) Activation of p53 Sequence-Specific DNA Binding by Acetylation of the p53 C-Terminal Domain. *Cell* 90:595–606
 19. Haferlach T (2022) *Hämatologische Erkrankungen*. 3rd edition. Springer Verlag, Berlin Heidelberg
 20. Heyne K, Willnecker V, Schneider J, Conrad M, Raulf N, Schule R, Roemer K (2010) NIR, an inhibitor of histone acetyltransferases, regulates transcription factor TAp63 and is controlled by the cell cycle. *Nucleic Acids Res* 38:3159–3171
 21. Heyne K, Förster J, Schüle R, Roemer K (2014) Transcriptional repressor NIR interacts with the p53-inhibiting ubiquitin ligase MDM2. *Nucleic Acids Res* 42:3565–3579
 22. Hsu P hsin, Hanawalt PC, Nospikel T (2007) Nucleotide excision repair phenotype of human acute myeloid leukemia cell lines at various stages of differentiation. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* 614:3–15
 23. Hublitz P, Kunowska N, Mayer UP, Müller JM, Heyne K, Yin N, Fritzsche C, Poli C, Miguet L, Schupp IW (2005) NIR is a novel INHAT repressor that modulates the transcriptional activity of p53. *Genes Dev* 19:2912–2924
 24. Hutvagner G, Zamore PD (2002) A microRNA in a Multiple-Turnover RNAi Enzyme Complex. *Science* (80-) 297:2056–2060
 25. Jackson AL, Linsley PS (2010) Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat Rev Drug Discov* 9:57–67
 26. Karlsen KK, Wengel J (2012) Locked nucleic acid and aptamers. *Nucleic Acid Ther* 22:366–370
 27. Khanna-Gupta A (2011) Regulation and deregulation of mRNA translation during myeloid maturation. *Exp Hematol* 39:133–141
 28. Lane DP, Bourdon J (2006) p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ* 962–972
 29. Lee KK, Workman JL (2007) Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:284–295
 30. Levine AJ (2020) p53: 800 million years of evolution and 40 years of discovery. *Nat Rev Cancer* 20:471–480
 31. Li Y, Wang L, Liu X, Zhang C, Du X, Xing B (2021) NIR promotes progression of

- colorectal cancer through regulating RB. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1868:118856
32. Lu S, Chen Z, Liu Z, Liu Z (2023) Unmasking the biological function and regulatory mechanism of NOC2L: a novel inhibitor of histone acetyltransferase. *J Transl Med* 1–12
 33. Ma CA, Pusso A, Wu L, Zhao Y, Hoffmann V, Notarangelo LD, Fowlkes BJ, Jain A (2014) Novel INHAT repressor (NIR) is required for early lymphocyte development. *Proc Natl Acad Sci* 111:13930–13935
 34. Macpartlin M, Zeng S, Lee H, Stauffer D, Jin Y, Thayer M, Lu H (2005) p300 Regulates p63 Transcriptional Activity. *J Biol Chem* 280:30604–30610
 35. Manzo F, Tambaro FP, Mai A, Altucci L (2009) Histone acetyltransferase inhibitors and preclinical studies. *Expert Opin Ther Pat* 19:761–774
 36. Matzdorff A, Duckert M, Fritze D (2018) *Duale Reihe Innere Medizin - Akute myeloische Leukämie*. 4. edition. Georg Thieme Verlag KG
 37. Mills AA, Zheng B, Wang X (1999) p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *398:708–713*
 38. Nag S, Qin J, Srivenugopal KS, Wang M, Zhang R (2013) The MDM2-p53 pathway revisited. *J Biomed Res* 27:254–271
 39. Navada SC, Steinmann J, Lübbert M, Silverman LR (2014) Clinical development of demethylating agents in hematology. *J Clin Invest* 124:40–46
 40. Pause A, Belsham GJ, Gingras A-C, Donzé O, Lin T, Lawrence JC, Sonenberg N (1994) Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* 371:762–767
 41. Petersen M, Wengel J (2003) LNA: A versatile tool for therapeutics and genomics. *Trends Biotechnol* 21:74–81
 42. QIAGEN® (2017) *Antisense LNA® GapmeRs Handbook*.
 43. Röllig C, Ayuk FA, Braess J, Heuser M, Manz MG, Passweg J, Reinhardt D, Schlenk RF, Zebisch A (2022) *Onkopedia Leitlinie Akute Myeloische Leukämie (AML)*. URL: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-myeloische-leukaemie-aml/@@guideline/html/index.html>
 44. Senoo M, Pinto F, Crum CP, Mckeeon F (2007) p63 Is Essential for the Proliferative Potential of Stem Cells in Stratified Epithelia. *Cell* 129:523–536
 45. Smits VAJ, Klompaker R, Vallenius T, Rijksen G, Ma TP, Medema H (2000) p21 Inhibits Thr161 Phosphorylation of Cdc2 to Enforce the G2DNA Damage Checkpoint. *J Biol Chem* 275:30638–30643
 46. Soifer HS, Koch T, Lai J, Hansen B, Hoeg A, Oerum H, Stein CA (2012) Silencing of Gene Expression by Gymnotic Delivery of Antisense Oligonucleotides. *Methods Mol Biol* 815:333–346
 47. Starega-Roslan J, Krol J, Koscianska E, Kozlowski P, Szlachcic WJ, Sobczak K,

- Krzyzosiak WJ (2011) Structural basis of microRNA length variety. *Nucleic Acids Res* 39:257–268
48. Su X, Gi YJ, Chakravarti D, Chan IL, Zhang A, Xia X, Tsai KY, Flores ER (2012) TAp63 Is a Master Transcriptional Regulator of Lipid and Glucose Metabolism. *Cell Metab* 16:511–525
49. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD (2002) The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 100:2292–2302
50. Vousden KH, Prives C (2009) Review Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 3:413–431
51. Wagener C, Müller O (2010) *Molekulare Onkologie*. 3. edition. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart
52. Wu G, Nomoto S, Hoque MO, Dracheva T, Osada M, Lee CR, Dong SM, Guo Z, Benoit N, Cohen Y, Rechthand P, Califano J, Moon C, Ratovitski E, Jen J, Sidransky D, Trink B (2003) DeltaNp63alpha and TAp63alpha Regulate Transcription of Genes with Distinct Biological Functions in Cancer and Development. *Cancer Res* 63:2351–2357
53. Wu J, Zhang Y, Wang Y, Kong R, Hu L, Schuele R, Du X, Ke Y (2012) Transcriptional Repressor NIR Functions in the Ribosome RNA Processing of Both 40S and 60S Subunits. *PLoS One* 7:1–10
54. Wu L, Ma CA, Zhao Y, Jain A (2011) Aurora B Interacts with NIR-p53, Leading to p53 Phosphorylation in Its DNA-binding Domain and Subsequent Functional Suppression. *J Biol Chem* 286:2236–2244
55. Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Do V, Andrews NC, Caput D, Mckeon F (1998) p63, a p53 Homolog at 3q27-29, Encodes Multiple Products with Transactivating, Death-Inducing, and Dominant-Negative Activities. *Mol Cell* 2:305–316

9 Danksagung

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Frau PD Dr. rer. nat. Kristina Heyne, für die Überlassung der Arbeit, für die super Betreuung und dafür, dass ich mich mit allen Fragen jederzeit an dich wenden konnte! Ein ganz herzlicher Dank geht ebenso an Herrn Prof. Dr. rer. nat. Klaus Römer für die Unterstützung bei jeglichen Fragen und Problemen. Eine bessere Betreuung als eure hätte ich mir kaum wünschen können. Ein weiterer besonders großer Dank geht an Frau Birgit Bette. Ohne dich hätte ich mich niemals im Zellkultur- und Labordschungel auch nur halbwegs zurechtfinden können. Vielen Dank für deine Geduld und Hilfe bei allen Fragen und Problemen, die sich bei mir als blutige Anfängerin so ergeben haben! Ein Riesen-Dankeschön auch an euch, Frau Gabi Carbon, Frau Natalie Fadle, Frau Evi Regitz und Frau Claudia Schormann, dafür, dass ich euch jederzeit alles fragen konnte und ihr mir immer weitergeholfen habt. Vielen Dank an das gesamte Carreras-Team für die tolle und entspannte, kollegiale Atmosphäre, die immer geherrscht hat!



Abb. 9.1: Unterhaltung am -70 °Celsius-Gefrierschrank. Danke auch an Kristina für die – im wahrsten Sinne des Wortes – erfrischenden Tiefkühlschrank-Unterhaltungen!

Ein großer Dank geht auch an euch, an meine Familie, an meine Mutter, an meinen Vater und an meinen Bruder für eure Unterstützung, euer Interesse am Fortgang der Arbeit und das Korrekturlesen!

Ein großes Danke außerdem an dich, Philipp, für deine Unterstützung, das Zuhören und Wieder-Aufmuntern, wenn du der Erste warst, der meine Laune nach einem langen Uni-, Labor- oder Arbeitstag mitbekommen hast.

Ohne euch alle wäre ein Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank!

10 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

11 Abkürzungen

A:	Ampere
AA:	Acrylamid
aa:	aminoacids
Abb.:	Abbildung
A. dest.:	Aqua destillata
AK:	Antikörper
APS:	Ammoniumperoxidsulfat
AS:	Aminosäuren
bp:	Basenpaare
bzw.:	beziehungsweise
°C:	Grad Celcius
ca.:	circa
cDNA:	komplementäre DNA
DA:	Dalton
DAPI:	4',6-Diamidino-2-phenylindol
d.h.:	das heißt
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
DNase:	Desoxyribonuklease
dNTP:	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DSMZ:	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT:	1,4-Dithiothreitol
ECL:	enhanced chemoluminescence
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und Mitarbeiter
FACS:	Fluorescence Activated Cell Sorting
FAM:	6-FAM-phosphoramidit
FCS:	fötales Kälberserum
g:	Gramm
GAPDH:	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
h:	Stunde
HAT:	Histon-Acetyltransferase
HCl:	Salzsäure
HDAC:	Histon-Deacetylase
h. i.:	hitzeinaktiviert
H ₂ O ₂ :	Wasserstoffperoxid

INHAT:	Inhibitor of Histon-Acetyltransferase
HRP:	Meerrettichperoxidase
JCRB Cell Bank:	National Institute of Biomedical Innovation, Health and Nutrition
Kap.:	Kapitel
kbp:	Kilobasenpaare
kDa:	Kilodalton
M:	Molar
m:	milli
mA:	Milliampere
μ:	Mikro
min:	Minute
miRNA:	microRNA
MDS:	Myelodysplastisches Syndrom
mRNA:	Messenger-Ribonukleinsäure
NaOH:	Natriumhydroxid
NIR:	Novel INHAT Repressor
PAGE:	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS:	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR:	Polymerasekettenreaktion
POX:	Peroxidase
RNA:	Ribonukleinsäure
RNAse:	Ribonuklease
SDS:	Natriumdodecylsulfat
TAE:	TRIS-Acetat-EDTA
TE:	TRIS/EDTA
Rpm:	rounds per minute
RT:	Raumtemperatur
RT-PCR:	Real-Time-PCR
s.:	siehe
sec:	Sekunde
SDS:	Natriumlaurylsulfat
siRNA:	small interfering Ribonukleinsäure
Tab.:	Tabelle
TEMED:	N, N, N', N' - Tetramethylethylendiamin
Tm:	Schmelztemperatur
Tris:	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethane
u. U.:	unter Umständen

U:	Unit
u. a.	unter anderem
UV:	ultraviolett
V:	Volt
v. a.:	vor allem
z. B.:	zum Beispiel