

Aus der Medizinischen Universitätsklinik
Abteilung Innere Medizin I
(Hämatologie und Onkologie)
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau

Selektion und Identifizierung leukämiezellbindender Peptidliganden

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Medizinischen Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg im Breisgau

vorgelegt 2008

von Sonja Adebahr
geboren in Henstedt-Ulzburg

Dekan:	Prof. Dr. Christoph Peters
Gutachter:	Prof. Dr. Martin Trepel
Gutachter:	Prof. Dr. Michael Henke
Jahr der Promotion:	2009

meinen Eltern

1	EINLEITUNG	3
1.1	Akute myeloische Leukämien	3
1.2	Leukämiezell-Oberflächenproteine, ihre Funktion und ihre klinische Bedeutung	5
1.3	Die chromosomale Translokation (8;21) und das Fusionsprotein AML1/ETO	7
1.3.1	Die chromosomale Translokation (8;21)	7
1.3.2	AML1	7
1.3.3	ETO	7
1.3.4	Das Fusionsprotein AML1/ETO	8
1.3.5	Ponasteron A-induzierbare AML1/ETO-Expression in einem humanen monoblastären U937-Zellsystem	11
1.4	Rezeptor-Targeting mit Phagen-Peptidbanken	12
1.5	Zielsetzung der Untersuchungen	16
2	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	Material	17
2.1.1	Zellen	17
2.1.1.1	Primäre Zellen akuter myeloischer Leukämien	17
2.1.1.2	Zellen gesunder Spender	17
2.1.1.3	Zelllinien	17
2.1.1.4	AML1/ETO- induzierbares Zellsystem	19
2.1.2	Medien und Zusätze für die Zellkultur	19
2.1.3	Bakterien	20
2.1.4	Medien und Zusätze für die Bakterienkultur	20
2.1.5	Phagen-Peptidbanken, Negativkontrollphagen	20
2.1.6	Materialien für molekularbiologische Arbeiten	21
2.1.6.1	Chemikalien und Reagenzien	21
2.1.6.2	Standard-Lösungen und Puffer	22
2.1.6.3	Enzyme	23
2.1.6.4	Nukleinsäuren und Plasmide	23
2.1.6.5	Antikörper	23
2.1.6.6	Kits zur Bearbeitung von Nukleinsäuren	23
2.1.6.7	Sonstige Materialien	23
2.1.7	Geräte	23
2.1.8	Spezielle bioinformatische Software	23
2.2	Methoden	24
2.2.1	Gewinnung und Aufreinigung primären Zellmaterials	24
2.2.2	Zellkultur	25
2.2.3	Phagen-Peptidbanken, Phagenlösungen	25
2.2.4	Generierung von inserthaltigen Negativkontrollphagen	26
2.2.5	Titerbestimmung von Bakteriophagenlösungen	26
2.2.6	Übersicht über das Selektionsverfahren	26
2.2.6.1	Negativselektion: Vorreinigung einer Phagen-Peptidbank	27
2.2.6.2	Positivselektion: Inkubation von vorgereinigten Peptidbanken auf Ziel-Zellen	28
2.2.6.3	Isolierung zellgebundener Phagen	30
2.2.6.4	Bakterielle Amplifikation gewonnener Phagen	31
2.2.6.5	Aufreinigung von Phagenlösungen durch Präzipitation	32
2.2.7	Gen-Sequenzierung selektierter Phagen	33
2.2.8	Induktion der AML1/ETO-Expression in einem Ecdyson-inuzierbaren U937-Zellsystem	34
2.2.9	Western-Blot	35
2.2.10	Selektionsverfahren auf einem AML1/ETO-induzierbaren Zellsystem	35
2.2.11	Einzelklonbindungsversuche	37
2.2.11.1	Einzelklonbindungsversuche auf primären Zellen einer AML1/ETO-positiven Leukämie	38

3	ERGEBNISSE	40
3.1	Selektion und Identifizierung leukämiezellbindender Peptidliganden	40
3.1.1	Selektion von Peptidliganden aus einer zyklischen Phagen-Peptidbank (CX ₇ C) auf primären myeloischen Leukämiezellen ex vivo.....	40
3.1.2	Sequenzierung von auf primären Leukämiezellen selektierten Phagen.....	42
3.1.3	Einzelklonbindungsversuche: Peptidvermittelte Bindung des selektierten Klons RIV-36 an myeloische Leukämiezellen	42
3.1.3.1	Einzelklonbindungsversuche von RIV-36 auf primären Leukämiezellen und mononukleären Zellen gesunder Spender	44
3.1.3.2	Einzelklonbindungsversuche von RIV-36 auf Zelllinien in Kultur	45
3.2	Selektion einer Phagen-Peptidbank auf AML1/ETO-exprimierenden U937-Zellen	48
3.2.1	Ponasteron A-induzierte AML1/ETO-Expression in einem stabil transfizierten U937-Zellklon (9/14/18)	48
3.2.2	Selektion von Peptid-Phagen auf einem AML1/ETO- exprimierenden U937-Zellsystem....	48
3.2.3	Sequenzierung der auf AML1/ETO-exprimierenden U937-Zellen selektierten Peptid-Phagen.....	50
3.2.4	Einzelklonbindungsversuche: Peptidvermittelte Bindung der Klone AIE-15, AIE-17 und AIE-31 an AML1/ETO-positive Zellen	52
3.2.4.1	Einzelklonbindungsversuche von AIE-15, AIE-17 und AIE-31 auf dem stabil transfizierten U937-Zellsystem mit induzierbarer AML1/ETO-Expression	52
3.2.4.2	Einzelklonbindungsversuche von AIE-15, AIE-17, AIE-31 auf konstitutiv AML1/ETO-exprimierenden Zelllinien.....	53
3.2.4.3	Einzelklonbindungsversuche von AIE-15, AIE-17 und AIE-31 auf primären AML1/ETO-positiven Leukämiezellen	56
4	DISKUSSION	59
4.1	Überblick	59
4.2	„Phage display“ auf primären akuten myeloischen Leukämiezellen	60
4.3	Identifizierung AML- Blasten bindender Peptide	63
4.4	Peptidvermittelte Bindung des Phagenklons RIV-36 an akute Leukämiezellen und mononukleäre Zellen gesunder Spender	64
4.5	Peptidliganden für AML1/ETO-positive Zellen	64
4.5.1	Selektionsmodell und Identifizierung	66
4.5.2	Überprüfung der peptidvermittelten Bindung an AML1/ETO-positive Zellen in Einzelklonbindungsversuchen.....	68
4.6	Perspektiven und Ausblick	69
5	ZUSAMMENFASSUNG	72
6	LITERATURVERZEICHNIS	73
7	DANKSAGUNG	81
8	CURRICULUM VITAE	82

1 Einleitung

1.1 Akute myeloische Leukämien

Die Grundlage der humanen Hämatopoese bildet ein anzahlmäßig begrenzter Pool an pluripotenten Stamm-, respektive multipotenten Progenitorzellen, aus denen alle Zellen der lymphozytären und myeloischen Zellreihe hervorgehen (Cheung et al., 2006). Die Myelopoese umfasst dabei durch Zellteilungs- und Differenzierungsprozesse die Entwicklung von granulozytären, monozytären, erythroiden und megakaryozytären Zellen aus einer myeloischen Progenitorzelle. In jedem Differenzierungsstadium weist eine Zelle entsprechend ihrer Differenzierungslinie ein charakteristisches Expressionsmuster auf, unter anderem somit auch ein für Differenzierungsstadium und Zelllinie charakteristisches Oberflächenmarkerprofil. Auch die Regulation der Proliferations- und Differenzierungskontrollen ist für eine bestimmte Zelllinie in einem bestimmten Entwicklungsstadium physiologisch festgelegt. Genetische Veränderungen, meist erworbener Natur, einer einzelnen Stamm- oder Progenitorzelle können zu Synthese-, Interaktions- und Funktionsstörungen von Faktoren dieses komplexen regulatorischen Netzwerks führen. Sukzessive kann es zu unkontrolliertem Wachstum eines malignen myeloischen Zell-Klons, einer Leukämie, kommen. Das so veränderte Expressionsprofil der Zelle bringt in vielen Fällen auch eine von der transformierenden Veränderung abhängige Änderung des Oberflächenprofils der myeloischen Leukämiezellen mit sich.

Unter akuten myeloischen Leukämien (AML) wird eine heterogene Gruppe hämatopoetischer Malignome zusammengefasst, deren maligner Ursprung sich in transformierenden Veränderungen der myeloischen Progenitorzelle oder der pluripotenten Stammzelle findet. Das unkontrollierte Wachstum und die gestörte Differenzierung dieser Zellen führen zu einer Verschiebung der Zellzusammensetzung der Hämatopoese zu Gunsten unreifer myeloischer Blasten. Diese zeigen nicht nur die unreife morphologische Dominanz des neoplastischen Klons, sondern weisen je nach Zelllinie und transformationsbedingter Differenzierung häufig ein für die Subgruppierung spezifisches Profil an Oberflächenmarkern auf. Verschiedene chromosomale Rearrangements und die daraus resultierenden molekularen Abnormalitäten zeigen dabei Korrelationen mit entsprechenden phänotypischen Merkmalen wie Morphologie, Oberflächen-Antigen-Profil und Reifungsgrad mit entsprechenden Expressionsmustern (Sawyers, 1997). Auch klinische Eigenschaften und therapeutische Ansatzpunkte sind mit den entsprechenden molekularen Aberrationen assoziiert.

Die im klinischen Alltag noch immer angewandte FAB-Klassifizierung (French-American-British) der AML basiert auf zytochemischen, morphologischen und differenzierungsspezifischen Charakteristika (Bennett et al., 1985; Bitter et al., 1987). Akute myeloische Leukämien werden hier in die FAB-Subgruppen M0 bis M7 untergliedert. Die häufigste AML

im Erwachsenen- und Kindesalter ist nach dieser Klassifikation mit 25-30% die myeloblastische Leukämie mit Ausreifung, M2. Zytogenetisch ist diese Subgruppe durch das häufige Auftreten der Translokation (8; 21)(q22; q22) gekennzeichnet. Solche Translokationen führen zur Fusion zweier Gene und damit zur Expression eines chimären Proteins, welches sich sowohl strukturell als auch funktionell vom Wildtyp-Protein unterscheidet. Fusionsproteine enthalten häufig Komponenten von Signaltransduktionswegen (z.B. Tyrosinkinase, die bei Erkrankungen aus dem myeloproliferativen Formenkreis typischerweise aktiviert sind) oder auch Elemente, die zur Familie der Transkriptionsregulatoren bzw. Transkriptionsfaktoren gehören (Kamps et al., 1990; Inaba et al., 1992; Thirman et al., 1993; Zeleznik-Le et al., 1995). Hieraus resultiert die Vermutung, dass transkriptionelle Dysregulation und daraus resultierend Fehler in der Differenzierungs- und Proliferationssteuerung ein Prinzip der Entstehung von akuten myeloischen Leukämien darstellen (Rabbits, 1994). Eine weitere bei AML beschriebene transformierende molekulare Veränderung findet sich in der chromosomalen Inversion, bei welcher ein bestimmtes Gen unter Kontrolle eines anderen Promotors gelangt, und somit aberrant abgelesen wird. Inversionen findet man allerdings seltener als balancierte Translokationen, welche die häufigsten genetischen Abberationen bei AML sind (Rowley, 1990).

Die akute myeloische Leukämie geht nach wie vor für die Mehrheit der Patienten mit einer sehr schlechten Prognose einher. Auch moderne Therapieverfahren mit komplexen Kombinationen zahlreicher Chemotherapeutika, der autologen oder allogenen Blutstammzelltransplantation können die Langzeitüberlebensraten in der Mehrzahl der Fälle (abhängig vom Karyotyp) nicht deutlich über 30% steigern (King et al., 2007). Die begrenzte Wirksamkeit der gegenwärtig verfügbaren Therapien ist partiell auf ihre starke unspezifische Toxizität zurückzuführen, die einer Dosissteigerung der Medikation oder oft auch nur einer planmäßigen Durchführung der Therapie häufig entgegensteht und in Abhängigkeit vom Alter und Allgemeinzustand der Patienten nicht selten zu therapieinduzierten Todesfällen führt. Die unbefriedigenden Therapieerfolge zeigen die Notwendigkeit der Entwicklung neuer zielgerichteter Therapieansätze zur Behandlung der AML auf. Einige solcher zielgerichteten Substanzen befinden sich derzeit in klinischer Erprobung wie z.B. Farnesyltransferaseinhibitoren, Histondeacetylaseinhibitoren, Proteasomeninhibitoren oder Angiogenesehemmer (King et al., 2007; Stone, 2007). Ein alternativer Therapieansatz findet sich in der Adressierung AML-zellspezifischer Oberflächenrezeptoren durch mit antineoplastischen Komponenten konjugierte Liganden.

1.2 Leukämiezell-Oberflächenproteine, ihre Funktion und ihre klinische Bedeutung

Die Kenntnis über einen AML-zelltypspezifisch bindenden Liganden könnte genutzt werden, zielgerichtet antineoplastische Substanzen (z.B. ein Zytostatikum) auf den Zelltyp des Interesses zu lenken. So würde deren Effizienz gesteigert und unerwünschte Wirkungen auf Zellen, die nicht dem Therapieziel entsprechen, vermieden. Für Zellen der akuten myeloischen Leukämie ist ein solcher wirklich spezifischer Ligand nicht bekannt. Hinsichtlich solider Tumoren wurden in den letzten Jahren experimentelle Ansätze beschrieben, in denen zytotoxische Substanzen an Moleküle gekoppelt wurden, die sich nach intravenöser Injektion selektiv in dem neoplastischen Gewebe anreicherten und somit im Vergleich zum ungekoppelten Medikament überlegene Effizienz bei erheblich weniger Nebenwirkungen zeigten (Arap et al., 1998; Arap et al., 2002; Ellerby et al., 1999).

In Unkenntnis eines leukämiespezifisch bindenden Liganden ist ein solcher Ansatz für akute myeloische Leukämien bisher nicht durchführbar. Ein seit längerer Zeit verfügbares Konjugat eines Zytostatikums mit einem anti-CD33-Antikörper (Gemtuzumab Ozogamicin, Mylotarg[®], ein Immunkonjugat mit dem zytotoxischen Agens Calicheamicin) zeigt zwar beachtliche antileukämische Effekte (Sievers et al., 2001; Pagano et al., 2007) kann das Problem aber trotz offenbar unterschiedlichen Nebenwirkungsprofils im Vergleich zu konventionellen AML-Therapien nicht hinreichend lösen, da CD33 ein Marker für unreife myeloische Zellen an sich und keineswegs spezifisch für Leukämiezellen ist. Ein kürzlich identifizierter und beschriebener AML-assoziiertes Oberflächenmarker der myeloiden Zellreihe, C-type lectin-like molecule-1 (CLL-1) (Bakker et al., 2004) zeigt zwar kaum Expression auf nicht transformierten hämatopoetischen Stammzellen und CD34-positiven Progenitorzellen, präsentiert sich aber als ein stark exprimierter Marker der myeloischen Differenzierungslinie, unabhängig vom neoplastischen Potential. Auch wenn Bakker et al. eine extra-hämatopoetische Expression nicht nachweisen konnten, so zeigten Marshall et al., dass eine gekürzte Variante des Glykoproteins durchaus in Herz, Lunge, Colon und Plazenta exprimiert wird (Marshall et al., 2004). Dennoch ist die Beschreibung von CLL-1 als AML-assoziiertes Rezeptor hinsichtlich Diagnostik und therapeutischer Ansätze vielversprechend, die weitere Entwicklung bleibt abzuwarten.

AML-Zellen zeigen ein komplexes Expressionsmuster an Oberflächenmarkern. Nahezu alle AML-Zellen (>95%) exprimieren CD13 und CD38, ein großer Teil (ca. 70-85%) exprimiert CD4dim, CD15, CD32, CD33 und HLADR, ebenfalls häufiger findet man den sonst nur sehr unreife hämatopoetische Vorläuferzellen kennzeichnenden Marker CD34 (Baer et al., 2001). Einzelne auf AML-Zellen zu findende Marker, wie z.B. CD61 und CD41, die die akute Megakaryoblastenleukämie mit charakterisieren, ermöglichen die Zuordnung in eine Differenzierungslinie, zeigen jedoch keine neoplastische Spezifität. Manche AML-Klone

zeichnen sich allerdings durch ein spezifisches Markerprofil aus, wie z.B. die physiologisch auf hämatopoetischen Zellen nicht vorkommende Koexpression von CD34 und CD13 (Casasnovas et al., 1998). Ein solches aberrantes Markerprofil mag zwar von diagnostischem Interesse sein, kann aber zum Targeting von Therapien nicht herangezogen werden, da die Marker zum einen einzeln auf anderen hämatopoetischen Vorstufen exprimiert werden (Nebenwirkungsspektrum), zum anderen, weil für die spezifischen Rezeptoren auch deren Liganden benötigt werden. Eine Optimierung des therapeutischen Nutzens durch Einsatz eines "Cocktails" spezifisch bindender Liganden in Anlehnung an die entsprechenden Oberflächenprofile ist hingegen durchaus denkbar. Abgesehen von dem 2004 durch Bakker et al. beschriebenen AML-assoziierten Oberflächenmarker der myeloiden Reihe, CLL-1, dessen Charakterisierung aktuell abzuwarten bleibt, zeigt sich keiner der auf AML-Zellen (oder überhaupt auf Leukämiezellen) beschriebenen Rezeptoren tatsächlich spezifisch für leukämische oder wenigstens neoplastische Zellen im allgemeinen, da sie in der Regel alle auch auf physiologischen Blutzellvorstufen exprimiert werden, wie z.B. der vor einigen Jahren beschriebene HERG-Kalium-Kanal (Pillozzi et al., 2002).

Für einen erfolgreichen zielgerichteten Therapieansatz in der AML-Behandlung findet sich die Notwendigkeit in der Identifikation von Liganden, die an spezifische Membranproteine der Leukämiezellen binden. Hierbei kann es sich z.B. um Moleküle der extrazellulären Matrix, um Wachstumsfaktoren oder um Zelloberflächenproteine anderer Zellen handeln, die an zunächst noch unbekannte Rezeptoren der zu untersuchenden Zellpopulation binden. Eine Ligandenidentifikation kann durch Selektion von auf rekombinanten Bakteriophagen exprimierten, randomisierten Peptidbanken erfolgen (Pasqualini, 1999; Pasqualini et al., 2002). Die therapeutische Nutzung solcher AML-zellbindender Liganden kann die Generierung zielgerichteter zytotoxischer Konjugate und deren selektives Einschleusen in AML-Zellen umfassen, um somit die Effizienz der entsprechenden gebundenen antileukämischen Substanz zu steigern und die Nebenwirkungen zu vermindern. Desweiteren wäre auch Gentherapietargeting auf AML-Zellen denkbar. Ferner wäre die Kenntnis eines AML-spezifischen Liganden von großer diagnostischer Bedeutung, darüber hinaus von grundlagenwissenschaftlichem Interesse, würde die Identifikation AML-zellspezifischer Liganden-Rezeptorpaare und die Untersuchung ihrer Funktion doch möglicherweise ein tieferes Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge erlauben, die das Migrations-, Homing- und Wachstumsverhalten dieser neoplastischen Zellen ausmacht.

1.3 Die chromosomale Translokation (8;21) und das Fusionsprotein AML1/ETO

1.3.1 Die chromosomale Translokation (8;21)

Die reziproke chromosomale Translokation (8;21) tritt in 30-40% der Fälle in der AML-Subgruppe M2 auf (Bitter et al., 1987) und stellt die am häufigsten identifizierte chromosomale Aberration bei akuten myeloischen Leukämien dar (Pedersen-Bjergaard et al., 1994). Bei der der Translokation (8;21) handelt es sich um eine balancierte chromosomale Translokation, dennoch wurde bislang keine Expression des Fusionsgens am Bruchpunkt des Chromosoms 21 beobachtet (Downing et al., 1993; Nucifora et al., 1995). Auf dem Chromosom 8 hingegen lokalisiert sich das neu entstandene chimäre Fusionsgen *aml1/eto*, welches unter der Kontrolle des AML1-Promoters für die für diese Leukämieform charakteristische Expression des chimären Fusions-Transkriptionsfaktors AML1/ETO kodiert.

1.3.2. AML1

AML1 gehört zur Familie der RUNX-Transkriptionsfaktoren. Hierbei handelt es sich um heterodimere transkriptionelle Regulator-Proteine, die aus zwei Untereinheiten, der DNA-bindenden α -Untereinheit, dem *runx*-Protein, und einer nicht DNA-bindenden β -Untereinheit, CBF β („Core binding Factor β “) / (PEBP2 β), bestehen (Ogawa et al., 1993; Wang et al., 1993). Aml1 kodiert für die DNA-bindende Untereinheit des heterodimeren AML1/CBF β -Transkriptionsfaktor-Komplexes (Abb.1.1). Der AML1/CBF β -Transkriptionsfaktorkomplex wird in zahlreichen Arbeiten zumeist als transkriptioneller Aktivator beschrieben (Wargnier et al., 1995; Hwang et al., 1999; Rhoades et al., 1996; Zhang et al., 1996; Uchida et al., 1997; Frank et al., 1995; Takahashi et al., 1995; Nuchprayoon et al., 1994; Shimada et al., 2000; Puig-Kroger et al., 2000).

1.3.3 ETO

Das ETO-Gen (ETO, Eight-Twenty-One; MTG8, Myeloid Translocation Gene on chromosome 8) zählt zusammen mit MTGR1 und MTG16 (Gamou et al., 1998; Kitabayashi et al., 1998) zu einer Gen-Familie, die durch vier evolutionär konservierte Domänen gekennzeichnet ist (Kitabayashi et al., 1998). Eine dieser Domänen wird durch einen hydrophoben Bereich (hydrophobic heptad repeat, HHR) ausgemacht, über welchen die Mitglieder der ETO-Familie (ETO, MTGR1, MTG16) Homo- und Heterodimere bilden. Diese Dimere können Co-Repressoren (z.B. Co-Repressorkomplexe mit gebundener Histondeacetylaseaktivität) rekrutieren (Gelmetti et al., 1998; Lutterbach et al., 1998; Wang et al., 1998), (Abb. 1.2). Hieraus ergibt sich die Möglichkeit der Transkriptionsregulation: zum einen kann die ETO-vermittelte Rekrutierung von Histondeacetylase (HDAC)-Aktivitäten in einer sukzessiven transkriptionellen Repression resultieren (Melnick et al., 2000), auf der

anderen Seite könnte man sich auch eine kompetitive Bindung von HDAC-Aktivitäten durch das ETO-Protein vorstellen, so dass durch diese HDAC-Aktivitäten von anderen repressorischen Transkriptionsfaktoren abgezogen werden, was in einer transkriptionellen Aktivierung der entsprechenden Zielgene resultierte (Downing, 1999). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Mitglieder der ETO-Familie durch Bildung funktionell verschiedener Homo- und Heterodimere Einfluss auf die transkriptionelle Regulation nehmen (Kitabayashi et al., 1998). Eine direkte Interaktion des ETO-Proteins mit dem DNA-Doppelstrang ist allerdings bislang nicht beschrieben worden. Die eigentlichen physiologischen Funktionen des ETO-Proteins sind noch nicht aufgeklärt. Als Konsequenz aus der indirekt transkriptionell-regulativen Funktion lässt sich postulieren, dass ETO im entsprechenden genetischen Zusammenhang durch Modulation von Zielgenen Einfluss auf Differenzierung und Proliferation unreifer myeloischer Zellen haben könnte.

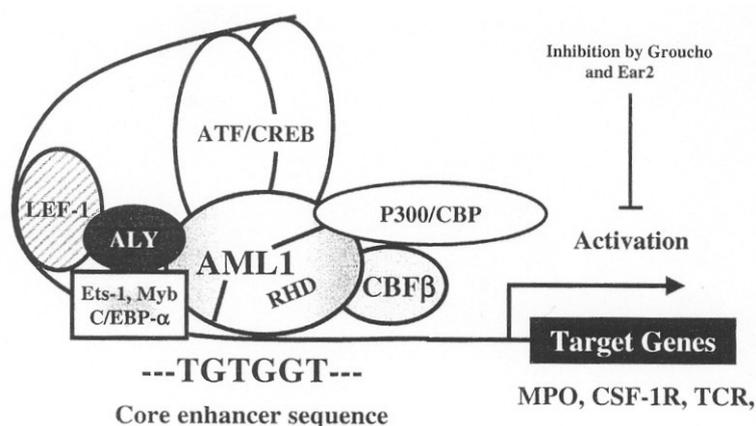


Abbildung 1.1:

Aufbau und Interaktionen des AML1/CBFβ-Transkriptionsfaktorkomplexes

Der AML1/CBFβ-Transkriptionsfaktorkomplex bindet über die *RUNT*-Homologiedomäne an die „core-enhancer“-Sequenz der DNA und agiert dort als Organisator zur Rekrutierung von Verstärkerelementen, um Transkription zu initiieren bzw. zu steigern (Downing, 1999).

1.3.4 Das Fusionsprotein AML1/ETO

Das AML1/ETO-Fusionsprotein ist ein 83 kDa großer Proteinkomplex, bestehend aus den N-terminalen 177 Aminosäuren des AML1-Proteins, „in frame“ fusioniert mit nahezu dem gesamten ETO-Protein, der viele funktionelle Domänen von AML1 und ETO trägt, (Abb.1.3). Von besonderer Bedeutung für die Funktionalität des chimären Proteins sind die Erhaltung

der RHD von AML1, und damit die DNA-Bindungs-CBF β -Heterodimerisierungsfähigkeit des Proteins, sowie die Ersetzung der Transaktivierungsdomäne durch das fast komplette ETO-Protein, welches die Interaktion mit den nukleären Co-Repressoren vermittelt. Für das AML1/ETO-Fusionsprotein sind transkriptionell aktivierende wie auch inhibierende Funktionen gezeigt worden (Melnick et al., 2000; Frank et al., 1995; Lenny et al., 1995; Meyers et al., 1995). Die Identifizierung und Charakterisierung potentieller Zielgene der AML1/ETO-vermittelten Genmodulation sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen, viele interessante Zielgene konnten mittels unterschiedlicher Systeme bereits detektiert und in ihrer Regulation beschrieben werden (Fliegau et al., 2004).

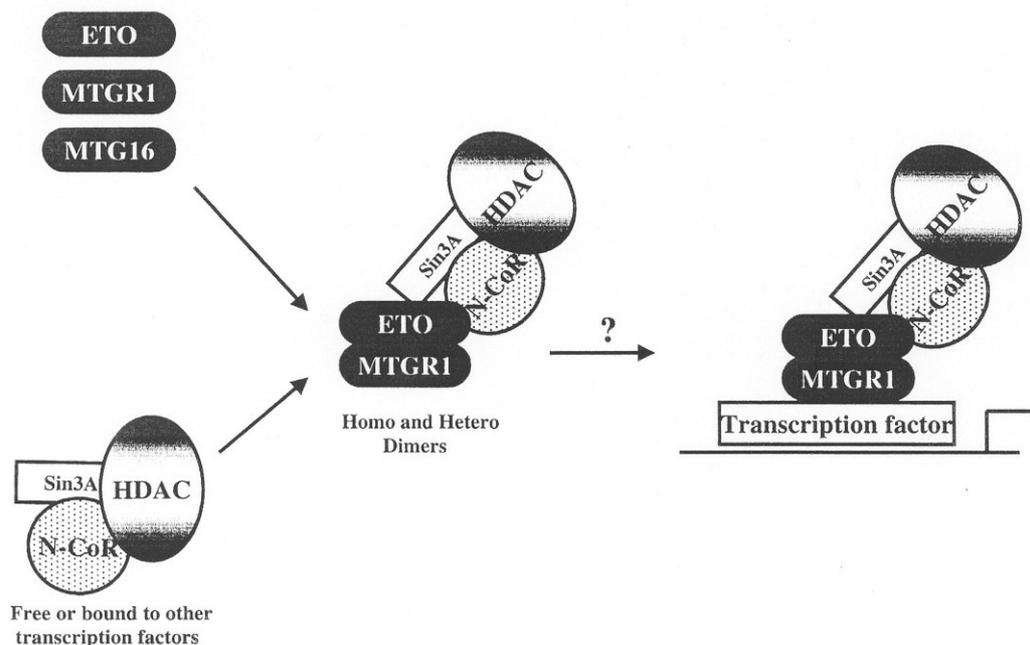


Abbildung 1.2:

Bindung und Vermittlung eines nukleären Co-Repressorkomplexes durch Homo- und Heterodimere von Mitgliedern der ETO-Familie

Mitglieder der ETO-Familie (ETO, MTGR1, MTG16) bilden Homo- und Heterodimere und interagieren mit nukleären Co-Repressoren Sin3A und N-CoR mit sukzessiver Bindung von Histondeacetylasen. Hierüber kann aktivierende und reprimierende transkriptionelle Modulation vermittelt werden (Downing, 1999).

Unter anderem scheint AML1/ETO in der Lage zu sein, über verschiedene Mechanismen eine Transformation (hämatopoetischer) Zellen zu induzieren (Yergeau et al., 1997; Okuda et al., 1998). Hypothetische Mechanismen der Leukämogenese durch die Expression des AML1/ETO-Fusionsproteins umfassen die Interferenz des Fusionsproteins mit der regulatorischen Aktivität des physiologischen AML1-Promoters, über die Funktionsbestimmung des Fusionsproduktes durch die aberrante ETO-Expression (Zeleznik-Le et al., 1995) bis hin zu der Möglichkeit, dass das AML1/ETO-Protein, beispielsweise durch Interaktion mit anderen regulatorischen Proteinen eine neuartige Funktion ausübt. Direkte Hinweise für das transformierende Potential AML1/ETOs in hämatopoetischen Zellen wurden unter anderem durch „knock-in“-Experimente von ETO in den AML1-Locus und die folgende artifizielle AML1/ETO-Expression gewonnen (Yergeau et al., 1997; Okuda et al., 1998); auch wenn Untersuchungen an transgenen Mäusen Hinweise darauf gegeben haben, dass die Expression des Fusionsproteins alleine nicht ausreicht, um einen malignen Leukämie-Phänotyp, (aber immerhin abnorme Stammzellproliferation) hervorzurufen (Rhoades et al., 2000; Shimizu et al., 2000; Downing, 2001). Für eine komplette leukämische Transformation werden scheinbar noch zusätzliche genetische Ereignisse benötigt (Downing, 1999; Rhoades et al., 2000; Yuan et al., 2001).

Ausgehend von den geschilderten Beobachtungen wird ein Modell angenommen, in welchem präleukämische AML1/ETO-positive Zellen ihren AML1/ETO-induzierten Wachstumsarrest und die begleitende Apoptose überwinden müssen, um ein vollständiges leukämisches Potential zu erreichen (Burel et al., 2001). AML1/ETO besitzt also vielfältige funktionelle Eigenschaften (Scandura et al., 2002), die sich von Effekten auf Proliferation, Zell-Zyklus und Apoptose (Burel et al., 2001; Fliegau et al., 2004; Amann et al., 2001) über Insensitivität gegenüber antiproliferativen Signalen (Jakubowiak et al., 2000) bis hin zur Differenzierungsblockade (Ahn et al., 1998; Westendorf et al., 1998; Burel et al., 2001) erstrecken. Zusammenfassend kann sich die Aktivität des Fusionsproteins unter anderem in der Rekrutierung von Repressorkomplexen und somit sowohl in der transkriptionellen Repression als auch (z.B. über kompetitive Bindung der Repressoren) in der Aktivierung von Zielgenen manifestieren. Auf Grund der beschriebenen genregulatorischen Eigenschaften von AML1/ETO liegt eine Beeinflussung, wenn nicht Determinierung des Oberflächenmarkerprofils t(8/21)-positiver Leukämien durch AML1/ ETO-Expression nahe, wurde allerdings bislang nicht detailliert untersucht.

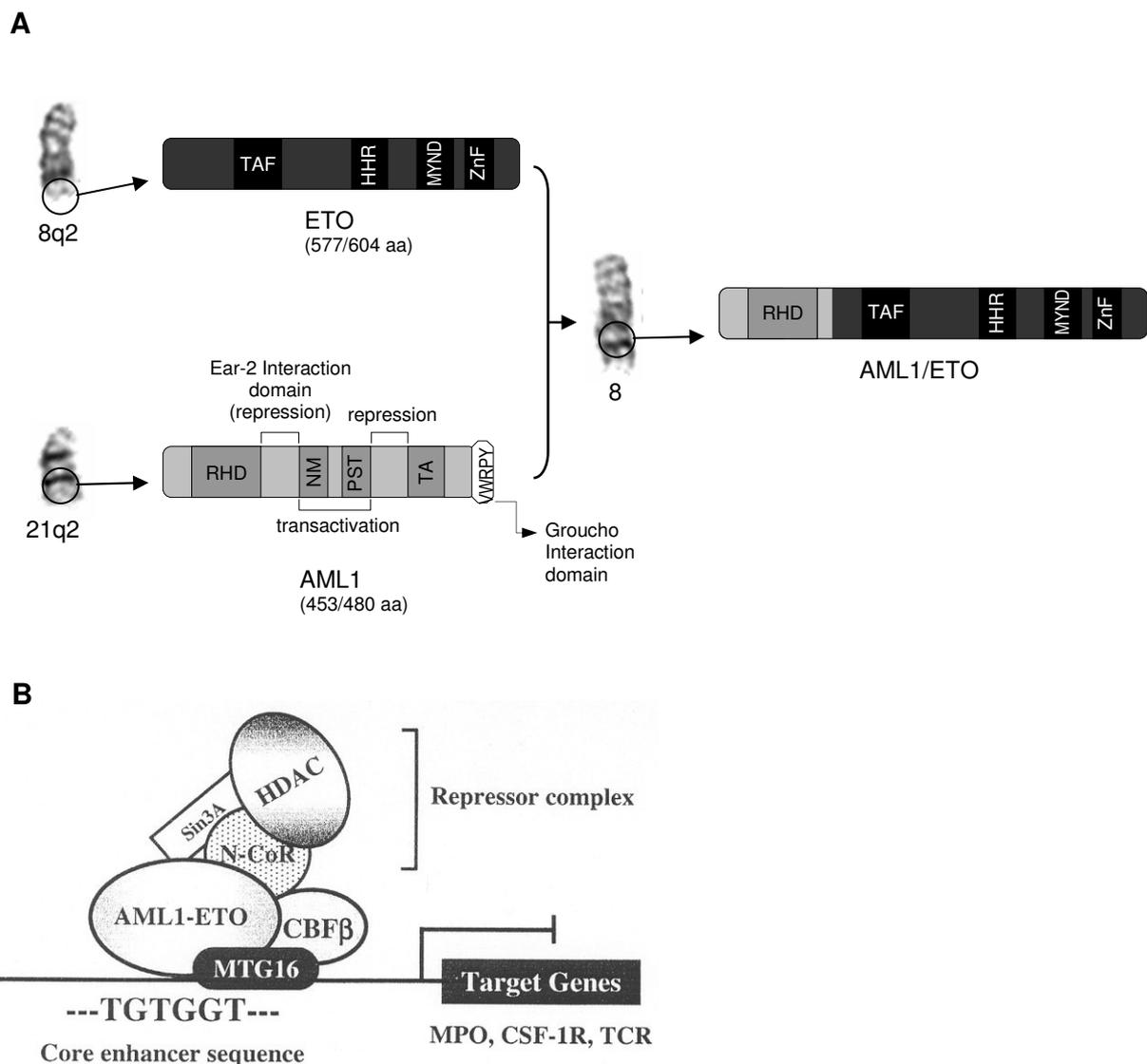


Abbildung 1.3:

(A) Schematische Darstellung des AML1- und des ETO-Gens sowie des Fusionsprodukts AML1/ETO

(B) Hypothetisches Modell der transkriptionellen Repression durch AML1/ETO

(A) Darstellung des AML1-Proteins, des ETO-Proteins und des Fusionsproduktes AML1/ETO mit den entsprechenden Domänen (RHD, runt-Homologiedomäne; PST, Prolin/Serin/Threonin-reiche Region; NM, Bindungsbereich an nukleäre Matrix; TA, Transaktivierungsdomäne; TAF, Homologiedomäne zu Transkriptions-aktivierenden-Faktoren; HHR, „hydrophobic heptad repeat“; MYND, Myeloid-Nervy-DEAF-1-Domäne; ZnF, Zinkfinger-Motive).

(B) Das AML1/ETO-Fusionsprotein hat wie Wildtyp-AML1 die Fähigkeit, an DNA zu binden und mit CBF β zu dimerisieren. Durch den ETO-Anteil wird ein Co-Repressorkomplex rekrutiert, der die Vermittlerelemente Sin3A und N-CoR, sowie Histondeacetylasen (HDAC) enthält. Diese Interaktion führt zur Repression einer Reihe von Genen, die normalerweise durch AML1 aktiviert werden (Downing, 1999).

1.3.5 Ponasteron A-induzierbare AML1/ETO-Expression in einem humanen monoblastären U937-Zellsystem

Zur Untersuchung der Bedeutung der AML1/ETO-vermittelten Genregulation in der Leukämogenese wurden mehrere Reporter- und Zellkonstrukte erprobt. Fliegau et al. nutzten ein vorbeschriebenes Ecdyson-induzierbares Zwei-Vektoren System (No et al., 1996) zur Entwicklung eines stabil transfizierten Klons einer humanen monoblastären U937-Zelllinie, so dass in den transfizierten physiologisch AML1/ETO-negativen Zellen eine exogen induzierbare ektopische AML1/ETO-Expression mittels Ecdyson, respektive dem Analogon Ponasteron A ausgelöst werden kann. In diesem Zellsystem wird ein von einem Vektor (pVgRXR) kodierter, konstitutiv exprimierter heterodimerer Rezeptor (VgEcR/RXR) durch ein ecdysonähnliches Hormon (Ponasteron A) aktiviert, der seinerseits die Expression des AML1/ETO-Zielgens unter der Kontrolle einer induzierbaren Promotereinheit eines zweiten Vektors (pIND-AML1/ETO) aktiviert (Abb1.4). Eine deutliche AML1/ETO-Basisexpression der transfizierten Zellen im nicht induzierten Zustand wurde nicht beobachtet, der Rezeptorkomplex scheint in Abwesenheit des Liganden durch Interaktion mit nukleären Co-Repressoren eine basale AML1/ETO-Expression zu reprimieren (Saez et al., 2000; Thormeyer et al., 1999). Hingegen konnte die hochregulierte AML1-ETO-Expression nach 20-48-stündiger Induktion mittels Ponasteron A deutlich nachgewiesen werden (Fliegau et al., 2004).

1.4 Rezeptor-Targeting mit Phagen-Peptidbanken

Die Entwicklung zielgerichteter Therapien setzt die Identifikation zielzellspezifischer Rezeptoren und/oder deren Liganden voraus, mit Hilfe derer man ein therapeutisches Agens (Medikament, Gentherapievektor) gezielt auf Zellen „lenken“ kann (Drug-Targeting). In klinischer Erprobung finden sich derzeit einige neuartige Therapieansätze, welche spezifisch auf molekulare Charakteristika der einzelnen AML-Formen abzielen. Diese inkludieren z.B. Histondeacetylaseinhibitoren (Kosugi et al., 1999), Proteasomeninhibitoren (Yu et al., 2003), Farnesyltransferaseinhibitoren (Karp et al., 2001) und Angiogenesehemmer wie z.B. Bevacizumab (Zini et al., 2007). Eine effiziente Möglichkeit zur Identifikation neuer interessanter Rezeptor-Ligand-Komplexe findet sich in der Selektion zelltypspezifischer Liganden aus randomisierten Phagen-Peptidbanken, eine Methode, welche in ihren ersten Grundlagen Mitte der 80er Jahre entwickelt wurde (Smith, 1985). Phagen sind bakteriopathogene Viren, die in nativem Zustand nicht an humane Zellen binden können. Bei Phagen-Peptidbanken handelt es sich um Ansammlungen genetisch modifizierter Phagen, die an ihrer Oberfläche kleine Peptide mit randomisierter Aminosäuresequenz exprimieren. Mittels dieser Peptidmotive können spezifische Ligand-(Phagen-)Rezeptor-Interaktionen vermittelt werden.

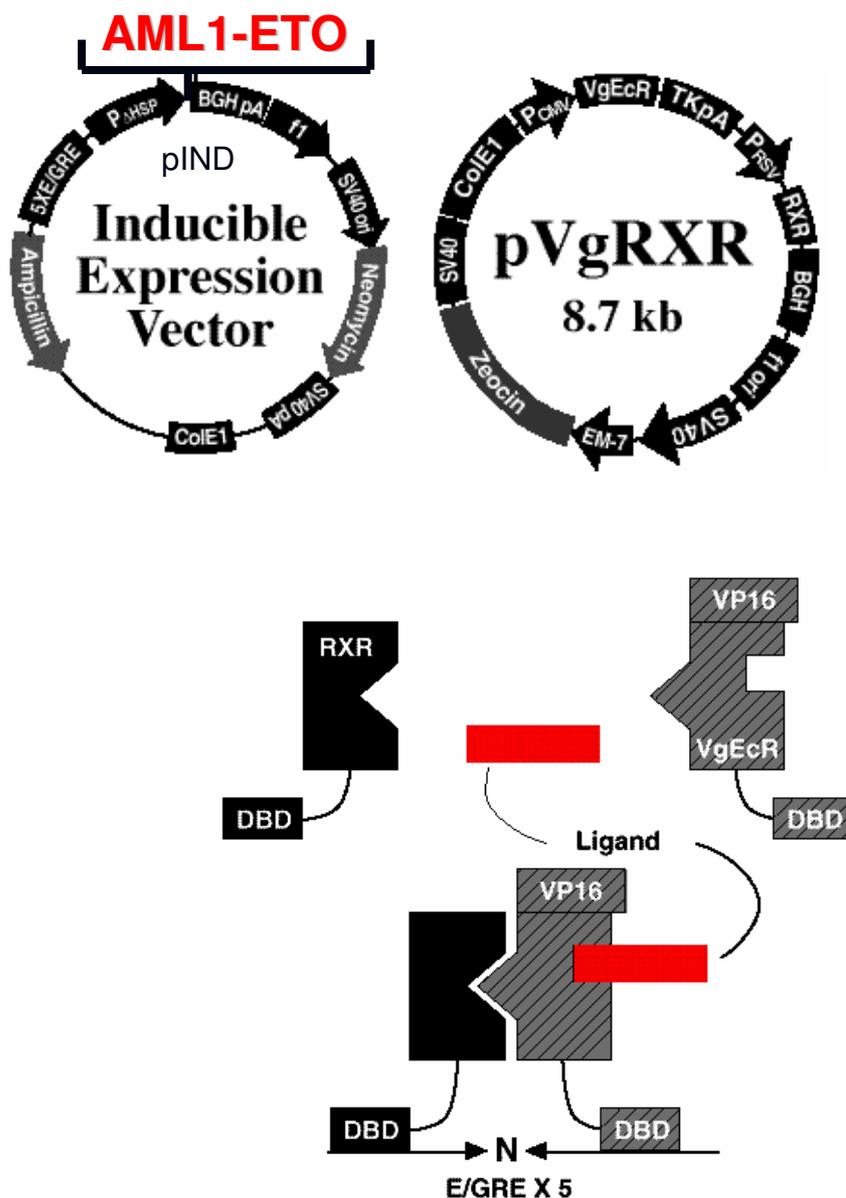


Abbildung 1.4

Ponasteron A-induzierbares AML1/ETO-Expressionsmodell:

Das System besteht aus zwei Vektoren: dem das Zielgen *aml1/eto* codierende pIND AML1/ETO-Vektor und dem die Rezeptormonomere RXR und VgEcR konstitutiv exprimierende Vektor pVgRXR. Durch Zugabe eines Liganden (Muri- oder Ponasteron A) wird die Heterodimerisierung des Rezeptors eingeleitet, so dass dieser an das entsprechende Ecdyson-Response-element E/GRE X5 binden und die Transkription des nachgeschalteten *aml1/eto*-Gens aktivieren kann.

(Modifiziert nach der Produktbeschreibung von Invitrogen, Groningen, NL)

An interessierende Moleküle gebundene Phagen werden selektiert, aufgereinigt und amplifiziert und können sukzessiv charakterisiert und ihre Rezeptoren identifiziert werden. In einem häufig genutzten Ansatz zur Herstellung solcher Peptid-Banken werden die für die randomisierten Peptide kodierenden DNA-Sequenzen per Insertion mit den für das Phagen - Kapsidprotein pIII kodierenden DNA Abschnitten fusioniert. Die so modifizierten Phagen exprimieren drei bis fünf Kopien der jeweiligen Peptide an ihrer Oberfläche (Abbildung 1.5), in einem anderen Klonierungsansatz mit Fusion der randomisierten Sequenzen an Protein pVIII erhält man bis zu 3000 Peptidkopien pro Kapsid, was gewisse Schwierigkeiten bei den Selektionsprozeduren mit sich bringt (Smith et al., 1993). Die Diversität einer Peptid-Phagenbank spielt für den Selektionserfolg signifikanter Liganden eine entscheidende Rolle, optimal generierte Peptidbanken weisen bis zu 10^9 Permutationen auf (Koivunen et al., 1999). Die Peptidlänge in pIII-Peptidbanken liegt optimalerweise unter zehn Aminosäuren, da Phagen mit längeren Inserts einen Selektionsnachteil gegenüber defekten, z.B. insertlosen Phagenklonen aufweisen und somit zur Effizienzsenkung der Selektion und Anreicherung spezifischer Klone führen können (Pasqualini, 1999). Es ist bekannt, dass häufig Tripeptide als Bindungsmotive für die Vermittlung spezifischer Peptidbindungen ausreichen, verschiedene Bindungsmotive sind in der Literatur beschrieben.

So findet sich z.B. das Motiv SRL in verschiedenen Peptid-Phagen mit hoher Bindungsaffinität an Hirngewebe (Pasqualini et al., 1996). Homing-Peptide der Lunge weisen GFE-, der Retina RDV-Motive auf (Rajotte et al., 1998). Ein RGD-Bindungsmotiv spielt eine wichtige Rolle in der Bindungsaffinität und -spezifität von Liganden zu bestimmten Integrinheterodimeren (Koivunen et al., 1994; Ruoslahti, 1996).

Man unterscheidet Phagen-Peptidbanken, in welchen die Phagen an ihrer Oberfläche zyklische randomisierte Peptide exprimieren, von linearen Peptidbanken. Die zyklische Struktur der Oberflächenpeptide wird durch Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten vermittelt. Koivunen et al. zeigten, dass zyklische Peptide eher eine höhere Affinität zu ihren Rezeptoren zeigen als lineare Peptide (1993 und 1994). Ursächlich diskutiert wird unter anderem die direkte Präsentation des Bindungsmotivs durch die zyklische Oberflächenstruktur. Bei unbekanntem Rezeptor kann eine hohe Bindungsaffinität des Liganden in der Selektion von Vorteil sein. Über die peptidvermittelte Liganden-Rezeptorbindung erlaubt die Selektion von Peptid-Phagenbanken die Anreicherung präferentiell an bestimmte Zielzellen bindender Phagen. Diese werden von den nicht an diese Zellen gebundenen Phagen getrennt, aufgereinigt und bakteriell amplifiziert. Mit dieser Methode konnten verschiedene spezifisch bindende Liganden und ihre Rezeptoren charakterisiert werden (Trepel et al., 2002). Technische Verbesserungen in der Methodik der Ligandenselektion führten in den vergangenen Jahren zu einer deutlichen Effizienzsteigerung. Die Einführung der differentiellen Zentrifugation zur Trennung

gebundener von nicht-gebundenen Phagenklonen innerhalb der Selektionsansätze minimierte Selektionsprobleme in vitro wie die exorbitanten Verluste spezifisch bindender Phagen im Rahmen der zahlreichen Waschvorgänge. Durch diese Modifikation konnte die Ligandenselektion auf Endothelzellen in vitro etabliert werden (Giordano et al., 2001).

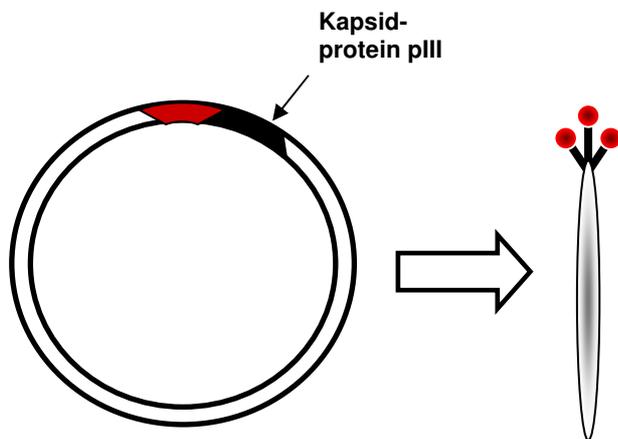


Abbildung 1.5

Modell der Generierung eines Bakteriophagen mit oberflächlicher Expression eines Peptides.

Die randomisierte DNA-Sequenz des Peptides (rot) wird mit dem für das Kapsidprotein pIII kodierende DNA-Abschnitt auf Gen III des Phagengenoms fusioniert. Das Peptid wird dreifach an der Oberfläche des Phagen präsentiert.

Pasqualini et al. demonstrierten die Isolierung und Identifizierung von Liganden, die in vivo bei systemischer Verabreichung an gewebespezifische, endotheliale Rezeptoren binden (Pasqualini et al., 1996 und 1997; Arap et al., 1998 und 2002; Burg et al., 1998; Rajotte et al., 1999). Auch beim Menschen sind organspezifisch exprimierte Rezeptoren beschrieben, die einer Identifizierung durch in vivo-Selektion von Phagen-Peptidbanken zugänglich sind (Arap et al., 2002). Aus Phagen-Peptidbanken isolierte Peptide lassen sich zum Targeting von Therapien nutzen, indem sie entweder direkt oder indirekt mittels eines Adaptermoleküls an therapeutische Moleküle gekoppelt werden oder funktionell, z.B. durch Rezeptorinhibition in die Regulation der Zellphysiologie eingreifen (Pastan et al., 2006). Im Tierversuch konnte eine deutlich erhöhte zytostatische Wirksamkeit bei geringerer systemischer Toxizität durch Kopplung eines Anthrazyklin-Chemotherapeutikums an tumorspezifisch bindende Peptide erzielt werden als bei Applikation des ungekoppelten Anthrazyklins (Arap et al., 1998). Ähnliche Ergebnisse zeigten Ellerby et al. mit der Kopplung eines zytotoxischen Peptids an tumorbindende Peptide. Die Koppelung therapeutischer Agenzien an zelltypspezifisch bindende Peptide und deren in vivo Einsatz ist also durchführbar. Hiermit ergeben sich neue Möglichkeiten für Behandlungsformen wie der zielgerichteten zytotoxischen und funktionellen Therapie.

1.5 Zielsetzung der Untersuchungen

Ziel dieser Arbeit war zum einen die Etablierung eines Selektionsmodells, in welchem aus randomisierten Phagen-Peptidbanken präferentiell an Leukämiezellen bindende Liganden angereichert werden können. Dieses Modell sollte dann zur Selektion, Identifizierung und Charakterisierung solcher Peptide genutzt werden, um in weiterführenden Arbeiten eine Grundlage zur Generierung potentieller zytotoxischer Konjugate zur Hand zu haben. Weiter könnten solche identifizierten AML-spezifischen Liganden-Rezeptoren-Paare zur Etablierung diagnostischer Marker dienen, und gemeinsam mit ihren Liganden zu einem weiterführenden Verständnis über die pathophysiologischen Mechanismen der Erkrankung beitragen.

Die Isolierung und Identifizierung eines auf AML-Zellen bindenden Liganden aus Phagen-Peptidbanken war bis zu Beginn der hier beschriebenen Untersuchungen nicht publiziert. Die Notwendigkeit der Etablierung eines entsprechenden Selektionssystems als methodische Grundlage zur erfolgreichen Identifizierung und Charakterisierung spezifisch bindender Liganden und ihrer Rezeptoren zur sukzessiven Entwicklung antileukämischer Konjugate erschien viel versprechend.

Somit ergaben sich folgende Zielsetzungen:

- 1.) Etablierung eines Modells, dessen Bedingungen die Selektion von Peptiden auf verschiedenen malignen hämatopoetischen Zellen zuließen.
- 2.) Selektion und Identifizierung von Peptidliganden auf primären Zellen von an AML erkrankten Patienten. Unser Interesse galt der Detektion eines möglichst auf allen AML-Subgruppierungen, jedoch nicht auf gesunden hämatopoetischen Zellen exprimierten Markers.
- 3.) Selektion und Identifizierung von Liganden, welche mit Oberflächenmolekülen interagieren, die auf einer bestimmten AML-Subgruppe, nämlich den AML1/ETO-positiven Leukämien, exprimiert werden.
- 4.) Evaluierung der AML-Bindungsfähigkeit der selektierten Peptid-Phagen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen

2.1.1.1 Primäre Zellen akuter myeloischer Leukämien

Alle verwendeten Proben wurden aus diagnostischen Zwecken von Patienten gewonnen, welche sich auf Grund einer akuten myeloischen Leukämie zwischen 2001 und 2005 in der Behandlung der Abteilung Innere Medizin I des Universitätsklinikums Freiburg befanden. Die für die diagnostischen Untersuchungen nicht mehr benötigten Probenreste wurden uns mit schriftlichem Einverständnis der Patienten zur Verfügung gestellt. Mononukleäre Zellen des Knochenmarks, sowie des peripheren Blutes wurden durch Auftrennung im Dichtegradienten (Lymphoprep) gewonnen.

Ein Ethikvotum der Universitätsklinik Freiburg zur Verwendung von AML-Zellen für die Selektion von Phagen-Peptidbanken lag vor (Ethikvotum Universitätsklinik Freiburg Nr.48/2001).

2.1.1.2 Zellen gesunder Spender

Alle verwendeten Proben wurden entweder mit Einverständnis des Probanden (alles Mitarbeiter der Arbeitsgruppen der Abteilung Innere Medizin I des Universitätsklinikums Freiburg) zum Zwecke der Experimente entnommen oder aus diagnostischen Zwecken von in der Abteilung Innere Medizin I des Universitätsklinikums Freiburg behandelten Patienten gewonnen, bei welchen zum Zeitpunkt der Entnahme keine hämatopoetische Neoplasie nachzuweisen war. Die für die diagnostischen Untersuchungen nicht mehr benötigten Probenreste wurden uns mit schriftlichem Einverständnis der Patienten zur Verfügung gestellt. Mononukleäre Zellen des Knochenmarks, sowie des peripheren Blutes wurden durch Auftrennung im Dichtegradienten (Lymphoprep) gewonnen.

Ein Ethikvotum der Universitätsklinik Freiburg zur Verwendung von gesunden Knochenmarks- oder Blutzellen für die Selektion von Phagen-Peptidbanken lag vor (Ethikvotum Universitätsklinik Freiburg Nr.48/2001).

2.1.1.3 Zelllinien

Alle Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Braunschweig, bezogen, ausgenommen den Zelllinien Kasumi-1 und SKNO-1, welche von Herrn Prof. Dr. Michael Lübbert (Abt. Innere Medizin I, Universitätsklinikum Freiburg) zur Verfügung gestellt wurden.

-
- **Kasumi-1** Die Zelllinie Kasumi-1 wurde 1989 aus dem peripheren Blut eines siebenjährigen japanischen Jungen mit akuter myeloischer Leukämie im zweiten Rezidiv nach Knochenmarkstransplantation gewonnen (Asou et al., 1991). Kasumi-1 Zellen wurden einer akuten myeloblastischen Leukämie, nach der FAB-Klassifikation FAB-M2, zugeordnet. Es handelt sich um undifferenzierte myeloische Leukämiezellen, die Myeloperoxidase-positiv sind und morphologisch Zeichen myeloischer Reifung zeigen.
Kasumi-1 weist die Translokation t(8;21) (q22;q22) auf.
Bezug: AG Prof. Dr. M. Lübbert, Universitätsklinikum Freiburg
 - **SKNO-1** Gewonnen aus dem Knochenmark eines 22-jährigen Mannes mit akuter myeloblastischer Leukämie (AML) M2 mit t(8;21), dessen Erkrankung nach Acquis von Monosomie 17 chemoresistent wurde. GM-CSF-abhängige Zelllinie. Überexpression und Mutation des p53 Gens. (Matozaki, 1995)
Bezug: AG Prof. Dr. M. Lübbert, Universitätsklinikum Freiburg
 - **K562** Humane CML-Zelllinie aus dem Pleuraerguss einer Patientin im Blastenschub, Morphologie: lymphoblastisch; Wachstum in Suspension, Zellen produzieren Hämoglobin; die Zellen zeichnen sich durch das Philadelphia-Chromosom mit dem bcr-abl b3a2 Fusionsgen aus.
Bezug: ATCC, Manassas (USA); ATCC-Nummer: CCL-243
 - **HL-60** HL-60 ist eine Zelllinie, die 1976 aus dem peripheren Blut einer 35-jährigen Patientin mit akuter myeloischer Leukämie etabliert wurde. Zunächst wurde trotz einiger atypischer Merkmale eine Einteilung nach der FAB-Klassifikation als FAB-M3, also als akute promyelozytäre Leukämie (APL) vorgenommen (Gallagher et al., 1979). Vergleiche der Merkmale von HL-60 mit denen akuter promyelozytärer Leukämien und anschließende Untersuchungen des Originalmaterials ergaben sowohl morphologische als auch zytogenetische Unterschiede. Es zeigte sich, dass HL-60 die für die akute promyelozytäre Leukämie sehr typische Translokation t(15;17) nicht aufweist. Die ursprüngliche Einteilung als FAB-M3 wurde daraufhin angezweifelt, und es erfolgte die Zuordnung

der Zellen zu einer akuten myeloblastischen Leukämie in Reifung, FAB-M2 (Dalton et al., 1988).

Bezug ATCC, Manassas (USA); ATCC-Nummer: CCL-240

- U-937 Die Zelllinie U-937 wurde 1974 aus dem Pleura-Exsudat eines 37-jährigen Mannes mit generalisiertem histiozytären Lymphom gewonnen (Sundstrom et al., 1976). Diese Zelllinie unterschied sich in Parametern wie Morphologie, Wachstumsverhalten, Muster der Oberflächenproteine, Immunglobulinproduktion, Lysozymexpression, Abwesenheit des EBV-Genomes und Karyotyp von EBV-tragenden diploiden lymphoblastoiden Zelllinien, die ohne Verbindung zur Tumorphosphorpopulation aus Non-Burkitt-Lymphomen etabliert worden waren. Der histiozytäre Ursprung dieser Zelle wurde durch den Nachweis der hohen Lysozym-Produktion und der starken Esterase-Aktivität gesichert.
Bezug: ATCC, Manassas (USA) ATCC-Nummer: CRL-1593.2
- KG-1 Die Zelllinie KG-1 wurde 1977 aus dem Knochenmark eines 59-jährigen Mannes mit akuter Erythroleukämie (AML FAB-M6) etabliert.
Bezug: ATCC, Manassas (USA); ATCC-Nummer: CRL-8031

2.1.1.4 AML1/ETO- induzierbares Zellsystem

Es wurde ein von Fliegaut et al. vorgeschriebener U937-Klon (9/14/18) mit Ecdyson-induzierbarer AML1/ETO-Expression verwendet (s. Kapitel 1.3.5). Das Zellsystem wurde uns in Form des stabil aml1/eto-transfizierten U937-Klons 9/14/18 freundlicherweise von der AG Prof. Dr. Lübbert, Abteilung Innere Medizin I, Universitätsklinikum Freiburg, zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Medien und Zusätze für die Zellkultur

Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma
DMSO	Sigma
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco BRL/Invitrogen
Fetal Calf Serum (FCS)	Gibco BRL/Invitrogen
Ficoll, Lymphoprep	Gibco BRL/ Merck
G418 (Genetecin)	Gibco BRL
Natrium-Pyruvat (100 mM)	Gibco BRL / Invitrogen

Penicillin-Streptomycin (PS)	Gibco BRL/Invitrogen
Phosphate Bufferd Saline (PBS)	Gibco BRL/Invitrogen
Ponasteron A	Invitrogen
RPMI-1640 Medium	Gibco BRL/Invitrogen
Zeocin	Invitrogen

2.1.3 Bakterien

E. coli K91kan	zur Verfügung gestellt von George Smith, University of Missouri, Columbia, USA
----------------	---

2.1.4. Medien und Zusätze für die Bakterienkultur

Luria Broth Base (Miller`s)	Gibco BRL/Invitrogen
Terrific Broth	Gibco BRL/Invitrogen
NZY Broth	Gibco BRL/Invitrogen
Kanamycin	Merck
Tetrazyklin	Merck
Bacto Agar	Becton-Dickinson
Bacto Yeast Extract	Difco/ BD
Agarose, ultra pure	Difco
Terrific Broth Supplement (11,55g KH ₂ PO ₄ und 105 g K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O auf 500 ml ddH ₂ O)	alles von Merck

LB-Medium (Luria-Bertani)-Medium:

Zur Herstellung von LB-Medium wurden die einzelnen Komponenten (1% Bacto-Trypton, 0.1% NaCl, 0.5% Bacto-Hefe-Extrakt) in H₂O aufgelöst, der pH mit NaOH auf 7.0 eingestellt und das Medium anschließend autoklaviert. Die Aufbewahrung erfolgte bei Zimmertemperatur. Antibiotika wurden stets unmittelbar vor Beimpfung des Mediums zugesetzt.

LB-(tet)-Agarplatten:

Zur Herstellung von LB-(tet)-Agarplatten wurde 15 g Bacto-Agar 1000 ml LB-Medium vor dem Autoklavieren zugesetzt. Nach dem Abkühlen (ca. 55°C) wurden die Antibiotika zugefügt (20 µg Tetrazyklin/ml), die Platten wurden gegossen und bei 4°C aufbewahrt.

2.1.5 Phagen-Peptidbanken, Negativkontrollphagen

Eingesetzt wurden eine zyklische (CX₇C) und eine lineare (X₆) Phagen-Peptidbank, welche drei bis fünf Kopien der jeweiligen randomisierten Peptide an ihrer Oberfläche (mit C = Cystein und X = randomisierte Aminosäure) exprimieren und welche in Vorarbeiten von Dr.

Trepel, Abteilung Innere Medizin I, Universitätsklinikum Freiburg, nach dem von Smith und Scott (1993) beschriebenen Verfahren hergestellt wurden.

Negativkontroll- Bakteriophagen:

Insertlose Negativkontrolle: fd-tet-Phage.

Dieser Phage exprimiert kein zusätzliches pIII-Fusions-Peptid. Bindungen dieses Phagen an Zellen laufen also nicht peptidvermittelt ab und stellen somit ein Maß der unspezifischen Phagenbindung dar. Der in PBS gelöste insertlose fd-tet-Phagenklon wurde von George Smith, University of Missouri, Columbia, USA zur Verfügung gestellt und konnte nach Bedarf durch bakterielle Amplifikation mit sukzessiver Aufreinigung produziert werden.

Inserthaltige Negativkontrollen: Die beiden Phagen mit den Peptid-Sequenzen NK1: CGQXGGYKC und NK2: CWRHGPEFC wurden wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben aus der unselektierten Peptidbank amplifiziert. Die nicht eindeutig identifizierbare Aminosäure wurde mit X bezeichnet.

2.1.6 Materialien für molekularbiologische Arbeiten

2.1.6.1 Chemikalien und Reagenzien

Alle Chemikalien wurden in pro-analyse-Qualität bezogen.

Aqua ad iniectabilia	Boehringer-Ingelheim
Cyclohexan	BA 92581000 / Merck
Dibutylphthalat	Silbermann GmbH & Co KG
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Merck
Ethanol	Baker
Immunkomplex Waschpuffer high salt	Upstate
Immunkomplex Waschpuffer low salt	Upstate
Isopropanol	Merck
Kaliumhydrogenkarbonat	Merck
Methanol	Merck
Natriumacetat, wasserfrei	Merck
Natriumchlorid	Fluka
Natriumcitrat	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
NaOH-Plättchen	Baker
Natronlauge	Merck
PCR-Puffer	Perkin-Elmer

Polyethylenglycol	Caesar & Loretz GmbH
Salzsäure	Merck
SDS-Lysepuffer	Upstate
SDS Dodecylsulfat-Natriumsalz	Serva
Terrific Broth	Baack Laborbedarf
tri-Natriumcitrat	Merck
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck
Tritiplex III / EDTA	Merck
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Tris-Base	Sigma-Aldrich
Tris-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich
Tween-20	Sigma

2.1.6.2 Standard-Lösungen und Puffer

• NZY Broth	5g NaCl 2g MgSO ₄ *7H ₂ O 5g Bacto-yeast extract 10g NZamine (casein hydrolysat) 1l dd H ₂ O 1l Gesamtvolumen
• Denaturierungs-Lösung	0.5 M NaOH 1.5 M NaCl
• SDS, 20%	20.0 g SDS ca. 90.0 ml H ₂ O (lösen in 68°C Wasserbad) mit HCl pH auf 7.0 eingestellt ad 100.0 ml H ₂ O
• TBE, 10x	890 mM Tris-Borat (108 g Tris-Base + 55 g Borsäure /l) 25 mM EDTA (Titriplex) pH 8.0
• TE	100 mM Tris/HCl (pH 7.6) 10 mM EDTA pH 7.0

2.1.6.3 Enzyme

Taq DNA-Polymerase	Perkin Elmer
Proteinase K	Merck
RNase A	Sigma-Aldrich

2.1.6.4 Nukleinsäuren und Plasmide

dNTPs	Qiagen
-------	--------

Alle Oligonukleotide wurden von Dr. G. Igloi, Institut für Biologie III, Universität Freiburg, hergestellt.

2.1.6.5 Antikörper

anti-ETO, rabbit, polyclonal	Oncogene Research Products /Dianova /Calbiochem
anti-rabbit, IgG-HRP	Santa Cruz

2.1.6.6 Kits zur Bearbeitung von Nukleinsäuren

Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems
QIAPrep Spin MiniPrep Kit	Qiagen

2.1.6.7 Sonstige Materialien

PVDF-Membran Hybond-P	Amersham
-----------------------	----------

2.1.7 Geräte

ABI PRISM (Big) Dye Terminator	Applied Biosystems
Auflicht-Mikroskop Leica DMIL	Leica
Entwickler X-Omat M35	Kodak
Inkubator Heraeus 6000	Heraeus
Spektrometer DU640	Beckman
Sterile Werkbank CaminAir HB2448	Heraeus
T3 Thermocycler	Biometra

2.1.8 Spezielle bioinformatische Software

Nucleotide BLAST, National Center for Biotechnology Information, NIH, Maryland, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung und Aufreinigung primären Zellmaterials

Primäre akute myeloische Leukämiezellen:

In EDTA oder Heparin gelöste periphere Blut-, respektive Knochenmarksproben wurden nach Entnahme von Stationen, Hämatologischem- oder Zellmarkerlabor der Abteilung Innere Medizin I des Universitätsklinikums Freiburg zu Verfügung gestellt. Alle verwendeten Proben wurden aus diagnostischen Zwecken von Patienten mit einer AML gewonnen. Die für die diagnostischen Untersuchungen nicht mehr benötigten Probenreste wurden mit Einverständnis der Patienten zu experimentellen Untersuchungen übermittelt. Das Vorliegen einer AML wurde hinsichtlich des zytologischen, sowie, wenn vorhanden, histologischen und Zellmarker-Befundes der Probe verifiziert. Hierbei mussten nach FAB-Klassifikation mindestens 30 % Blasten im Knochenmark und /oder im peripheren Blut vorliegen. Zwischen primären und sekundären akuten myeloischen Leukämien wurde nicht differenziert. Material von an akuter Promyelozytenleukämie (FAB M3) erkrankten Patienten wurde auf Grund der pathophysiologischen Besonderheiten von den Selektionsansätzen ausgeschlossen. Die Zellproben mussten von unbehandelten Patienten stammen, ein weiteres Einschlusskriterium stellte das Einverständnis des Patienten dar. Mononukleäre Zellen des Knochenmarks, sowie des peripheren Blutes wurden durch Auftrennung im Dichtegradienten (Lymphoprep) gewonnen. Hierfür wurde die in Heparin oder EDTA gelöste Zellsuspension in PBS-Puffer verdünnt und im Anschluss vorsichtig auf ein äquivalentes Volumen Ficoll-Lösung geschichtet. Nach bremsfreier Zentrifugation (2300 rpm, 20 Minuten) wurde die mononukleäre Zellfraktion in ein frisches Reaktionsgefäß transferiert und zunächst mit 30-40 ml PBS-Lösung gewaschen. Die vorgereinigten Zellen wurden durch erneute leichte Zentrifugation (1200 rpm, 5 Minuten) von der Waschlösung getrennt und in etwa 25 ml RPMI resuspendiert. Durch nochmalige Wiederholung des letztgenannten Waschschruttes wurde die möglichst schonende, aber gründliche Beseitigung von mit Zelloberflächenmolekülen interagierenden Ficoll-Lösungsrückständen bezweckt. Nach erneuter Aufnahme der Zellen in RPMI folgte die Bestimmung der Zellkonzentration in der Neubauer- Zählkammer (s. Kapitel 2.2.2).

Knochenmark- und periphere Blutzellen nicht-leukämischer Spender als

Negativkontrolle:

Die für Screening und Kontrollzwecke verwendeten mononukleären Zellen entstammten peripheren Blutproben freiwilliger gesunder Spender innerhalb der Arbeitsgruppe. Gesunde Knochenmarkzellen stammten zum Teil ebenfalls von freiwilligen gesunden Spendern innerhalb der in der Abteilung arbeitenden Arbeitsgruppen, jedoch zum größten Teil von

Patienten, bei welchen die Zellen aus diagnostischen Gründen entnommen und als unauffällig befundet wurden. Hier wurde dezidiert darauf geachtet, dass morphologisch und im Zellmarkerprofil keine malignen Zellen vorlagen. Meist handelte es sich um Proben, die im Rahmen von Staginguntersuchungen bei Patienten mit Lymphomen, Mamma- oder Bronchialkarzinomen entnommen wurden. Auch hierbei handelte es sich um Probenreste, welche für die diagnostischen Untersuchungen nicht mehr benötigt und mit Einverständnis der Patienten zu experimentellen Untersuchungen übermittelt wurden. Ein Ethikvotum der Universität Freiburg zur Verwendung von leukämischen und gesunden Knochenmarkzellen, sowie peripheren mononukleären Blutzellen für die Selektion von Phagen-Peptidbanken lag vor (Ethikvotum Universitätsklinik Freiburg Nr.48/2001). Die Gewinnung der mononukleären Zellen aus den nicht-leukämischen Proben erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation analog der Zellgewinnung aus leukämischen Proben (s.o.).

2.2.2 Zellkultur

Alle verwendeten Zelllinien wurden bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Zellkulturarbeiten wurden ausschließlich an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Einzufrierenden Zellen wurden pelletiert (5 Minuten, 1200 rpm) und im Anschluss in eisgekühltem Einfriermedium (90% FCS und 10 % DMSO) bis zu einer Zelldichte von 10X10⁶ Zellen /ml aufgenommen, in Portionen von 1ml in Kryokonservierungsröhrchen aliquotiert, bei -80°C ein bis zwei Tage gelagert und danach in flüssigen Stickstoff transferiert. Zum Auftauen wurden die Zellen kurz in ein 37°C warmes Wasserbad getaucht. Jeweils 1ml der Zellsuspension wurde sofort in 15ml 37°C warmem Medium aufgenommen, zentrifugiert und in der gewünschten Dichte resuspendiert. Alle Medienansätze mit RPMI-1640 wurden mit 5ml Natriumpyruvat-Lsg. und 5ml Penicillin-Streptomycin-Lsg. auf 500 ml versetzt. Die Zelllinie HL-60 wurde mit RPMI-1640, 10 % FCS kultiviert. Die Zelllinien Kasumi-1 und SKNO-1 erhielten nach dem Auftauen ein Initialmedium mit einer erhöhten FCS- Konzentration (20%), später das Medium RPMI-1640 mit 15% FCS. Als GM-CSF abhängige Zelllinie wurde SKNO-1 10 ng/ml Granulocyten-Macrophagen Colony-stimulating factor hinzu gegeben (Matozaki et al., 1995). Die Beurteilung der Viabilität der Zellen sowie deren Zählung erfolgte mittels Trypanblaufärbung und Neubauer-Zählkammer.

2.2.3 Phagen-Peptidbanken, Phagenlösungen

Vor und nach allen Arbeiten mit Phagen-Peptidbanken und Phagenlösungen wurde der entsprechende Arbeitsbereich, sowie die benutzten Geräte mehrfach mit Tensiden gereinigt, während der Arbeitsabläufe wurde durch konsequentes Wechseln von Handschuhen, Pipettenspitzen, Gefäßen etc, das Kontaminierungsrisiko reduziert.

2.2.4 Generierung von inserthaltigen Negativkontrollphagen

Zur weiteren Kontrolle der Spezifität einer peptidvermittelten Phagen-Zell-Bindung nach Selektion (s.u.) wurden ohne Selektion vier Phagen aus der verwendeten Peptidbank CX₇C zufällig ausgewählt, vermehrt, aufgereinigt und identifiziert. Hierfür wurden zunächst von einer tetrazyklinhaltigen Agarplatte, welche zur Titerbestimmung der CX₇C-Peptidbank verwendet worden war, nach dem Zufallsprinzip vier Klone mittels Pipettenspitze „gepickt“, jeweils in 3 ml vorgewärmtem TB-Medium (+ Supplement + 100µg Kanamycin/ml) in je einem 15ml Reaktionsgefäß suspendiert. Die Bakterien wurden etwa zwei Stunden im 37°C Schüttler zum Wachsen angeregt und anschließend jeweils in 15 ml Falcon-Reaktionsgefäße mit 10 ml vorgewärmten NZY + 0.2 µg Tetrazyklin/ml transferiert. Nach erneutem Wachstum über etwa zehn Stunden bei 37°C wurden die amplifizierten Bakterien-Phagen-Suspensionen bei 8000 rpm über 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand mit den enthaltenen Phagen wurde in 15 ml Reaktionsgefäßen gegossen. Nach dem Standardaufreinigungsprotokoll für Phagen von Smith erfolgte die Phagenisolierung mittels Präzipitation (s. Kapitel 2.2.6.3.)

2.2.5 Titerbestimmung von Bakteriophagenlösungen

Zur Titerbestimmung wurden die Phagen-Peptidlösungen in Verdünnungsreihen bis 1:10¹¹ in PBS verdünnt und 30 Minuten mit je 180 µl einer K91kan E.coli-Bakterienkultur (OD₆₀₀: 0,16 bis 0,21 in einer 1:10 Verdünnung) inkubiert. Die durch Internalisierung der Phagen tetrazyklinresistenten Bakterien wurden auf LB-tet-Agarplatten ausplattiert. Durch die Kolonienanzahl auf einer Platte eines bestimmten Verdünnungsfaktors konnte die Zahl transduzierender „Units“ pro Phagenlösung festgelegt werden. Alle Verdünnungsreihen wurden in dreifachen Ansätzen durchgeführt, der Mittelwert bestimmt.

2.2.6 Übersicht über das Selektionsverfahren

Die an der Oberfläche der Bakteriophagen aus den verwendeten Phagen-Peptidbanken exprimierten randomisierten Peptide vermitteln die Interaktion der Phagen mit Oberflächenstrukturen der Ziel-Zellen (AML-Blasten). Ziel ist die Selektion und Identifikation solcher Peptide, die spezifisch mit Oberflächenmolekülen von AML-Blasten interagieren, während eine solche Interaktion mit gesunden Zellen unterbleibt. Hierfür müssen in den Phagen-Peptidbanken zunächst die an ubiquitär exprimierte Rezeptoren bindenden Phagen reduziert werden. Dieses Verfahren wird als Negativselektion bezeichnet. Hierbei werden nicht-leukämiespezifisch bindende Phagen durch Inkubation der Phagen-Peptidbank auf nicht-malignen mononukleären hämatopoetischen Zellen eliminiert, die nicht gebundenen Phagen werden so als vorgereinigte Phagenlösung der Positivselektion zugeführt (Abb.2.1). Die negativselektierte Phagen-Peptidbank wird nun mit geringerer Diversität der so genannten Positivselektion auf AML-Blasten zugeführt (Abb.2.1). Die an die Ziel-Zellen bindenden Phagen sind von Interesse und werden mittels differentieller Zentrifugation durch eine

Dibutylphthalat-basierte Ölschicht von den ungebundenen Phagen getrennt (Giordano et al., 2001). Die so isolierten Leukämiezell-Phagen-Komplexe werden mit K91kan E.coli Bakterien inkubiert, so dass die initial leukämiezellgebundenen Phagen in die Bakterien internalisiert und amplifiziert werden. Anschließend erfolgt die Aufreinigung der amplifizierten Partikel, um so die auf bestimmte Rezeptoren vorausgerichtete Peptidbank einer erneuten und stringenter werdenden (z.B. geringerer Phagen-Input, intensivere Negativselektion, kürzere Bindungszeiten etc.) Selektionsrunde zuführen zu können (Abb.2.1). Zur erfolgreichen Selektion eines möglichst spezifisch an Leukämiezellen bindenden Phagenpeptides wurden jeweils drei bis vier solcher Selektionsrunden durchgeführt. Die so selektierten Phagen, deren spezifische Bindung an AML-Blasten postuliert wird, werden in Einzelklonen durch Sequenzierung auf die Peptide hin untersucht, die die AML-Bindung vermittelt haben. Im Idealfall ergibt sich ein Muster an Peptiden, die sich strukturell sehr ähnlich sind, ohne über die gesamte Peptidlänge identisch zu sein (Peptidmotive). Häufig ist es jedoch so, dass die Selektion einen einzelnen besonders gut bindenden Klon mehrfach angereichert hat, und dadurch andere ähnliche Sequenzen aufweisende Peptide fehlen. Die angereicherten Einzelklone werden nachfolgend in Einzelklonbindungsversuchen auf ihre Bindungsfähigkeit an AML-Zellen im Vergleich zu nicht-selektierten Phagen der selben Phagen-Peptidbank und einem insertlosen Phagen (Negativkontrollen) auf ihre AML-Blasten-Bindungsfähigkeit, sowie ihre Bindung an nicht-malignen hämatopoetischen Zellen überprüft.

2.2.6.1 Negativselektion: Vorreinigung einer Phagen-Peptidbank

In der initialen Negativselektion innerhalb von Selektionsansätzen, die auf die Isolierung von an AML-Blasten bindende Phagen zielten, wurden 5×10^{10} bis 1×10^{11} TU der Phagen-Peptidbank auf 1×10^7 nicht-malignen hämatopoetischen mononukleären Zellen vorselektiert. Hierfür wurden primäre Zellen des peripheren Blutes gesunder Spender mit dem entsprechenden Volumen einer CX₇C Phagen-Peptidbank unter Zugabe von 300µl RPMI /BSA 1% resuspendiert und eine Stunde bei Raumtemperatur auf der Drehplattform inkubiert. Anschließend wurde die Suspension bei 1200 rpm über 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand konnte nun der ersten Positivselektion zugeführt werden. In den nachfolgenden Runden wurden jeweils 2×10^9 TU der vorgereinigten Phagen-Peptidbank auf 1×10^6 bis 5×10^6 mononukleären Zellen aus nicht-malignem Knochenmark (um die Ähnlichkeit zu den Ziel-Blasten im Vergleich zu mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut zu erhöhen) über jeweils eine Stunde inkubiert, bei 1200 rpm über 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand zur erneuten Resuspendierung von 1×10^6 bis 5×10^6 gesunden mononukleären Knochenmarkszellen verwendet, welche wiederum über eine Stunde inkubiert wurden. Dieser Schritt wurde in Selektionsrunde zwei bis vier des Selektionsvorganges jeweils vor Durchführung einer Positivselektion viermal wiederholt.

2.2.6.2 Positivselektion: Inkubation von vorgereinigten Peptidbanken auf Ziel-Zellen

In der ersten Selektionsrunde wurden mit der vorgereinigten Phagen-Peptidbank 5×10^6 aufgereinigte Zellen des Interesses (mononukleäre Zellen aus AML-Knochenmarks- oder peripheren Blutproben mit einem ausreichenden Blastenanteil) resuspendiert und über Nacht bei 4°C auf der Drehbank inkubiert. In der zweiten bis vierten Selektionsrunde wurden entsprechend die je Selektionsrunde in der Negativselektion gewonnenen vorgereinigten Phagen-Peptidbank-Lösungen zur Resuspendierung von jeweils 1×10^6 bis 5×10^6 Zellen (nun sowohl AML Blasten, als - auch in einem Parallelansatz - mononukleäre Zellen gesunder Spender) verwendet. Die Inkubation der Phagen auf den Zellen erfolgte nun nur über 5 Minuten auf der Drehbank, allerdings bei Raumtemperatur. Die zellgebundenen Phagen wurden im Anschluss mittels differentieller Zentrifugation von den ungebundenen Phagen getrennt und bakteriell amplifiziert wie in Kapitel 2.2.6.3 und 2.2.6.4 beschrieben.

Zur Bestimmung der Spezifität der in jeder Selektionsrunde zellgebundenen Phagen wurden nach kurzer Wachstumsphase der mit den Phagen beimpften Bakterien Aliquots von je $100\mu\text{l}$ und $10\mu\text{l}$ entnommen und auf LB-Agarplatten mit einem Tetrazyklingehalt von $20\mu\text{g/ml}$ ausplattiert (alle Ausplattierungen wurden in dreifachen Ansätzen durchgeführt, Koloniezahlen zwischen 30 und 700 pro Platte als auswertbar definiert und der jeweilige Mittelwert aus den Versuchstriplets ermittelt). Diese Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Da nur Bakterien wachsen konnten, die durch die Klonierung des Phagengenoms eine Tetrazyklinresistenz entwickelt hatten, konnte durch Auszählen der Kolonien die Anzahl der selektierten Phagen unter Berücksichtigung der Verdünnungsschritte ermittelt werden (Phagen-Output). Vergleich man direkt innerhalb einer Selektionsprozedur die Anzahl der auf AML-Blasten selektierten Klone mit der Anzahl der an auf nicht-malignen mononukleären Zellen gebundenen Klone, so erhielt man eine Aussage über die Spezifität der angereicherten Phagenklone.

Setzte man den Phagen-Output ins Verhältnis zum initialen Phagen-Input, so erhielt man die so genannte „Phagen Output/Input- Ratio“. Dieses Output /Input-Verhältnis sollte sich über die erfolgten drei bis vier Selektionsrunden bei erfolgreicher Anreicherung deutlich erhöhen.

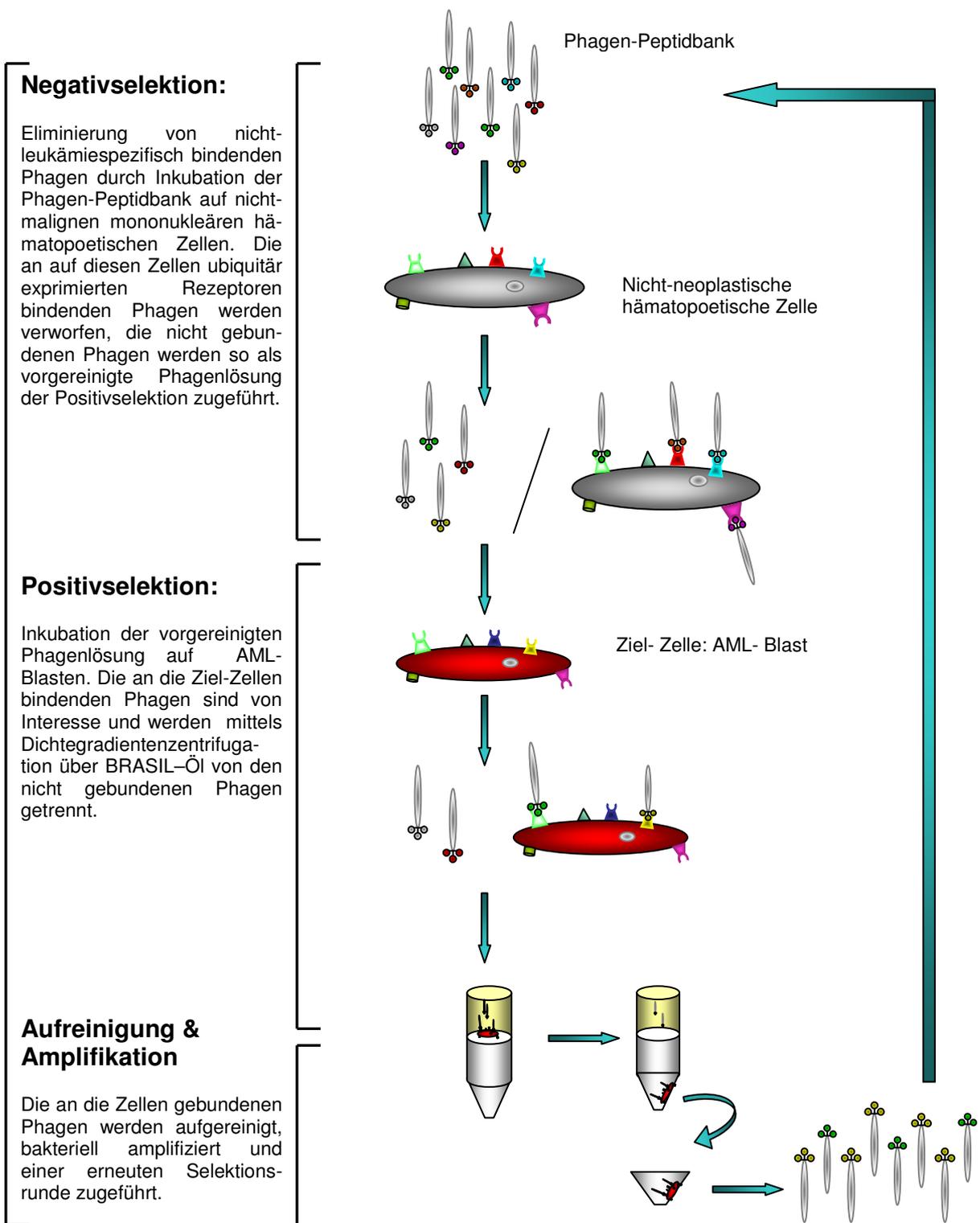


Abbildung 2.1

Grundprinzip der Selektion von Phagen-Peptidbanken auf primären hämatopoetischen Leukämiezellen

2.2.6.3. Isolierung zellgebundener Phagen

Nach Inkubation der vorgereinigten Phagen-Peptidbank auf den Ziel-Zellen sind die an die AML-Blasten gebundenen Phagen von Interesse. Um diese zellgebundenen Phagen von den ungebundenen zu isolieren und im Anschluss zu amplifizieren wurden zwei Methoden angewandt:

Die weniger stringente Trennung der an AML-Zellen gebundenen Phagen von den nicht gebundenen bestand in der einfachen Zentrifugation der Zell-Phagen-Suspension in der Minizentrifuge bei 1000rpm über 5 Minuten, anschließend wurde der Überstand mit den ungebundenen Phagen verworfen, die pelletierten Zellen mit den gebundenen Phagen in 800µl RPMI/1% BSA resuspendiert und dieser Schritt mit erneuter Zentrifugation und Resuspension unter gleichen Bedingungen wiederholt. Nach zweimaligen Waschschritten erfolgte die Resuspension in 200µl PBS, die so gereinigte Zell-Phagen-Suspension mit gebundenen Phagen wurde bei 4°C gelagert, bis die zur Amplifikation benötigten K91kan E.coli-Bakterien in der richtigen Wachstumsphase waren. Dieses Verfahren ist relativ „unsauber“, da man für eine präzisere Trennung der nicht-gebundenen von den gebundenen Phagen möglichst viele Waschschrritte benötigte, so dass eine hohe Reinheit mit einem hohen Verlust an Phagen, so möglicherweise auch eines potentiell spezifisch bindenden Phagen einherginge. Möchte man einen hohen Phagenverlust vermeiden und bedarf jedoch einer derartig niedrigen Stringenz, so eignete sich dieses Verfahren unter Inkaufnahme einer nur geringen Eliminierung unspezifisch bindender Phagen. So wurde es in der initialen Selektionsprozedur bei der Selektionierung von an AML1/ETO-positive Zellen bindende Phagen angewandt, da hier nur eine geringfügige Differenz des Oberflächenprofils der Zellen der Positiv- und Negativsektion postuliert wurde, und man nicht zu viele potentiell bindende Phagen in der ersten Prozedur verlieren wollte (s. Kapitel 2.2.10).

Eine weitaus stringenter Methode der Isolierung zellgebundener Phagen wurde 2001 von Giordano et al. entwickelt und hat damit die Effizienz der Selektionierung spezifisch bindender Peptid-Phagen erheblich gesteigert. Dieses Verfahren beruht auf der Trennung der zellgebundenen Phagen von den ungebundenen Phagen durch differentielle Zentrifugation durch eine Butylphthalat-basierte Ölschicht. Zunächst wurde diese auch „BRASIL-Öl“ genannte Lösung frisch präpariert, indem Butylphthalat 10:1 mit Cyclohexan verdünnt wurde. In der Regel wurden pro Inkubationsansatz zwei 400µl Eppendorfgefäße mit je 200 µl BRASIL-Öl gefüllt, so dass die 300-400 µl Zell-Phagen-Suspension mit je 150-200 µl auf die beiden Gefäße verteilt werden konnten. Die Röhrchen mit der auf das Öl geschichteten Zell-Phagen-Suspension wurden in der auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge bei 10000g über 10 Minuten zentrifugiert. Durch den Dichtegradienten und die hohe Geschwindigkeit konnten so die Zellen mit den daran gebundenen Phagen pelletiert werden, während die ungebundenen Phagen die Ölschicht nicht durchdringen konnten (Abb.2.2). Nach der Zentrifugation wurden die Eppendorfröhrchen bei -80 °C eingefroren. Um die an

die Zellen gebundenen Phagen getrennt von den über der Ölschicht lokalisierten ungebundenen Phagen der anschließenden bakteriellen Amplifikation zuführen zu können, wurden von den tiefgefrorenen Eppendorfröhrchen die die pelletierten Zellen samt gebundener Phagen enthaltenden Gefäßspitzen mit einem Skalpell schräg abgetrennt (Abb.2.2). Die abgeschnittenen Gefäßspitzen wurden mit ihrem Zell-Phageninhalt in 2ml Eppendorfgefäße transferiert und die Pellets mit jeweils 100µl PBS resuspendiert. Die abgeschnittenen Spitzen verblieben in den 2ml Röhrchen. Nun wurden zur Amplifikation der selektierten Phagen K91kan E.coli-Bakterien in der richtigen Wachstumsphase hinzugefügt (s. Kapitel 2.2.6.4.). Dieses Verfahren wurde spätestens ab der zweiten Selektionsrunde in jedem Selektionsversuch durchgeführt.

2.2.6.4. Bakterielle Amplifikation gewonnener Phagen

Die Zielzell-gebundenen Phagen wurden in jeder Selektionsrunde in einer K91kan E.coli-Bakterienkultur in früher Wachstumssättigungsphase amplifiziert. Hierfür wurden den Phagen-enthaltenden, resuspendierten Zellpellets 500 µl einer K91kan E.coli Bakterienkultur mit einer OD₆₀₀ von 0,16-0,2 (in einer 1:10 TBS-Verdünnung gemessen) zugegeben. Die Zell-Phagen-Bakterien-Suspension wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert, die Gefäße alle 10 Minuten invertiert. Im Anschluss an diese Inkubation wurden die 600-900 µl Suspension in 20 ml vorgewärmtes NZY-Medium mit einem Tetrazyklingehalt von 0,2 µg/ml überführt und weitere 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Während der Inkubation wurden die ursprünglich an die Ziel-Zellen gebundenen Phagen von den Bakterien internalisiert und durch Bakterienwachstum amplifiziert. Der geringfügige Tetrazyklingehalt im Wachstumsmedium sollte die Resistenzfähigkeit der durch erfolgreiche Phagenplasmidaufnahme tetrazyklin-resistenten E.coli-Bakterien anregen, so dass nachfolgend ein Wachstum auf LB-tet-Platten der mit Phagen transfizierten Bakterien möglich war.

In den Selektionsrunden wurden nach Entnahme von entsprechenden Aliquots (s. Kapitel 2.2.6.2) die Kulturen zur weiteren bakteriellen Amplifikation der selektierten Phagen im 37°C-Schüttler über Nacht inkubiert. Sollten Phagen aus einer reinen Phagenlösung (s. z.B. Herstellung der Negativkontrollen 2.2.4) amplifiziert werden, so wurden 5-20µl Phagenlösung direkt mit der Bakterienkultur (OD₆₀₀ 0,16-0,2 in einer 1:10 TBS-Verdünnung) inkubiert und nach oben beschriebenem Prinzip weiterverarbeitet.

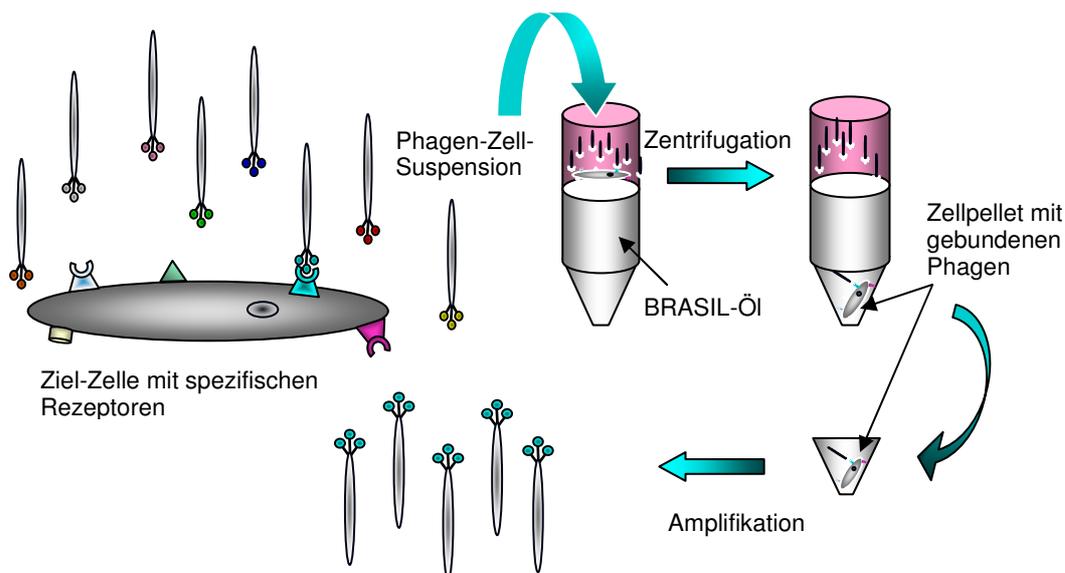


Abbildung 2.2:
Grundprinzip der Trennung zellgebundener von ungebundenen Phagen mittels differenzieller Zentrifugation über BRASIL-Öl:

Nach Inkubation von Phagen auf Ziel-Zellen wird die entstandene Zell-Phagen-Suspension mit spezifisch gebundenen und nicht gebundenen Phagen auf eine Butylphthalat-basierte Ölschicht (BRASIL-Öl) geschichtet, durch differenzielle Zentrifugation werden die Zellen mit den daran gebundenen Phagen pelletiert, während die ungebundenen Phagen die Ölschicht nicht durchdringen können. Von den tiefgefrorenen Reaktionsgefäßen werden die die pelletierten Zellen samt gebundener Phagen enthaltenden Gefäßspitzen mit einem Skalpell schräg abgetrennt, die Phagen bakteriell amplifiziert und aufgereinigt.

2.2.6.5. Aufreinigung von Phagenlösungen durch Präzipitation

Als Ausgangsmaterial für die Phagenpräzipitation diente eine über Nacht bei 37 °C dicht gewachsene, mit den aufzureinigenden Phagen beimpfte K91kan E.coli- Bakterienkultur. Die Bakteriensuspension mit den amplifizierten Phagen wurde bei 8000 rpm über 15 Minuten zentrifugiert. Der die Phagen enthaltende Überstand wurde anschließend in ein sauberes Gefäß abgegossen. Zur Präzipitation wurden nun pro 10 ml Überstand 1.5 ml Polyethylenglycol zu dem gewonnenen Überstand gegeben, die entstandene Lösung geschüttelt und im Anschluss mindestens 1 Stunde (meist jedoch über Nacht) bei 4°C inkubiert. Für die hier verwendeten Polyethylen-Partikel wurde korrespondierend zu der Phagengröße eine Partikelgröße von 800 gewählt, um eine Fällung zu ermöglichen.

Nach erfolgter Inkubation wurden die Phagenpartikel bei 8000rpm über 20 Minuten bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde abgegossen. Um PEG-Reste möglichst vollständig zu entfernen und das Phagenpellet weiter zu konzentrieren, wurde erneut bei 8000rpm über 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das nun vorliegende Phagenpellet in 200 bis 400µl TBS resuspendiert. Diese Phagenlösungen wurden

anschließend in 1,5ml-Eppendorfreaktionsgefäße transferiert und nochmals mit 14000rpm über 10 Minuten zentrifugiert, um Bakterien-Debris zu eliminieren. Der so erhaltene Überstand wurde in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß transferiert und enthielt nun die gewünschte aufgereinigte Phagenlösung.

2.2.7 Gen- Sequenzierung selektierter Phagen

Die Gen-Sequenzierung wurde als Auftragsarbeit von der Core Facility der Abteilung Innere Medizin I des Universitätsklinikums Freiburg durchgeführt. Die interessierenden DNA-Plasmide mussten hierfür wie folgt präpariert werden.

Mini-Präparation von Plasmid-DNA:

Für die Isolation der das Phagen genom enthaltenden Plasmide aus K91kan E.coli-Bakterien wurde das Mini-Prep Kit von Qiagen benutzt. Hierfür wurde zunächst der zu sequenzierende Klon in einer Bakterienkultur in 2 bis 5 ml TB unter Zugabe von Kanamycin und Supplement bei 37 °C im Schüttler bei ca. 300 rpm über Nacht amplifiziert. Die Bakterien wurden anschließend bei 14000rpm und 4°C pelletiert, das Pellet in 250 µl Puffer P1 (50 nM Tris/HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100µg/ml RNase A) resuspendiert und der Ansatz in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß übertragen. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte anschließend nach Angaben des Herstellers und unter Verwendung der mitgelieferten Puffer (250 µl P2, 350 µl N3) über die Bindung der DNA an eine Säule, mit anschließender Eluierung der DNA mittels EB-Puffer und Zentrifugation. Der DNA-Gehalt des Eluats wurde mit einem Kappillarphotometer bestimmt.

DNA-Bestimmung:

Die Konzentrationsbestimmung der gewonnenen DNA erfolgte photometrisch unter Verwendung von 0,5 mm Messkapillaren mit dem Densitometer GeneQuant Pro. Hierbei wurde die Nukleinsäureeigenschaft ausgenutzt, Licht bei einer Wellenlänge von 260nm maximal zu extinguieren. Mittels der optischen Dichte (OD_{260}) und des Warburgischen Extinktionskoeffizienten e ließ sich die Konzentration berechnen. Der Leerwert wurde mit Aqua bidestilata bestimmt.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR):

Um die für das randomisierte Peptid kodierende Nukleotidsequenz sequenzieren zu können, wurden Amplifikate des entsprechenden Plasmid-DNA-Abschnittes benötigt. Hierfür erfolgte die DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion wie von Saiki et al. (1988) beschrieben. Der genutzte Primer war AGGTCTAGAATTGCCCCAGCGGCCCC.

Pro Reaktion wurden ca. 800ng durch Mini-Präparation (s.o.) gewonnene Plasmid-DNA eingesetzt. Die jeweils doppelsträngigen DNA-Vorlagen wurden mit 3,2 pmol Primer und 4 µl

Big Dye-Premix versetzt und mit einem entsprechenden Volumen H₂O (Aqua bidestilata) zu einem Gesamtvolumen von 20 µl gemischt. Alle vorbereitenden Pipettierungsschritte erfolgten auf Eis und unter sorgfältiger Vermeidung von Kontamination.

Die sich nun anschließenden Amplifikationsreaktionen wurden in Thermocyclern von Biometra (T3 Thermocycler) und MJ Research 8Thermocycler PTC200) mit 25 Zyklen nach folgendem Programm durchgeführt:

Einmalig	96 °C, 3 Minuten	
Denaturieren:	96 °C, 30 Sekunden	} 25 Zyklen
Annealing:	50 °C, 15 Sekunden	
Extension	60 °C, 4 Minuten	

Die so erhaltenen Amplifikate wurden in 1,5 ml-Reaktionsgefäße transferiert, kurz mit 80µl einer 75%igen Isopropanollösung gemischt und bei 14000rpm über 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Nach Zugabe von 250µl 75%iger Isopropanollösung wurde die Lösung erneut zentrifugiert (14000rpm, 5 Minuten). Nach Abpipettieren des Überstandes wurde das Pellet 1 Minute bei 90 °C getrocknet und schließlich bei -20 °C eingefroren. Die gefrorenen Pellets wurden der Core Facility der Abteilung Innere Medizin I des Universitätsklinikums Freiburg zur Sequenzierung gegeben. Die Sequenzierung nach kontrollierten Unterbrechung der enzymatischen Replikation durch 2',3'-Dideoxynanaloge der jeweiligen Nukleotide (Sanger et al., 1977) erfolgte mit Hilfe des „ABI PRISM (Big) Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ von Applied Biosystems und wurde mit ABI 373 oder ABI 377 Sequenzierautomaten durchgeführt.

2.2.8 Induktion der AML1/ETO-Expression in einem Ecdyson-inuzierbaren U937-Zellsystem

Die stabil transfizierten Klone des humanen monoblastären U937-Zellsystems mit induzierbarer AML1/ETO- Expression (9/14/18) wurden in RPMI-1640 mit 20 % FCS und einem Zusatz von 400-600µg/ml G418 und 100-200µg/ml Zeocin kultiviert. Zur Induktion der AML1/ETO-Expression wurde das Ecdyson-Analogon Ponasteron A verwendet. Zur Herstellung einer 1mM Hormon-Stammlösung wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren und 250µg Ponasteron A mit 500µl 100% Ethanol gelöst. Hiervon wurden 100µl zur Induktion einer sich in einem Volumen von 20ml befindenden Zellkultur (also 5µM) gegeben, zur Kontrolle des toxischen Ethanoleffektes wurden der nicht-induzierten Kontrollkultur zum gleichen Zeitpunkt 100µl 100% Ethanol zugesetzt.

2.2.9 Western-Blot

Die auf AML1/ETO-Expression zu untersuchenden Zellen wurden mittels Lyse-Buffer RIPA (Radioimmunopräzipitations Assay) (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% Sodium Deoxycholate, 0,1% SodiumDodecylsulfat (SDS, pH7.4)) nach Anleitung des Herstellers (Roche, Basel, Schweiz) lysiert. Die gewonnenen Lysate wurden für 10 Minuten in NuPage LDS sample-Buffer gekocht, dann durch Sodium Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese getrennt. Hierfür wurde das NuPage-Elektrophorese-System von Invitrogen benutzt. Nach der Auftrennung folgte der Transfer auf die PVDF-Membranen nach den Anleitungen des Herstellers (Hybond P, Amersham). Schließlich wurden die Membranen mit 5%igem Milchpulver in TBS-Tween 20 über Nacht auf dem Schüttler geblockt. Die Blots wurden dann mit einem ETO-spezifischen polyklonalen Kaninchen-Antikörper (Oncogene, Research Products, Calbiochem-Novabiochem, Deutschland) 90 Minuten inkubiert, gewaschen und anschließend mit einem Peroxidase konjugierten Anti-Kaninchen-Antikörper (Santa Cruz) über 60 Minuten inkubiert und im Anschluss erneut gewaschen (TBS, TBS-Tween). Die Membran wurde dann mittels „enhanced chemoluminescence“ (ECL plus, Amersham Biosciences Europe, Freiberg, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers entwickelt.

2.2.10 Selektionsverfahren auf einem AML1/ETO-induzierbaren Zellsystem

Zur Anreicherung von Liganden für Oberflächenmoleküle, die auf AML1/ETO-positiven Zellen exprimiert und auf sonst identischen, aber AML1/ETO-negativen Zellen nicht oder geringer exprimiert werden, wurden in einem Selektionsansatz vier aufeinander folgende Selektionsrunden mit der zyklischen Phagen-Peptidbank CX₇C durchgeführt. Hierfür wurde das unter Kapitel 2.2.8 beschriebene U937-Zellsystem verwendet, in welchem die Ecdyson-induzierbare AML1/ETO-Expression möglich ist. Das Grundprinzip des Selektionsverfahrens ist Kapitel 2.2.6 zu entnehmen. Für die Negativselektion wurden AML1/ETO-transfizierte aber nicht-induzierte Zellen verwendet. Auf den induzierten, AML1/ETO-exprimierenden Zellen wurde anschließend in jeder Selektionsrunde die entsprechende Positivselektion durchgeführt. Diese ausgeprägte Ähnlichkeit der Zellen, die zur Vorreinigung der Peptidbank dienen, mit denen, auf welchen Phagen selektiert wurden, erforderte initial sehr gering stringente Bedingungen, um nicht zu viele potentiell bindende Phagen schon bei Versuchsbeginn zu eliminieren.

Selektionsrunde I: Negativselektion: 10^7 AML1/ETO-transfizierte aber nicht-induzierte humane monoblastäre U937-Zellen wurden von Kulturmedium gereinigt und in 300µl RPMI/ BSA 1% mit $1,25\mu\text{l} \times 10^9$ TU einer CX₇C Phagen-Peptidbank resuspendiert. Die Phagen-Peptidbank wurde auf den nicht-induzierten Zellen zwei Stunden bei Raumtemperatur auf der Drehbank inkubiert, im Anschluss wurden die nicht gebundenen Phagen durch Zentrifugation bei

4000rpm über 5 Minuten von den gebundenen Phagen getrennt und der vorgereinigte Überstand der Positivselektion zugeführt.

Positivselektion: In der Zellkultur wurde wie unter 2.2.8 beschrieben eine Kulturflasche AML1/ETO-transfizierter U937-Zellen über 48 Stunden mit in Ethanol gelöstem Ponasteron A, eine weitere Flasche lediglich mit Ethanol behandelt. Nach 48 Stunden wurden diese Zellen gleichsam aufgereinigt (mehrfaches Waschen in 10ml PBS mit jeweiliger Zentrifugation bei 1200 rpm über 5 Minuten) und schließlich in je 160 µl der vorgereinigten Phagen-Peptidbank unter Zugabe von je 200 µl RPMI/ BSA 1% resuspendiert. Es folgte die Inkubation über 14 Stunden auf der Drehbank bei 4°C. Die sich daraufhin anschließende Trennung der zellgebundenen Phagen von den ungebundenen Phagen erfolgte in dieser ersten Selektionsrunde nicht wie vorab beschrieben über differentielle Zentrifugation, sondern zur Senkung der Anfangsstringenz über dreifache Wachsschritte in RPMI/BSA 1% wie unter 2.2.6.3 beschrieben. Zu den so gewonnenen Zell-Phagen-Suspensionen wurden je 500µl einer K91kan E.coli-Bakterienkultur mit einer OD₆₀₀ von 0,16 in einer 1:10 TBS-Verdünnung gegeben, es erfolgte – wie vorab beschrieben – die bakterielle Amplifikation und Aufreinigung der zellgebundenen Phagen. Nach jeder Selektionsrunde wurde der Titer der so gewonnen Phagenlösung bestimmt (s. Kapitel 2.2.5).

Selektionsrunde II: hier wurde die Stringenz des Selektionsansatzes leicht erhöht. Die Negativselektion erfolgte durch Inkubation von 1×10^9 TU vorselektierter Phagen-Peptidbank-Lösung auf 5×10^6 AML1/ETO-transfizierten, nicht-induzierten U937-Zellen. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur auf der Drehplattform wurden die gebundenen Phagen mit den Zellen pelletiert, der Überstand einer erneuten Negativselektion auf 5×10^6 AML1/ETO-transfizierten, nicht-induzierten U937-Zellen unter gleichen Bedingungen zugeführt. Der so vorgereinigte Überstand wurde zur Resuspendierung von jeweils 5×10^6 AML1/ETO-transfizierten, nicht-induzierten U937-Zellen (Kontrolle) und induzierten Zellen im Rahmen der folgenden Positivselektion genutzt. Die Inkubation erfolgte über 8 Stunden bei 4 °C; die anschließende Trennung der gebundenen Phagen erfolgte nun mittels differentieller Zentrifugation über BRASIL-Öl. Die übrigen Schritte erfolgten wie in Selektionsrunde I.

Selektionsrunde III: Die Stringenz der Selektionsbedingungen wurde weiter erhöht. In der Negativselektion wurden 2×10^9 TU der Phagenlösung aus Selektionsrunde II auf 5×10^6 AML1/ETO-transfizierten, nicht-induzierten U937-Zellen inkubiert. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur auf der Drehplattform wurden die gebundenen Phagen mit den Zellen pelletiert, der Überstand einer erneuten Negativselektion auf 5×10^6 AML1/ETO-transfizierten, nicht-induzierten U937-Zellen unter gleichen Bedingungen zugeführt. Insgesamt erfolgte hier die viermalige Negativselektion auf den nicht-induzierten U937-Zellen. Bei der anschließenden Positivselektion wurden jeweils 180 µl der vorgereinigten Phagenlösung unter Zugabe von je 200 µl RPMI/ BSA 1% zur Resuspendierung von 1×10^6

AML1/ETO-transfizierten, nicht-induzierter U937-Zellen (Kontrolle) und induzierten, AML1/ETO-positiven Zellen genutzt. Es wurde nun bei Raumtemperatur über 5 Minuten inkubiert. Die sich anschließenden Versuchsschritte wurden entsprechend denen in Selektionsrunde II durchgeführt.

Selektionsrunde IV: Die Negativselektion erfolgte analog der in Selektionsrunde III mit einem Phagen-Input von 2×10^9 TU der Phagenlösung aus Selektionsrunde III. In der Positivselektion wurden je 150 μ l der gewonnenen Phagenlösung auf 1×10^6 AML1/ETO-transfizierten, nicht-induzierten U937-Zellen (Kontrolle) und induzierten Zellen (AML1/ETO-positiv) unter Zugabe von je 200 μ l RPMI/ BSA 1% über 5 Minuten auf der Drehscheibe bei Raumtemperatur inkubiert, die nachfolgenden Schritte entsprachen denen der Selektionsrunde II.

2.2.11 Einzelklonbindungsversuche

Selektierte und sequenzierte Klone mit Peptidmotiven oder Einzelklonanreicherung, wurden in Einzelklonbindungsversuchen auf ihre Bindung an AML-Blasten im Vergleich zu nicht-malignen mononukleären Zellen des peripheren Blutes und/ oder Knochenmarks getestet.

Primäre Knochenmark- und periphere Blutproben von an AML erkrankten Patienten oder mononukleäre Knochenmarks- und periphere Blutzellen gesunder Spender wurden wie in Kapitel 2.2.1. beschrieben vorbereitet. Die beiden Zellpellets (AML und Kontrolle) wurden jeweils in einem 5×10^7 transduzierende Einheiten des interessierenden Phagen enthaltenden Volumen resuspendiert und über 5 Minuten auf der Drehplattform bei Raumtemperatur inkubiert. Wie in Kapitel 2.2.6.3 beschrieben wurden anschließend die zellgebundenen Phagen mittels differentieller Zentrifugation von den ungebundenen Phagen getrennt und die Anzahl der gebundenen Phagen-Partikel anhand tetrazyklinresistenter K91kan-Kolonien auf LB-tet-Agarplatten evaluiert. Alle Ausplattierungen wurden in dreifachen Ansätzen durchgeführt, Koloniezahlen zwischen 30 und 700 pro Platte als auswertbar definiert und der jeweilige Mittelwert aus den Versuchstripletts ermittelt. Der gleiche Vorgang wurde parallel mit dem peptidinsertlosen Phagen fd-tet, sowie den inserthaltigen Negativkontrollen NK1 oder NK 2 (s. Kapitel 2.2.4) durchgeführt. Beurteilt wurde die Bindung des selektierten Phagen an AML-Blasten im Vergleich zur Bindung an nicht-maligne mononukleäre Zellen, sowie die Bindungsfähigkeit des Phagen an AML-Blasten im Vergleich zur Bindungsfähigkeit der Phagen-Negativkontrollen an die AML-Blasten, welche als Maß für die unspezifische Bindung der Phagen an diese Zellen dienten.

Entsprechend wurde die Bindungsfähigkeit von auf primären Leukämiezellen und von auf AML1/ETO-positiven Zellen selektierten Klonen an Leukämiezelllinien in Kultur überprüft. Hierfür wurden jeweils 2×10^6 bis 5×10^6 Zellen der Zelllinien HL60, U937, KG1, K562, SKNO-1, Kasumi-1 mit den Phagenklonen (5×10^7 bis 5×10^8 TU) oder Phagen-Negativkontrollen inkubiert. Es erfolgte die Durchführung von Einzelklonbindungsversuchen wie oben

beschrieben. Parallel dazu erfolgten bedingungsgleiche Ansätze auf nicht-malignen mononukleären Zellen, hierfür standen periphere Blutzellen gesunder Spender zur Verfügung.

Desweiteren wurde die Bindungsfähigkeit von auf AML1/ETO-positiven Leukämiezellen selektierten Phagen an AML1/ETO-positive Zellen im Vergleich zu ihrer Bindung an AML1/ETO-negative Zellen auf dem unter 2.2.8. beschriebenen AML1/ETO-induzierbaren Zellsystem geprüft. Hierbei wurden für die Inkubation mit den jeweiligen Phagen jeweils 1×10^6 AML1 /ETO-positive Zellen (48 Stunden mit Ponasteron A induziert) und 1×10^6 AML1/ETO-negative Zellen (48 Stunden nur mit 100%igem Ethanol behandelt, hier wurde zur Kontrolle der unter 2.2.9 beschriebene Westernblot durchgeführt) des U937-Zellsystems mit jeweils 1×10^8 TU der Phagen unter den oben beschriebenen Bedingungen der Einzelklonbindungsversuche inkubiert. In einem Ansatz wurde parallel unter gleichen Versuchsbedingungen zusätzlich auf 1×10^6 nicht-transfizierten und somit AML1/ETO-negativen U937-Zellen inkubiert. Die restlichen sich in den Kulturflaschen befindlichen Zellen wurden ebenfalls aufgereinigt und auf Trockeneis schockgefroren. Diese Zellpellets wurden später für den AML1/ETO-Nachweis mittels Western-Blot verwandt. Die weiteren Schritte der Einzelklonbindungsversuche erfolgten wie für primäre Zellen beschrieben.

Parallel zu jedem Einzelklonbindungsversuch wurde eine Titerbestimmung der eingesetzten Phagenlösungen durchgeführt, um die Äquivalenz des Phagen-Inputs für alle Phagen, insbesondere der Negativkontrollphagen mit den interessierenden Phagen sicherzustellen.

2.2.11.1 Einzelklonbindungsversuche auf primären Zellen einer AML1/ETO-positiven Leukämie

Schließlich wurde die Bindungsfähigkeit der auf dem AML1/ETO-induzierbaren Zellsystem selektierten Phagen, sowie deren Negativkontrollen an die peripheren Blasten einer Patientin mit t(8;21)- und somit AML1/ETO-positiver Leukämie im Vergleich zur Bindungsfähigkeit an mononukleäre Zellen gesunder Spender (periphere Blut- wie Knochenmarkszellen) getestet. Bei der zum Zeitpunkt der Erstdiagnose 71-jährigen Patientin wurde im August 2003 eine akute myeloische Leukämie M2 (nach FAB-Klassifikation) mit einem initialen Blastenanteil von 35% im Knochenmark und 46% im peripheren Blut erstdiagnostiziert. Die Leukozytenanzahl lag zu diesem Zeitpunkt bei $5,8 \times 10^9/l$, die der Thrombozyten bei $59 \times 10^9/l$, der Hämoglobinwert lag bei 89g/l. Untersuchungen des Immunphenotyps zeigten eine starke Expression von CD34, CD 117, HLA-DR, Myeloperoxidase, CD 33, sowie eine schwache Expression von CD38, CD13 und CD19. Über zytogenetische Untersuchungen und RT-PCR wurde das Vorliegen der dem AML1/ETO-Fusionsprotein zugrunde liegenden Translokation t(8;21) bestätigt. Nach Aufreinigung der peripheren Blasten und der Kontrollzellen gesunder Spender mittels Lymphoprep wurde jede Phagenlösung (Input: 5×10^8 TU) mit 2×10^6 Zellen inkubiert.

Bedingungen und Abläufe des Einzelklonbindungsversuchs entsprachen den vorbeschriebenen (s. Kapitel 2.2.11).

Die Patientin erhielt einen ersten Zyklus einer Chemotherapie mit Decitabine ($45 \text{ mg/m}^2/\text{Tag}$ über drei Tage). Vierzig Tage danach wurde erneut eine periphere Blutprobe gewonnen, der Blastenanteil lag nun bei 8%. Hier wäre eine Gewinnung mittels Dichtegradientenzentrifugation nicht mehr möglich gewesen. Es erfolgte die Isolierung der CD34-postiven Blasten mittels Affinitätsaufreinigung über eine mit CD34-Antikörpern besetzte Säule (gemäß der Richtlinien der Hersteller. Milteny, Bergisch Glatbach, Deutschland). Parallel wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation periphere Blutproben zwei gesunder Spender, sowie eine Probe gesunder Knochenmarkszellen eines freiwilligen Spenders (Labormitarbeiter, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der AG Prof. Engelhardt) aufgereinigt. Alle vier Zellproben (je 1.5×10^6 Zellen) wurden mit 5×10^8 TU der interessierenden Phagenlösungen und ihrer Negativkontrollen inkubiert und unter den beschriebenen Bedingungen der Einzelklonbindungsversuche bearbeitet.

3 Ergebnisse

3.1 Selektion und Identifizierung leukämiezellbindender Peptidliganden

3.1.1 Selektion von Peptidliganden aus einer zyklischen Phagen-Peptidbank (CX₇C) auf primären myeloischen Leukämiezellen ex vivo

Zur Selektion eines möglichst auf allen AML-Zellen vorhandenen, in nicht-malignen Zellen möglichst nicht exprimierten Markers wurde bewusst ein heterogener Ansatz mit Negativselektion der zyklischen Phagen-Peptidbank CX₇C auf gesunden mononukleären Blut- oder Knochenmarkzellen und anschließender Positivselektion auf primären leukämischen AML-Blasten gewählt. Systematisch wurden für jede Selektionsrunde die Parameter der Selektionsstringenz variiert, bis eine erfolgreiche Anreicherung über drei Selektionsrunden beobachtet und reproduziert werden konnte (Abb.3.1). Hierfür wurden Stringenz der Negativselektion, Inkubationszeiten, Phagen-Input und Zellzahl in Negativ- und Positivselektion systematisch verändert (Daten nicht gezeigt). Unter den in Kapitel 2.2.6. beschriebenen optimierten Versuchsbedingungen sowie leichten Modifikationen, konnte ein zufriedenstellendes Selektionsergebnis erzielt werden. Maß für die Anreicherung von Phagen auf den Ziel-Zellen war das ansteigende Phagen Output/Input-Verhältnis über die Selektionsrunden bei erfolgreicher Anreicherung. Parallel zu jeder Selektionsrunde wurde der Titer der benutzten Phagenlösung bestimmt. Somit konnte für jede Selektionsrunde der genaue Phagen-Input berechnet werden. Exemplarisch zeigte sich unter den etablierten Selektionsbedingungen eine Erhöhung des Output/Input-Verhältnisses von Selektionsrundel bis zu Selektionsrunde III um das 100-fache (Abb. 3.1.)

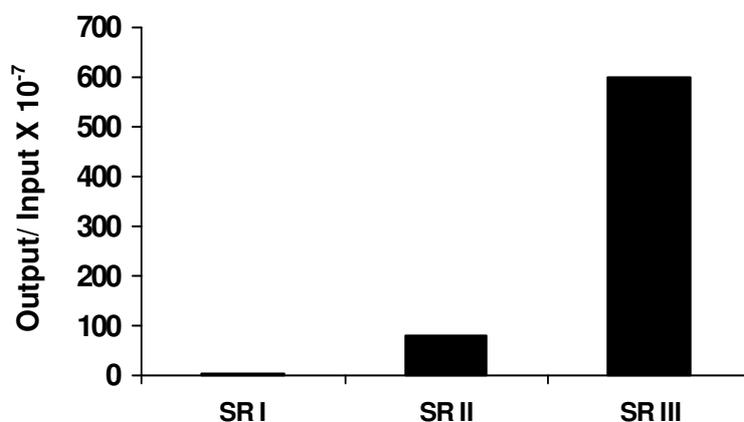


Abbildung 3.1.
Phagenanreicherung über einzelne Selektionsrunden (SR):

Aus einer CX₇C-Phagen-Peptidbank wurden unter optimierten Selektionsbedingungen Phagen auf primären AML-Blasten selektiert, in jeder SR des Selektionsansatzes Phagen-In- und Output bestimmt und ins Verhältnis gesetzt. Bei erfolgreicher Phagenanreicherung steigt dieses Verhältnis von SR I bis SR III - hier um das 100fache-an.

Bestimmung der Spezifität:

Parallel zur Inkubation der Positivselektion erfolgte zum Bindungsvergleich die Inkubation auf mononukleären Zellen gesunder Spender. Nach jeder Selektionsrunde wurden, wie in Kapitel 2.2.6.2 beschrieben, Bakterien-Phagen-Aliqouts auf LB-tet-Agarplatten in jeweils dreifachem Ansatz ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Da nur Bakterien wachsen konnten, die durch die Klonierung des Phagengenoms eine Tetrazyklinresistenz entwickelt hatten, konnte durch Auszählen der Kolonien die Anzahl der an die jeweiligen Zellen bindenden Phagen unter Berücksichtigung der Verdünnungsschritte ermittelt werden (Phagen-Output). Vergleicht man innerhalb einer Selektionsrunde die Anzahl der selektierten und an leukämische Blasten bindenden Klone mit der Anzahl der an nicht-maligne mononukleäre Zellen bindenden Klone, so erhält man eine Aussage über die Spezifität der angereicherten Phagen. Exemplarisch konnte unter den etablierten Selektionsbedingungen eines Selektionsansatzes der Anteil der an nicht-maligne mononukleäre Zellen bindenden Phagen von 33% nach der ersten Selektionsrunde auf 10% nach Selektionsrunde IV gesenkt werden (Abb.3.2). Hierbei wurde die Bindung der selektierten Phagen an leukämische Blasten nach einer Selektionsrunde jeweils als 100% definiert und die parallel durchgeführte Bindung der selektierten Phagen auf gesunden mononukleären Zellen darauf bezogen.

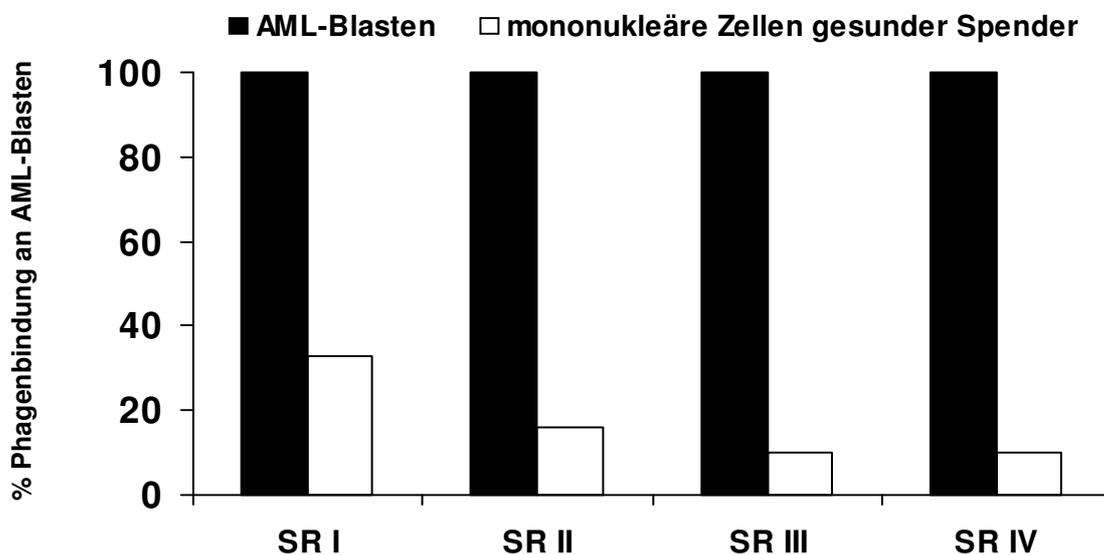


Abbildung 3.2.

Phagenanreicherung in einzelnen Selektionsrunden (SR) eines Selektionsansatzes:

Nach jeder SR wurden Bakterien-Phagen-Aliqouts der an AML- und mononukleäre Zellen gesunder Spender bindenden, angereicherten Phagen ausplattiert. Durch Klonierung des Phagengenoms tetrazyklinresistente Kolonien wurden auf LB-tet-Agarplatten ausgezählt, die Bindung der selektierten Phagen an leukämische Blasten nach einer SR jeweils als 100% definiert und die parallel durchgeführte Bindung der selektierten Phagen auf gesunden mononukleären Zellen darauf bezogen.

3.1.2 Sequenzierung von auf primären Leukämiezellen selektierten Phagen

Die Identifizierung der selektierten Phagen erfolgte mittels DNA-Sequenzierung wie in Kapitel 2.2.7 beschrieben. In verschiedenen Selektionsansätzen hatten sich in einer dritten und vierten Selektionsrunde Phagen angereichert, deren Bindung an Leukämiezellen sich in Spezifitätstestungen stärker zeigte als ihre Bindung an nicht-maligne mononukleäre Zellen. Aus diesen Anreicherungen wurden Bakterienklone zufällig gepickt. Jeder dieser Bakterienklone enthält durch die vorangegangenen Inkubationen im Rahmen der bakteriellen Amplifikation das Genom genau eines Phagen mit der genetischen Information für die Peptidsequenz, welche auf Grund ihrer Bindungsfähigkeit an die Ziel-Zellen selektiert wurde. Die Plasmid-DNA dieser Klone wurde bakteriell amplifiziert, aufgereinigt, die uns interessierende randomisierte Oligonukleotidsequenz durch Polymerasekettenreaktion amplifiziert und sequenziert. Trotz mehrfach durchgeführter Sequenzierung konnten nicht alle Peptide eindeutig identifiziert werden, die Klone mit nicht eindeutig bestimmbarer Aminosäuresequenz wurden verworfen.

Trotz der Unterschiede in der Bindung an Leukämiezellen und nicht-maligne Zellen zeigten sich in der Sequenzierung kaum mehrfach vorkommende Sequenzen. Bei den Klonen aus der Selektionsrunde III (Tabelle 3.1) fanden sich mit RII-05, RIII-24 und RIII-07, RIII-12 lediglich zwei Duplikate. Weitere Sequenzübereinstimmungen im Sinne von Peptidmotiven fanden sich hier nicht.

Von den aus Selektionsrunde IV gepickten Klonen konnten 45 eindeutig identifiziert werden (Tabelle 3.2). Auch hier fanden sich mit RIV-08, RIV-24 und RIV-35, RIV-36 je zwei Phagenklone mit jeweils derselben Aminosäuresequenz. Ferner konnten mit CYG[L] in den Klonen RIV-08, RIV-23 und RIV -24, sowie mit CYRL in den Klonen RIV-33, RIV-35 und RIV-36 andeutungsweise Sequenzmotive ausgemacht werden. Weiter fanden sich das interessante Motiv CAL...GGC in den Klonen RIV-16 und RIV-21, sowie die Sequenzwiederholungen CVP in Klon RIV-42 und RIV-06, und CLA in den Klonen RIV-46 und RIV-26. Eine weitere Sequenzübereinstimmung zeigte sich in RGDY in den Klonen RIV-20 und RIV-26 (Tabelle 3.2).

3.1.3 Einzelklonbindungsversuche: Peptidvermittelte Bindung des selektierten Klons RIV-36 an myeloische Leukämiezellen

Der aus einer zyklischen Phagen-Peptidbank (CX₇C) auf primären Leukämiezellen selektierte und identifizierte Phagenklon RIV-36 wurde in Einzelklonbindungsversuchen auf seine peptidvermittelte Bindung an leukämische Zellen im Vergleich zu seiner Bindung an nicht-maligne, mononukleäre Zellen gesunder Spender überprüft. Hierfür erfolgte die Inkubation auf primären AML-Blasten aus peripherem Blut oder Knochenmark und auf AML-Zelllinien jeweils im Vergleich zur Peptidbindung an nicht-maligne, mononukleäre Zellen des

Tabelle 3.1

Sequenzen von AML-Blasten-bindenden Peptiden, welche aus einer CX₇C-Phagen-Peptidbank nach einer dritten Selektionsrunde angereichert worden waren. In RIII-07 und RIII-12, sowie in RIII-05 und RIII-24 fanden sich identische Sequenzen.

Phagenklon	Sequenz	Phagenklon	Sequenz	Phagenklon	Sequenz
RIII-01	CNWVSVSLC	RIII-09	CLLGDTHIC	RIII-16	CRVVGRFGC
RIII-02	CDRRSPKIC	RIII-10	CKLFHSGRC	RIII-17	CRADSGWSC
RIII-03	CDMSTPGRC	RIII-11	CGERGLRGC	RIII-19	CFVWLVEGC
RIII-04	CRDRHHRGC	RIII-12	CTHAARDSC	RIII-20	CGPARGGAC
RIII-05	CGWHVGAGC	RIII-13	CGEPSVWPC	RIII-21	CHPSVRGNC
RIII-07	CTHAARDSC	RIII-14	CESRAEYAC	RIII-22	CASVHLLPC
RIII-08	CSDSLMREC	RIII-15	CSLFLNAPC	RIII-24	CGWHVGAGC

Tabelle. 3.2

Sequenzen von AML-Blasten bindenden Peptiden, welche aus einer CX₇C-Phagen-Peptidbank nach einer vierten Selektionsrunde angereichert worden waren. In RIV-08 und RIV-24, sowie in RIV-35 und RIV-36 fanden sich identische Sequenzen.

Phagenklon	Sequenz	Phagenklon	Sequenz	Phagenklon	Sequenz
RIV-01	CNSTPVAFC	RIV-16	CALRPLGGC	RIV-33	CYRLSGDFC
RIV-02	CIPSM LASC	RIV-17	CSAPGTSIC	RIV-34	CRVPARALC
RIV-03	CQVGESFGC	RIV-18	CSTQVYASC	RIV-35	CYRLDAVVC
RIV-04	CDDPLVFYC	RIV-19	CDVYRFRAC	RIV-36	CYRLDAVVC
RIV-05	CNNGSHRLC	RIV-20	CVSRGDYPC	RIV-37	CTRRSVGGC
RIV-06	CVPSPDLVC	RIV-21	CALFTGGGC	RIV-38	CWPAGLYGC
RIV-07	CILYPGASC	RIV-22	CLDVLMNEC	RIV-39	CGHRYVAC
RIV-08	CYGLFGERC	RIV-23	CYGFGRHC	RIV-40	CNMLWNGVC
RIV-09	CAGGSDSDC	RIV-24	CYGLFGERC	RIV-41	CRGEFSGRC
RIV-10	CDVMGCVDC	RIV-26	CLARGDYDC	RIV-42	CVPGNSWRC
RIV-11	CLIPRSLGC	RIV-28	CQERNRGLC	RIV-43	CRVRYFTTC
RIV-12	CYDSSALSC	RIV-29	CSTIDAGEC	RIV-44	CDFEPFAGC
RIV-13	CQTAAGLAC	RIV-30	CDWFWPDTTC	RIV-45	CSVGWWLPC
RIV-14	CMIERGGVC	RIV-31	CSGPSGRFC	RIV-46	CLAHGVGVC
RIV-15	CLRVLSLTC	RIV-32	CTDVDGLWC	RIV-47	CPPMEPSPC

des Blutes oder Knochenmarks gesunder Spender. Als Kontrolle diente der insertlose Phage fd-tet oder ein zufällig aus der unselektierten Peptidbank gewählter Phagen-Klon mit Peptidinsert, (NK2), zur Evaluierung der unspezifischen Bindung von Phagen an die Zellen. Die Zellbindung anderer Phagen wurde auf diese Negativkontrollen bezogen.

3.1.3.1 Einzelklonbindungsversuche von RIV-36 auf primären Leukämiezellen und mononukleären Zellen gesunder Spender

Zunächst wurde in Einzelklonbindungsversuchen das Bindungsverhalten des Klons RIV-36 auf primären leukämischen Blasten untersucht, weitestgehend unabhängig von ihren morphologischen und/oder zytogenetischen Unterschieden. Durch die erlaubte und gewünschte Heterogenität dieses Ansatzes konnte das Oberflächenmarkerprofil der Zellen in den Einzelklonbindungsversuchen von denen, auf welchen der Klon selektiert worden war, theoretisch deutlich differieren. Postulierte man eine selektive Bindung an einen für alle AML-Blasten vorhandenen Marker, sollte dennoch eine erhöhte Bindung an AML-Blasten vorliegen, auf denen nicht selektiert wurde.

Es zeigte sich reproduzierbar eine deutlich erhöhte Bindung des Klons RIV-36 an unterschiedliche leukämischen Blasten des Knochenmarks verschiedener AML-Proben im Vergleich zur Bindung an mononukleäre Knochenmarkzellen ebenfalls unterschiedlicher gesunder Spender (Abb. 3.3.a-e). Der Vergleich des Bindungsniveaus an die AML-Zellen zur Phagen-Negativkontrolle ergab eine bis zu 100-fach höhere Bindung des Phagen RIV-36 (Abb. 3.3.a). Hier wurden die leukämischen Blasten von dem Klon RIV-36 3,3-fach stärker gebunden als die mononukleären Knochenmarkzellen des gesunden Spenders. Häufig lag das Gesamtbindungs-niveau auch niedriger. So wurde RIV-36 in weiteren Einzelklonbindungsversuchen sechsfach (Abb. 3.3.c), zehnfach (Abb. 3.3.d), bzw. 15,8-fach (Abb. 3.3.b) stärker an AML-Knochenmark-Blasten gebunden als die insertlose Negativkontrolle fd-tet und sechsfach, dreifach, bzw. 1,5-fach stärker an AML-Blasten als an die mononukleären Zellen eines gesunden Knochenmarkspenders. In einem weiteren Einzelklonbindungsversuch lagen sowohl periphere leukämische Blasten als auch Knochenmarkzellen eines an AML erkrankten Patienten vor. Vergleichend wurden RIV-36 sowie die Negativkontrollphagen fd-tet und NK2 auf diesen Zellen, sowie peripheren mononukleären Zellen und den Knochenmarkzellen einer gesunden Spenderin inkubiert (Abb. 3.3.e). RIV-36 zeigte eine 52-fach stärkere Bindung an die peripheren Leukämiezellen und eine neunfach stärkere Bindung an die leukämischen Knochenmarkzellen als der insertlose Phage fd-tet. Die Bindung des inserthaltigen Negativkontrollphagen NK2 an die leukämischen Blasten des Knochenmarks lag unerwartet noch 4,2-fach über der fd-tet-Bindung, die Bindungsneigung von NK2 zu den übrigen Zellen fand sich jedoch wie erwartet im Bereich der fd-tet-Negativkontrolle. Die Bindung von RVI-36 an die peripheren leukämischen Blasten zeigte sich 104-mal so stark wie an periphere nicht leukämische mononukleäre Zelle der gesunden

Spenderin. Die Bindung des Klons an die leukämischen Knochenmarkszellen war hingegen nur dreimal so hoch wie die Bindung an die gesunden Knochenmarkszellen. Es fiel auf, dass der Phage RIV-36 an die leukämischen Blasten aus dem peripheren Blut 5,7-mal besser binden konnte als an die Leukämiezellen des Knochenmarks, während die Bindungsfähigkeit des Phagen an die peripheren nicht malignen Zellen nur ein sechstel derer an die gesunden Knochenmarkszellen betrug (Abb. 3.3.e).

3.1.3.2 Einzelklonbindungsversuche von RIV-36 auf Zelllinien in Kultur

Ist wirklich ein auf AML-Zellen präsentiertes Oberflächenmolekül, welches durch die Malignität bedingt exprimiert wird, für die erhöhte Bindungsfähigkeit des selektierten Phagen RIV-36 verantwortlich, so dürfte es hinsichtlich der Oberflächeninteraktion mit den selektierten Phagen unbedeutend sein, ob es sich um primäre Zellen oder AML-Zellen in Kultur handelt. Also wurde als nächstes das Bindungsverhalten des auf primären leukämischen Blasten selektierten Phagen RIV-36 im Vergleich zur Bindungsfähigkeit des Negativkontrollphagen fd-tet auf den Leukämiezelllinien Kasumi-1, SKNO-1, HL60, KG1 und K562, sowie zur Kontrolle auf mononukleären Zellen des peripheren Blutes oder des Knochenmarks gesunder Spender in Einzelklonbindungsversuchen getestet (Abb. 3.4.a-c).

In mehrfach durchgeführten Einzelklonbindungsversuchen fand sich ein Zelllinien-abhängiges Bindungsverhalten. RIV-36 zeigte reproduzierbar eine deutliche Bindung zu der Zelllinie K562, diese Zellen wurden bis zu 7,2-fach stärker von dem Klon gebunden als von dem insertlosen Negativkontrollphagen fdt-tet (Abb.3.4.a). Auch zur Zelllinie KG1 zeigte sich eine bis zu dreifach erhöhte Bindung des RIV-36 Phagen im Vergleich zur Bindung des Kontrollphagen (Abb. 3.4.a), die Bindung an HL60 zeigte sich hingegen nur unwesentlich über die des Negativkontrollphagen hinausgehend (Abb. 3.4.c), die Bindung des Phagen RIV-36 an die AML1/ETO-positiven Zelllinien Kasumi-1 und SKNO-1 bewegte sich im Bereich der Negativkontrolle. Auch die Bindung des RIV-36 an periphere mononukleäre Zellen und Knochenmarkszellen gesunder Spender fand sich, wie erwartet, im Niveau der fd-tet-Kontrolle (Abb. 3.4.a-c). Somit glich das Bindungsverhalten des RIV-36 an die Zelllinien Kasumi-1 und SKNO-1 dem des Phagen an nicht-maligne Zellen gesunder Spender, das an HL60 übertraf dieses nur geringfügig, während die Bindung des Klons RIV-36 an K562 bis zu achtfach (Abb.3.4.a) und an KG1 bis zu 3,5-fach (Abb. 3.4.c) höher dargestellt werden konnte als die zu mononukleären Zellen gesunder Spender.

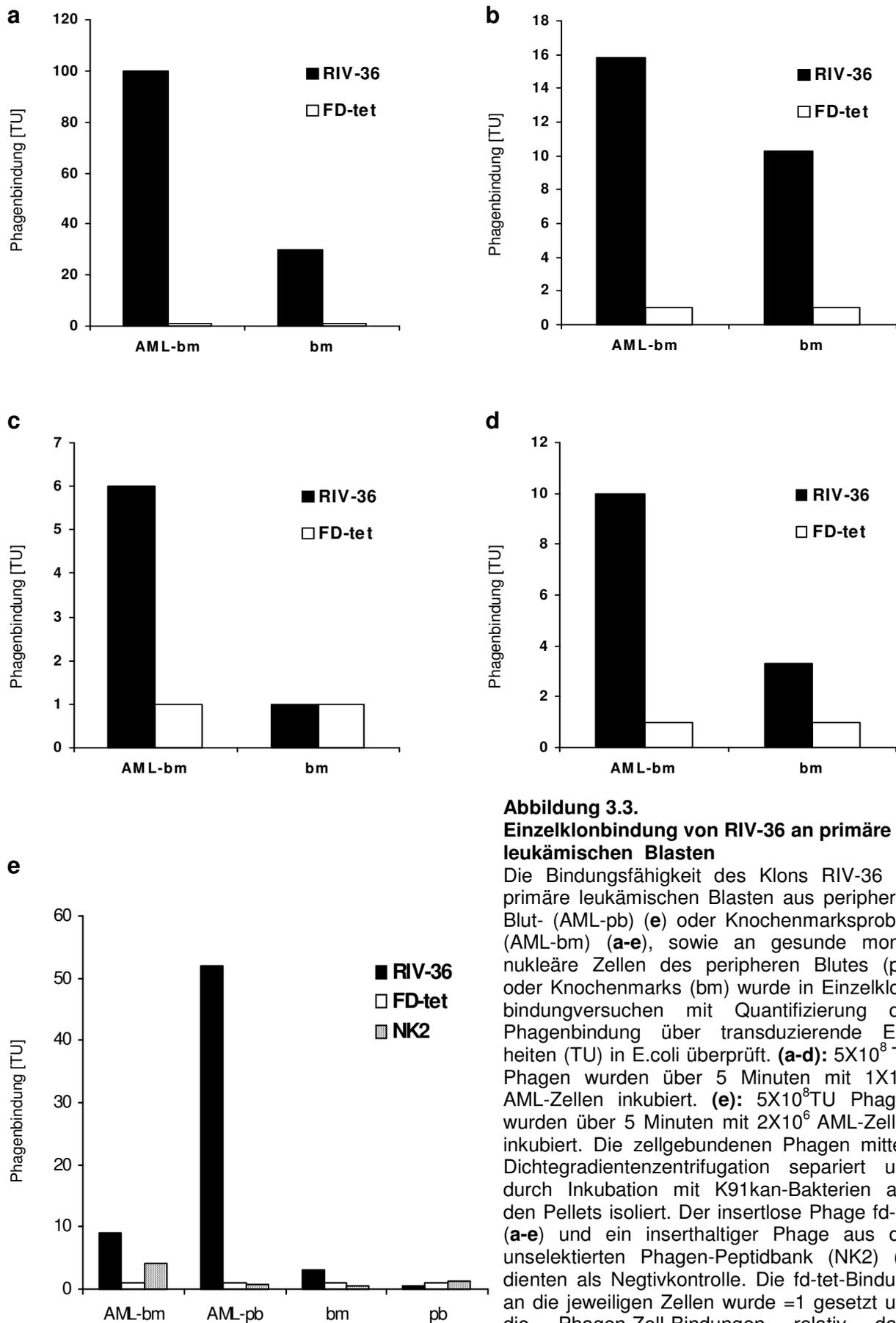


Abbildung 3.3.
Einzelklonbindung von RIV-36 an primäre leukämische Blasten

Die Bindungsfähigkeit des Klon RIV-36 an primäre leukämische Blasten aus peripheren Blut- (AML-pb) (e) oder Knochenmarksproben (AML-bm) (a-e), sowie an gesunde mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (pb) oder Knochenmarks (bm) wurde in Einzelklonbindungsversuchen mit Quantifizierung der Phagenbindung über transduzierende Einheiten (TU) in *E.coli* überprüft. (a-d): 5×10^8 TU Phagen wurden über 5 Minuten mit 1×10^6 AML-Zellen inkubiert. (e): 5×10^8 TU Phagen wurden über 5 Minuten mit 2×10^6 AML-Zellen inkubiert. Die zellgebundenen Phagen mittels Dichtegradientenzentrifugation separiert und durch Inkubation mit K91kan-Bakterien aus den Pellets isoliert. Der insertlose Phage fd-tet (a-e) und ein inserthaltiger Phage aus der unselektierten Phagen-Peptidbank (NK2) (e) dienen als Negativkontrolle. Die fd-tet-Bindung an die jeweiligen Zellen wurde =1 gesetzt und die Phagen-Zell-Bindungen relativ dazu dargestellt.

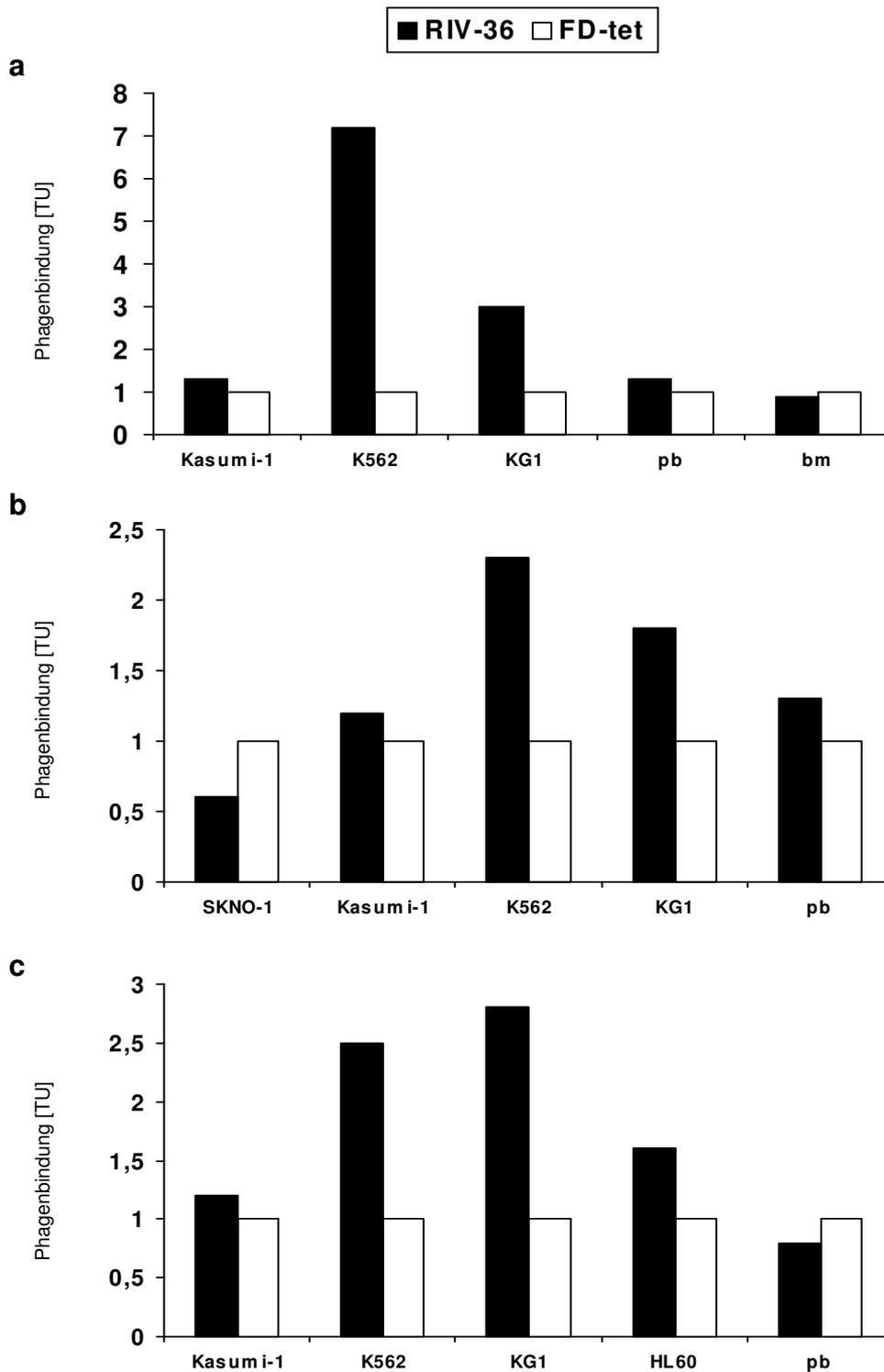


Abbildung 3.4:
Einzelklonbindung von RIV-36 auf Leukämie-Zelllinien:

Relatives Bindungsverhalten des auf primären Leukämiezellen selektierten Phagen RIV-36 an Leukämiezelllinien (Kasumi-1, SKNO-1, K562, KG1, HL60) und an mononukleäre Zellen gesunder Spender aus dem peripheren Blut (pb) oder Knochenmark (bm), bezogen auf die Bindungsfähigkeit des insertlosen Phagen fd-tet (=1). Quantifizierung der Phagenbindung erfolgte über transduzierende Einheiten (TU) in E.coli. **(a):** 5×10^8 TU Phagen wurden mit 2×10^6 Zielzellen, **(b):** 5×10^8 TU Phagen wurden mit 5×10^6 Zielzellen, **(c):** 5×10^7 TU Phagen wurden mit 2×10^6 Zielzellen über 5 Minuten inkubiert, die zellgebundenen Phagen mittels Dichtegradientenzentrifugation separiert und durch Inkubation mit K91kan-Bakterien aus den Pellets isoliert. Der insertlose Phage fd-tet diente als Negativkontrolle.

3.2 Selektion einer Phagen-Peptidbank auf AML1/ETO-exprimierenden U937-Zellen

3.2.1 Ponasteron A-induzierte AML1/ETO-Expression in einem stabil transfizierten U937-Zellklon (9/14/18)

Ein weiterer Ansatz fokussierte sich auf das Oberflächenmarkerprofil AML1/ETO-positiver Leukämien. Ziel war es, Peptidliganden zu isolieren, welche mit solchen Oberflächenmolekülen interagieren, die auf AML1/ETO-positiven Zellen exprimiert werden, nicht aber auf AML1/ETO-negativen Zellen - Rezeptoren also, die der Regulation durch AML1/ETO unterliegen. Hierfür benutzten wir das in Kapitel 1 und 2 ausführlich beschriebene Zellsystem AML1/ETO-transfizierter U937-Zellen, bei welchen durch Ponasteron A-Zugabe in Zellkultur die Expression von AML1/ETO induziert werden konnte. Nach 48-stündiger Induktion wurde die AML1/ETO-Expression mittels Western-Blot nachgewiesen. Als Positivkontrolle diente die konstitutiv AML1/ETO-exprimierende Zelllinie Kasumi-1. Eine deutliche AML1/ETO-Basisexpression der transfizierten Zellen im nicht-induzierten Zustand wurde nicht beobachtet, hingegen konnte die hochregulierte AML1-ETO-Expression nach 48-stündiger Induktion mit Ponasteron A im Western-Blot deutlich nachgewiesen werden (Abb.3.5)

3.2.2 Selektion von Peptid-Phagen auf einem AML 1/ETO- exprimierenden U937-Zellsystem

Zur Selektion von Peptid-Phagen, die an AML1/ETO-positive Zellen binden, wurden vier aufeinander folgende Selektionsrunden (SR) mit steigender Stringenz durchgeführt, wie in Kapitel 2.2.11 beschrieben. Hierbei wurde die Phagen-Peptidbank CX₇C auf AML1/ETO-transfizierten aber nicht induzierten humanen U937-Zellen in der Negativselektion vorgereinigt und in der sich anschließenden Positivselektion auf induzierten, somit

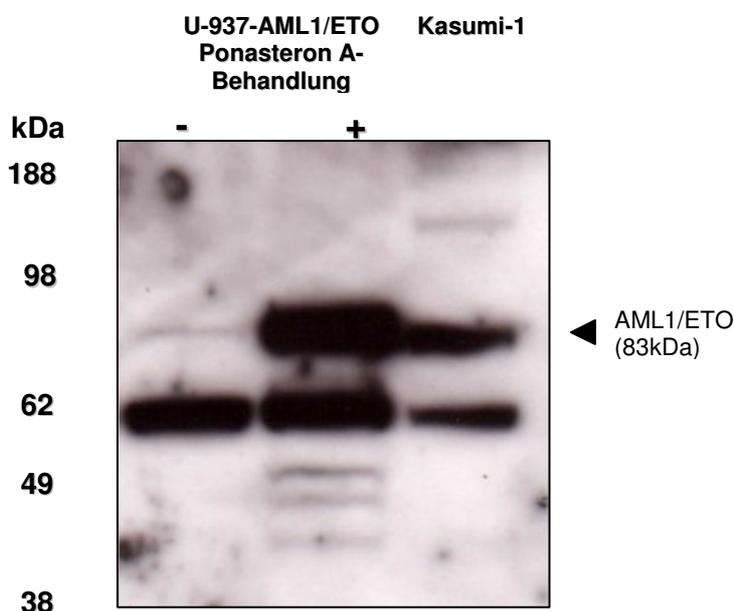


Abbildung 3.5:
Western-Blot zum Nachweis von Ponasteron A-induzierter AML1/ETO-Expression in einem stabil transfizierten U937-Zellklon:

Der stabil mit einem Ecdyson induzierbaren AML1/ETO-Expressionssystem transfizierte U937-Klon 9/14/18 (Fliegau et al., 2004) wurde 48 Stunden mit einer 1mM Ponasteron A-Lösung (+), bzw. äquivalent mit Ethanol als Kontrolle (-) behandelt. Die Zellen wurden lysiert, die AML1/ETO-Expression mit polyklonalem anti-ETO-Antikörper im Western-Blot dargestellt; im transfizierten, nicht-induzierten U937-Klon (-) war nach Ponasteron A-Gabe nur Basisexpression sichtbar. Konstitutiv AML1/ETO-exprimierende Kasumi-1-Zellen dienten als Positivkontrolle.

AML1/ETO-positiven U937-Zellen inkubiert. Parallel zur Positivselektion erfolgte zum Bindungsvergleich die Inkubation auf nicht-AML1/ETO-exprimierenden U937-Zellen. Nach jeder Selektionsrunde wurden zur Bestimmung der Effizienz einer Selektion über mehrere Selektionsrunden, sowie zur Bestimmung der Spezifität innerhalb der einzelnen Selektionsrunden Bakterien-Phagen-Aliquots in jeweils dreifachem Ansatz über Nacht kultiviert. Durch Auszählen der Kolonien konnte die Anzahl der an die jeweiligen Zellen bindenden Phagen ermittelt werden (Phagen-Output).

Nach der initialen Selektionsrunde fand sich mit 2×10^{-4} ein bei den Selektionsbesonderheiten des Systems (hoher Phagen-Input, extrem niedrige Selektionsstringenz zu Beginn) erwartungsgemäß ein außerordentlich hohes Output/Input-Verhältnis. Bei deutlich erhöhter Stringenz fiel das Output / Input-Verhältnis in SR II zunächst auf $2,7 \times 10^{-5}$ ab (Abb. 3.6), bevor sie in der dritten Selektionsrunde um das 2,96-fache erwartungsgemäß anstieg. Nach der vierten Selektionsrunde wurde ein Abfall auf $1,8 \times 10^{-5}$ verzeichnet (Abb. 3.6), welcher retrospektiv durch einen etwas zu hohen Input erklärt werden konnte. Der parallel bestimmte Titer zeigte eine auf Grund eines ungewöhnlich stark divergierenden Bakterienwachstums eine andere Größenordnung an TUs, somit einen höheren Phagen-Input als angenommen. Eine Anreicherung konnte dennoch in der Kolonienzahldifferenz zwischen der Bindung an AML1/ETO-positive und AML1/ETO-negative Zellen indirekt (Abb. 3.6) und durch nachfolgende Sequenzierung (s. Kapitel 3.2.3) nachgewiesen werden.

Es zeigte sich über die Selektionsrunden ebenfalls eine dezente, aber zunehmende Bindung der auf AML1/ETO-positiven Zellen selektierten Phagen an AML1/ETO-negative, aber transfizierte U937-Zellen (Output/Input Verhältnis-Anstieg von Runde II $1,8 \times 10^{-5}$ auf 6×10^{-5} in SR III). Die Differenz der Phagenanreicherung zwischen den auf AML1/ETO-positiven Zellen gebundenen und den auf AML1/ETO-negativ gebundenen Zellen nahm jedoch bis zur SR IV zu, so dass nach der letzten Selektionsrunde eine 2,25-fach höhere Anreicherung auf mit Ponasteron A-behandelten Zellen auszumachen war, ein Maß für die Spezifität der Selektion. Diese Phagenanreicherung konnte durch nachgewiesene Klonanreicherung in der Sequenzierung verifiziert werden (s. Tabelle 3.3).

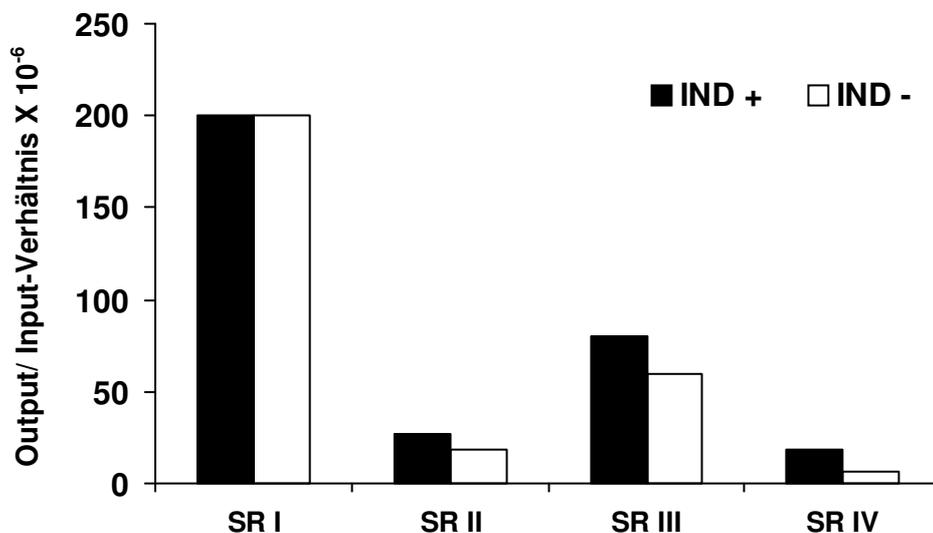


Abbildung 3.6

Phagenanreicherung aus einer CX₇C Peptidbank auf AML1/ETO-exprimierenden U937-Zellen über mehrere Selektionsrunden:

Aus einer CX₇C wurden über vier Selektionsrunden (SRI-IV) Phagen auf AML1/ETO-exprimierenden U937-Zellen selektiert. In jeder Selektionsrunde wurden Phagen-Input und Phagen-Output bestimmt und ins Verhältnis gesetzt.

Das Output/Input-Verhältnis der selektierten Phagen sank nach der ersten Selektionsrunde zunächst ab, stieg dann bis zur dritten Selektionsrunde (SR III) dezent an.

Die Differenz im Bindungsverhalten der in jeder Selektionsrunde selektierten Phagen zu AML1/ETO-positiven (IND+) und AML1/ETO-negativen Zellen (IND-) nimmt von der ersten bis zur vierten Selektionsrunde zu und gibt damit einen Hinweis auf zellspezifische Phagenanreicherung.

3.2.3 Sequenzierung der auf AML1/ETO-exprimierenden U937-Zellen selektierten Peptid-Phagen

Von den auf AML1/ETO-exprimierenden Zellen eluierten, in Selektionsrunde IV amplifizierten Phagen in Bakterienkolonien wurden 50 Klone zufällig gepickt. Jeder dieser Bakterienklone enthielt durch die vorangegangenen Inkubationen im Rahmen der bakteriellen Amplifikation das Genom genau eines Phagen mit einer entsprechenden Peptidsequenz, welche auf Grund ihrer Bindungsfähigkeit selektiert wurde. Diese Plasmid-DNA wurde bakteriell amplifiziert, aufgereinigt, die uns interessierende randomisierte Peptidsequenz durch Polymerasekettenreaktion amplifiziert und sequenziert. Dabei ließen sich zwei Peptide identifizieren, welche mit vereinzelt Abweichungen neunmal (Klon AIE-17: CLSGWGFTC), respektive siebenmal (Klon AEI-15:CAQGLFRLC) unter den 50 Klonen auftraten. Hierbei glichen acht Peptide in ihrer Sequenz der des Klon AIE-17 bis auf die drittletzte Aminosäure eindeutig. Diese Aminosäure war entweder Leucin oder Phenylalanin. Die dem Klon AIE-15 gleichenden Peptide ließen sich auch bei mehrfacher Sequenzierung nicht alle eindeutig

identifizieren. Nicht eindeutig zuzuordnende Aminosäuren wurden mit X bezeichnet. Von den sieben Klonen waren vier Peptide eindeutig identisch, zwei weitere unterschieden sich in einer Aminosäure; an sechster Position lag hier anstelle des Phenylalanins einmal Leucin, einmal Valin vor. Ein weiterer Klon (AIE-9) schien mit der Sequenz des Klones AIE-15 ebenfalls identisch zu sein. Leider ließen sich hier auch bei mehrfacher Sequenzierung die Aminosäuren an Position zwei und drei nicht eindeutig bestimmen. Eine mögliche Motivübereinstimmung fand sich ferner zwischen den Peptiden des Klons AIE-15 und dem Klon AIE-33 (CAQGL), dessen Restsequenz (VPC) wiederum mit denen der Klone AIE-31 (VPC) und AIE-12 (VPC) übereinstimmte. Eine weitere Motivübereinstimmung fand sich zwischen Klon AIE-31 und AIE-12 in dem Anfangs-Motiv CGL, welches sie zudem mit Klon AIE-40 teilten (s. Tabelle 3.3).

Der Fokus der weiteren Charakterisierung der selektierten Peptide lag nun auf den Klonen AEI-15(CAQGLFRLC), AEI-17 (CLSGWGFTC) und AEI-31 (CGLGLVNRC) auf Grund der Eindeutigkeit der Sequenz, ihres gehäuftten Auftretens und ihrer Motive in mehreren anderen selektierten Phagen aus unterschiedlichen Selektionen.

Tabelle 3.3

Sequenzen von AML1/EO-positive Zellen bindenden Peptiden, welche aus einer CX₇C-Phagen-Peptidbank nach einer vierten Selektionsrunde angereichert worden waren.

Auch in mehrfachen Sequenzierungen nicht eindeutig zuzuordnende Aminosäuren wurden mit X gekennzeichnet. Acht Peptide glichen in ihrer Sequenz der des Klon AIE-17 bis auf die drittletzte Aminosäure eindeutig. Konnte zwischen Leucin (L) oder Phenylalanin (F) nicht eindeutig differenziert werden, so wurde die Aminosäure mit B bezeichnet. Der Sequenz des Klones AIE-15 (rot), sowie der des Klones AIE-17 (blau) konnten kongruente Sequenzen oder Motivübereinstimmungen anderer von verschiedenen Aliquotplatten gepickten Klonen zugeordnet werden. In der Sequenz des Klon AIE-31 fanden sich mögliche Motivübereinstimmungen (grün) zu mehreren Klonen, wobei mindestens drei aufeinander folgende Peptide als Bindungsmotive für die Vermittlung spezifischer Peptidbindungen ausreichen.

Phagenklon	Sequenz	Phagenklon	Sequenz	Phagenklon	Sequenz
AIE-15	CAQGLFRLC	AIE-17	CLSGWG FTC	AIE-31	CGLHVXVPC
AIE-05	CAQGLFGLC	AIE-04	CLSGWG FTC	AIE-12	CGLSVXVPC
AIE-46	CAQGLFGLC	AIE-01	CLSGWG BTC	AIE-40	CGLGLVNRC
AIE-50	CAQGLFGLC	AIE-02	CLSGWG BTC		
AIE-49	CAQGLVGLC	AIE-07	CLSGWG BTC		
AIE-18	CAQGLFGLC	AIE-08	CLSGWG BTC		
AIE-09	CAXXLFGLC	AIE-16	CLSGWG LTC		
AIE-33	CAXGLVPC	AIE-32	CLSGWG BTC		
		AIE-44	CLSGWG LTC		

3.2.4 Einzelklonbindungsversuche: Peptidvermittelte Bindung der Klone AIE-15, AIE-17 und AIE-31 an AML1/ETO-positive Zellen

Die auf dem beschriebenen U937-Zellsystem mit induzierbarer AML1/ETO-Expression selektierten Phagen AIE-15, AIE-17 und AIE-31 wurden in Einzelklonbindungsversuche auf ihre peptidvermittelte Bindung an AML1/ETO-positive Zellen im Vergleich zu ihrer Bindung an AML1/ETO-negative Zellen überprüft. Hierfür erfolgte die jeweilige Inkubation auf AML1/ETO-exprimierenden Zellen im AML1/ETO-induzierbaren Zellsystem, auf AML1/ETO konstitutiv exprimierenden Zelllinien und schließlich auf den primär gewonnenen Blasten einer an einer AML1/ETO-positiven Leukämie erkrankten Patientin jeweils im Vergleich zur Peptidbindung an AML1/ETO-negative Zellen. Als Negativkontrolle der Phagenbindung wurde der insertlose Phage fd-tet und eine inserthaltige Phagen-Negativkontrolle NK1 und/oder NK2 (s. Kapitel 2.2.4) zur Evaluierung der nicht peptidspezifischen Bindung verwendet. Die Bindungsfähigkeit der Negativkontrollen diente, bei intern plausiblen Ergebnissen, als Indikator für die unspezifische Bindung der Phagen an die entsprechenden Zellen und wurde somit als Referenzbindung definiert und gleich „eins“ gesetzt, die entsprechende Zellbindung anderer Phagen auf diese Negativkontrollen bezogen.

3.2.4.1 Einzelklonbindungsversuche von AIE-15, AIE -17 und AIE-31 auf dem stabil transfizierten U937- Zellsystem mit induzierbarer AML1/ETO-Expression

Zunächst wurde in Einzelklonbindungsversuchen die Bindungsspezifität und –fähigkeit der drei interessantesten identifizierten Klone auf dem Zellmodell getestet, auf welchem diese auch selektiert worden waren. Die stabil AML1/ETO-transfizierten U937-Zellen wurden mittels Ponasteron A (Ind +), respektive Ethanol als Negativkontrolle (Ind -) behandelt, so dass die Hochregulierung der ektopischen AML1/ETO-Expression in den mit dem Hormon behandelten Zellen (Western-Blot-Nachweis analog 3.2.1) induziert wurde. Die drei interessierenden Phagen sowie die Negativkontrollphagen wurden anschließend auf den nun AML1/ETO-positiven und -negativen Zellen inkubiert.

Die Einzelklonbindungsversuche zeigten reproduzierbar eine stärkere Bindung der Klone AIE-15 und AIE-17 an die induzierten, AML1/ETO-exprimierenden Zellen als an die AML1/ETO-negativen U937-Zellen (Abb.3.7 a-d). Auch zeigte der Klon AEI-15 eine 95,5-fach höhere Bindung an die AML1/ETO-positiven Zellen als der inserthaltige Negativkontrollphage NK1 (Abb.3.7a). Diese Bindung von AIE-15 an AML1/ETO-positive U937-Zellen war 56-fach stärker als die an transfizierte, aber AML1/ETO-negative U937-Zellen und 73-fach stärker als die Bindung an nicht-transfizierte U937-Zellen ohne AML1/ETO-Baseline-Expression (Abb.3.7a). Auch der Klon AIE-17 zeigte hier eine 39-fach stärkere Bindung an die AML1/ETO-positiven Zellen als der Negativkontrollphage NK1 (Abb. 3.7a). Diese Bindung von AIE-17 an AML1/ETO-positive U937-Zellen war 33-fach stärker als die an transfizierte, aber AML1/ETO-negative U937-Zellen und 39-mal stärker als die an nicht transfizierte U937-

Zellen ohne AML1/ETO-Baseline-Expression, welche sich auf dem Niveau der Negativkontrolle bewegte (Abb.3.7a). In weiteren Einzelklonbindungsversuchen auf dem AML1/ETO-induzierbaren Zellsystem zeigte AIE-15 eine bis zu 31-fach höhere Bindung an U937-Zellen mit AML1/ETO-Expression als der Negativkontrollphage NK2 (Abb. 3.7b), respektive eine bis zu 23-fach höher Bindung an diese Zellen als der insertlose fd-tet Phage (Abb. 3.7c). Diese Bindung von AIE-15 an AML1/ETO-positive U937-Zellen war jeweils etwa 5-fach stärker als die an transfizierte, nicht-induzierte und somit AML1/ETO-negative U937-Zellen (Abb.3.7 b und c). Einmalig lag die Bindung des AIE-15 Klon im Bereich der fd-tet Bindung sowohl an AML1/ETO-positive wie auch an AML1/ETO-negative U937-Zellen, dennoch war auch hier eine minimal erhöhte Bindung an die induzierten Zellen (1,5-fach stärker) auszumachen (Abb.3.7d). AIE-17 zeigte in weiteren Einzelklonbindungsversuchen auf dem AML1/ETO-induzierbaren Zellsystem eine bis zu achtfach höhere Bindung an U937-Zellen mit AML1/ETO-Expression als der Negativkontrollphage NK2 (Abb.3.7b), respektive eine bis zu vierfach höher Bindung an diese Zellen als der insertlose fd-tet Phage (Abb.3.7d). Diese Bindung von AIE-17 an AML1/ETO-positive U937-Zellen war jedoch jeweils nur dezent stärker (1,3-fach) als die an transfizierte, nicht-induzierte und somit AML1/ETO-negative U937-Zellen (Abb.3.7b und d). Einmalig zeigte sich sogar eine höhere Bindung an nicht-induzierte U937-Zellen (Abb. 3.7c). Der Phage AIE-31 zeigte nie mehr als eine 1,8-fach höhere Bindung an AML1/ETO-positive Zellen (Abb. 3.7d); insgesamt bewegte sich die Bindung des Klon eher im Bereich der Phagen-Negativkontrollen (Abb. 3.7 b und d).

3.2.4.2 Einzelklonbindungsversuche von AIE-15, AIE 17, AIE-31 auf konstitutiv AML1/ETO-exprimierenden Zelllinien

Ist AML1/ETO wirklich verantwortlich für die Bindung der Phagen AIE-15, AIE-17 und AIE-31 an AML-Zellen, so dürfte es hinsichtlich der Oberflächeninteraktion unbedeutend sein, ob Zellen das Fusionsprotein konstitutiv oder induziert exprimieren. Also wurde als nächstes das Bindungsverhalten der auf dem AML1/ETO-induzierbaren Zellsystem selektierten Phagen AIE-15, AIE-17 und AIE-31 im Vergleich zur Bindung der Negativkontrollphagen auf AML1/ETO konstitutiv exprimierenden (Kasumi1, SKNO-1) und AML1/ETO nicht exprimierenden Zelllinien (HL60, KG1, K562, U937) in Einzelklonbindungsversuchen getestet.

Der Phage AEI-15 zeigte reproduzierbar eine deutlich erhöhte Bindungsfähigkeit an die konstitutiv AML1/ETO-exprimierenden Zelllinien Kasumi-1 und SKNO-1. An Kasumi-1-Zellen band der Phage bis zu 8,5-mal stärker als der insertlose Negativkontrollphage fd-tet, respektive bis 4,3-fach stärker als der inserthaltige Negativkontrollphage NK2 (Abb. 3.8a). Auch die Bindung an AML1/ETO-positive SKNO-1-Zellen übertraf das der Negativkontrolle um das 3,6-fache (Abb.3.8b). Hingegen lag das Bindungsniveau des Klon AIE-15 an AML1/ETO-negative HL60-Zellen im Bereich der Negativkontrollen (Abb.3.8a-c).

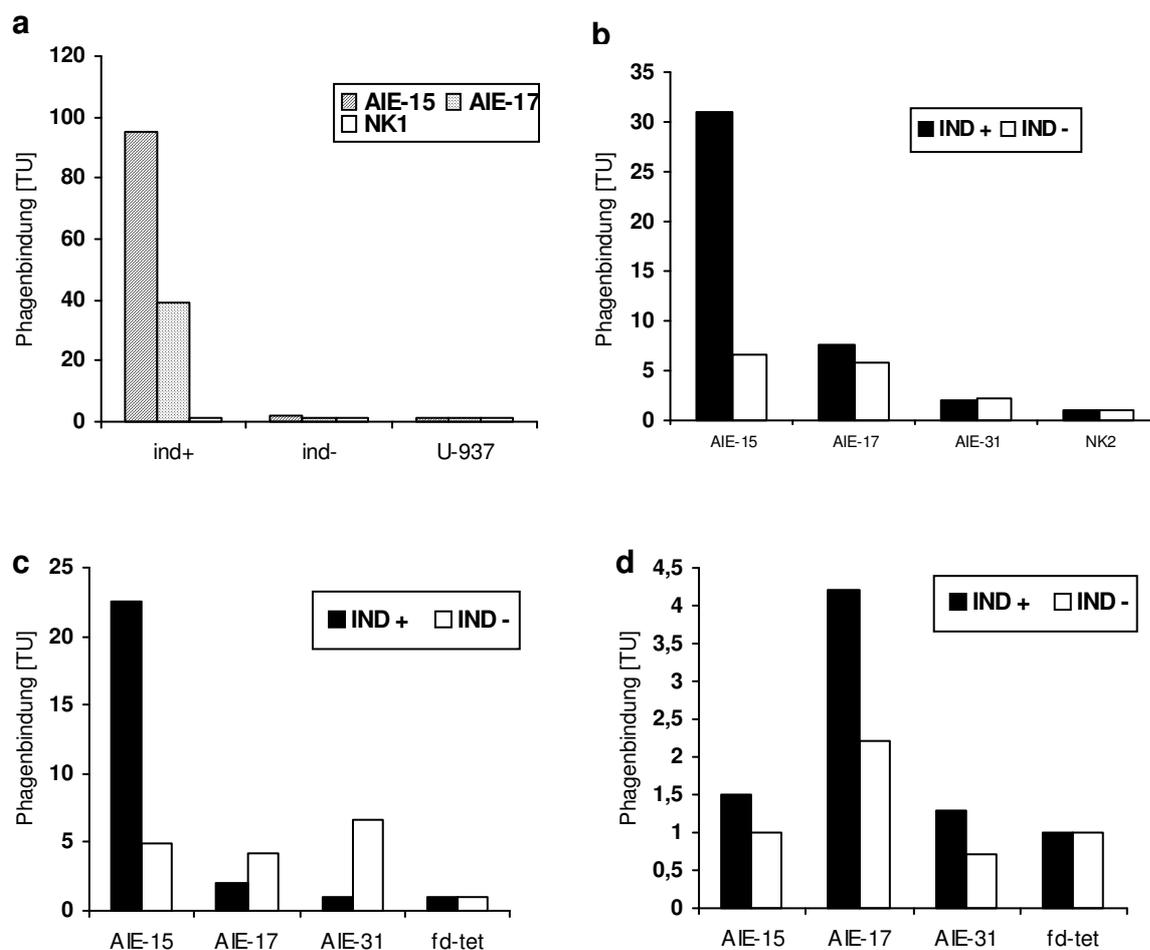


Abbildung 3.7

Einzelklonbindung von AIE-15, AIE-17 und AIE-31 auf einem stabil transfizierten U937-Zellsystem mit induzierbarer AML1/ETO-Expression:

Relatives Bindungsverhalten der Klone AIE-15, AIE-17 und AIE-31 an induzierte, AML1/ETO-exprimierende (Ind+) und an nur mit Ethanol behandelte, AML1/ETO-negative Zellen (Ind-), bezogen auf die Bindungsfähigkeit des insertlosen Negativkontrollphagen fd-tet (**c+d**) oder der inserthaltigen Negativkontrollphagen aus einer unselektierten CX₇C-Phagenpeptidbank NK1 (**a**) oder NK2 (**b**). Die Negativkontrollphagenbindung an die jeweiligen Zellen wurde hierbei gleich „eins“ gesetzt. Quantifizierung der Phagenbindung erfolgte über transduzierende Einheiten (TU) in *E.coli*. 5×10^8 TU Phagen wurden über 5 Minuten mit 2×10^6 Zielzellen inkubiert, die zellgebundenen Phagen mittels Dichtegradientenzentrifugation separiert und durch Inkubation mit K91kan-Bakterien aus den Pellets isoliert.

Im Gegensatz dazu zeigte der Klon AEI-15 allerdings auch an AML1/ETO-negative KG1-Zellen eine deutliche, die Negativkontrollen bis um das 3,8-fache übertreffende Bindung (Abb. 3.8a+b). Der selektierte Phage AEI-17 zeigte im Allgemeinen keine erhöhte Bindungsfähigkeit an die getesteten AMI1/ETO-negativen Zelllinien. Einmalig war die KG1-Bindung 2,9-fach so stark wie die der Negativkontrolle (Abb. 3.8c), ansonsten lag die Bindung des Phagen im Kontrollniveau. Die AML1/ETO konstitutiv exprimierenden Zelllinie Kasumi-1 wurde auch von diesem Phagen bis zu 4,5-mal stärker gebunden als von der

Negativkontrolle (Abb.3.8a). AEI -31 zeigte vor allem eine Affinität zu KG 1, sowie eine leicht erhöhte Affinität zu Kasumi-1 (Abb. 3.8b+c).

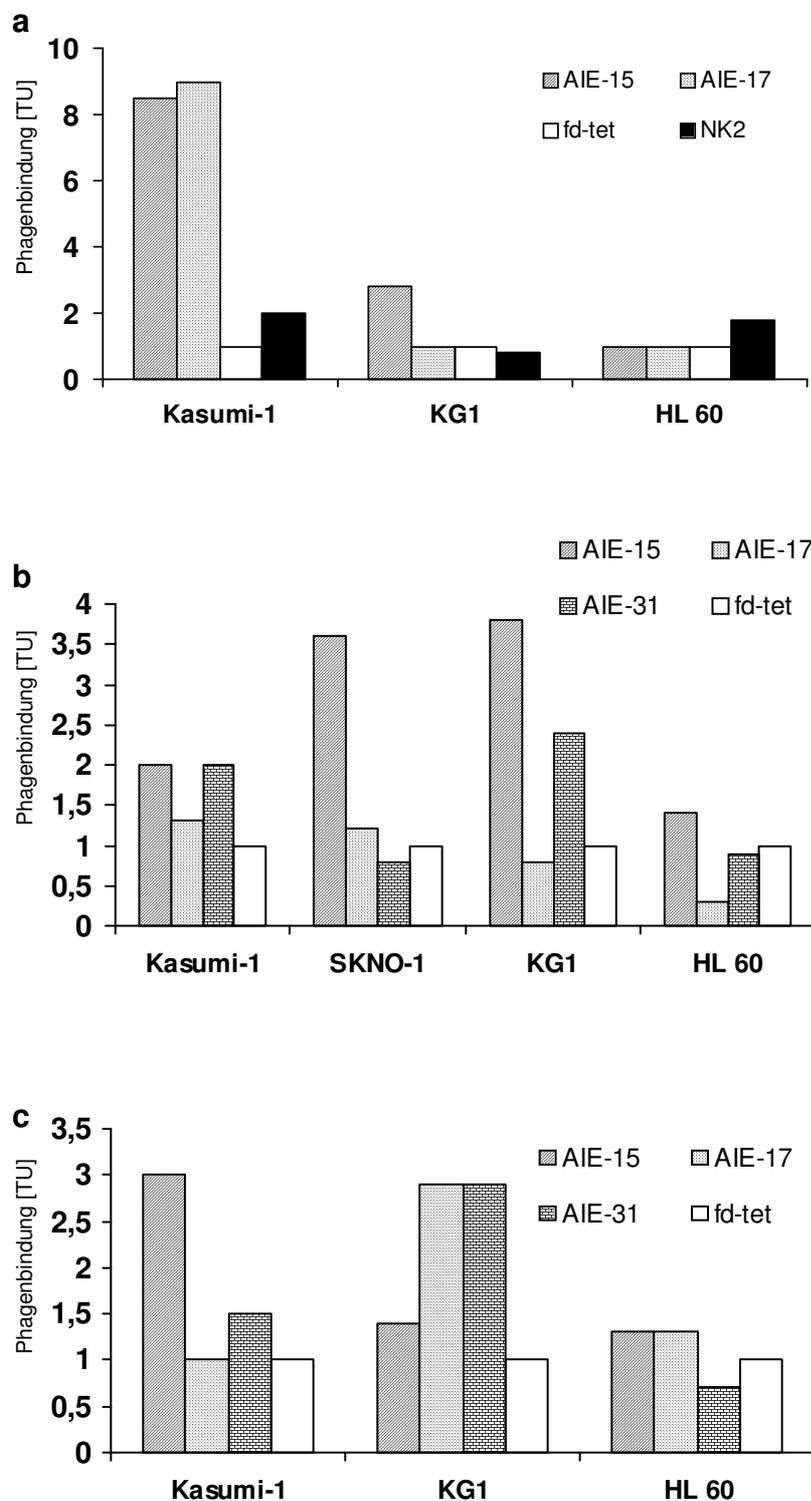


Abbildung 3.8.
Einzellklonbindung von AIE-15, AIE -17, AIE-31 auf konstitutiv AML1/ETO- exprimierenden und AML1/ETO-negativen Zelllinien:

Die Bindungsfähigkeit der selektierten Klone AIE-15, und AIE-17 und AIE-31 wurde gegen die der Negativkontrollphagen fd-tet (**a-c**) und NK2 (**a**) auf Zellen AML1/ETO-positiver (Kasumi-1, SKNO-1) und AML1/ETO-negativer (KG1 und HL60) Zelllinien überprüft.

(**a**): Hierfür wurden 1×10^8 TU der jeweiligen Phagenlösungen auf 2×10^6 Ziel-Zellen (Kasumi-1, KG1, HL60),

(**b**): 1×10^8 TU der jeweiligen Phagenlösungen auf 1×10^6 Zielzellen (Kasumi-1, SKNO-1, KG1, HL60) und

(**c**): 1×10^8 TU der jeweiligen Phagenlösungen auf 1×10^6 Zielzellen (Kasumi-1, KG1, HL 60) über 5 Minuten inkubiert. Die zellgebundenen Phagen mittels Dichtegradientenzentrifugation separiert und durch Inkubation mit K91kan-Bakterien aus den Pellets isoliert. Die Quantifizierung der Phagenbindung erfolgte über transduzierende Einheiten (TU) in den E.coli-Bakterien.

Die Zellbindung des insertlosen Negativkontrollphagen diente als Maß der unspezifischen Phagenbindung und wurde gleich „eins“ gesetzt, die jeweiligen Zellbindungen der anderen Phagen darauf bezogen.

3.2.4.3 Einzelklonbindungsversuche von AIE-15, AIE-17 und AIE-31 auf primären AML1/ ETO-positiven Leukämiezellen

Schließlich wurde die Bindungsfähigkeit der auf dem AML1/ETO induzierbaren Zellsystem selektierten Phagen AIE-15, AIE-17 und AIE-31, sowie deren Negativkontrollen an die peripheren Blasten einer unbehandelten Patientin mit AML1/ETO-positiver Leukämie im Vergleich zur Bindungsfähigkeit an periphere mononukleäre Zellen und mononukleäre Knochenmarkszellen gesunder Spender getestet. Es zeigte sich eine deutlich erhöhte Bindung der Klone AIE-15 und AIE-17 an die peripheren AML1/ETO-positiven leukämischen Blasten im Vergleich zu Bindung an mononukleäre AML1/ETO-negative Zellen gesunder Spender.

Der Vergleich des Bindungsniveaus an die AML-Zellen zur Negativkontrolle ergab eine 6,6-fach höhere Bindung des AIE-15, respektive eine 9,4-fach höhere Bindung des AIE-17 (Abb. 3.9). Ferner wurden die peripheren leukämischen Blasten von dem Klon AIE-15 22-fach stärker gebunden als die peripheren mononukleären Zellen der gesunden Spenderin und 33-fach stärker als die mononukleären Zellen eines gesunden Knochenmarkspenders (Abb. 3.9).

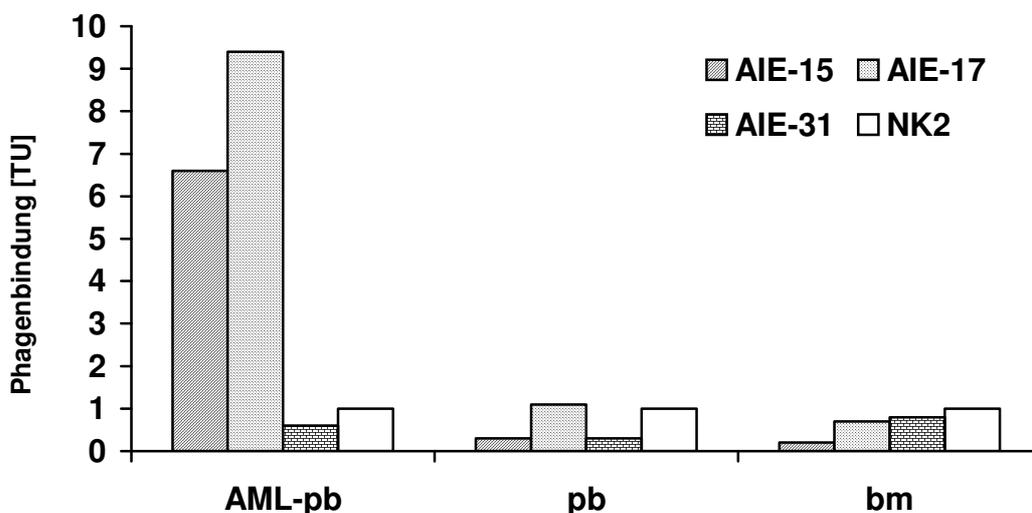


Abbildung 3.9 Einzelklonbindung von AIE-15, AIE-17 und AIE -31 auf primären AML1/ETO-positiven peripheren leukämischen Blasten:

Die Bindungsfähigkeit der Klone AIE-15, AIE-17 und AIE-31 wurde gegen die des Negativkontrollphagen NK2 auf primären AML1/ETO-positiven Leukämiezellen des peripheren Blutes (AML-pb), auf gesunden mononukleären Zellen des peripheren Blutes (pb) und des Knochenmarks (bm) überprüft. Die Phagen-Zell-Bindung wurde auf die NK2-Bindung an die jeweiligen Zellen, welche gleich "eins" gesetzt wurde, bezogen. Quantifizierung der Phagenbindung erfolgte über transduzierende Einheiten (TU) in *E.coli*. 5×10^8 TU der jeweiligen Phagenlösung wurden über 5 Minuten mit 2×10^6 Zielzellen inkubiert, die zellgebundenen Phagen mittels Dichtegradientenzentrifugation separiert und durch Inkubation mit K91kan-Bakterien aus den Pellets isoliert.

Allerdings lag die absolute Zahl generierter Bakterienklone bei diesem Einzelklonbindungsversuch auf normalem Knochenmark an der unteren Auswertbarkeitsgrenze. AIE-17 zeigte eine etwa 13-fach stärkere Bindung an die peripheren AML1/ETO-positiven Leukämiezellen als an die gesunden Knochenmarkszellen, sowie eine 8,5-fach höhere Bindung als an die peripheren AML1/ETO-negativen Zellen gesunder Spender (Abb. 3.9). Die Bindung des Peptids AIE-31 lag für alle Zellen im Bereich der Negativkontrolle (Abb. 3.9).

Die Patientin erhielt im Anschluss an die oben genannte Untersuchung im Rahmen einer Phase II-Studie eine Low-Dose-Chemotherapie mit Decitabine ($45\text{mg}/\text{m}^2/\text{Tag}$ über drei Tage). Vierzig Tage danach wurde erneut eine periphere Blutprobe gewonnen, der Blastenanteil lag nun bei 8%. Es erfolgte die Isolierung der CD 34-positiven Blasten über eine mit CD 34-Antikörpern besetzte Säule.

Diese aufgereinigte Patientenprobe wurde nun erneut auf die Interaktionsfähigkeit mit den beiden Klonen AIE-15 und AIE-17 getestet. Zum Vergleich wurde wiederum auf ebenso vielen peripheren mononukleären Blutzellen und Knochenmarkszellen gesunder Spender inkubiert. Als Kontrolle der spezifischen Peptidbindung diente der insertlose Phage fd-tet (Abb. 3.10). Auch nach einem Zyklus Decitabine mit deutlich antileukämischem Effekt zeigte sich noch eine erhöhte Bindung der Klone AIE-15 und AIE-17 an die peripheren AML1/ETO-positiven leukämischen Blasten im Vergleich zur Bindung an periphere mononukleäre AML1/ETO-negative Zellen gesunder Spender. Der Vergleich des Bindungsniveaus an die peripheren AML-Zellen zur Negativkontrolle ergab eine 6,1-fach höhere Bindung des AIE-15, respektive eine 4,7-fach höhere Bindung des AIE-17. Ferner wurden die peripheren leukämischen Blasten von dem Klon AIE-15 8,7-fach, respektive 4,4-fach stärker gebunden als die peripheren mononukleären Zellen der gesunden Spender (Abb. 3.10). AIE-17 zeigte eine noch 9,4-fach bis 1,8-fach stärkere Bindung an die peripheren Leukämiezellen als an periphere AML1/ETO-negative Zellen gesunder Spender. Hierbei zeigte sich allerdings dennoch im Vergleich zur Bindung des insertlosen Kontrollphagen fd-tet an die peripheren mononukleären Zellen eines Spenders eine immerhin 2,6-fach höhere Bindungsneigung (Abb. 3.10). Erstaunlicherweise fand sich auch eine doch deutliche Bindungsfähigkeit beider Klone (AIE-15 und AIE-17) an die mononukleären Knochenmarkszellen eines gesunden Spenders (Abb. 3.10).

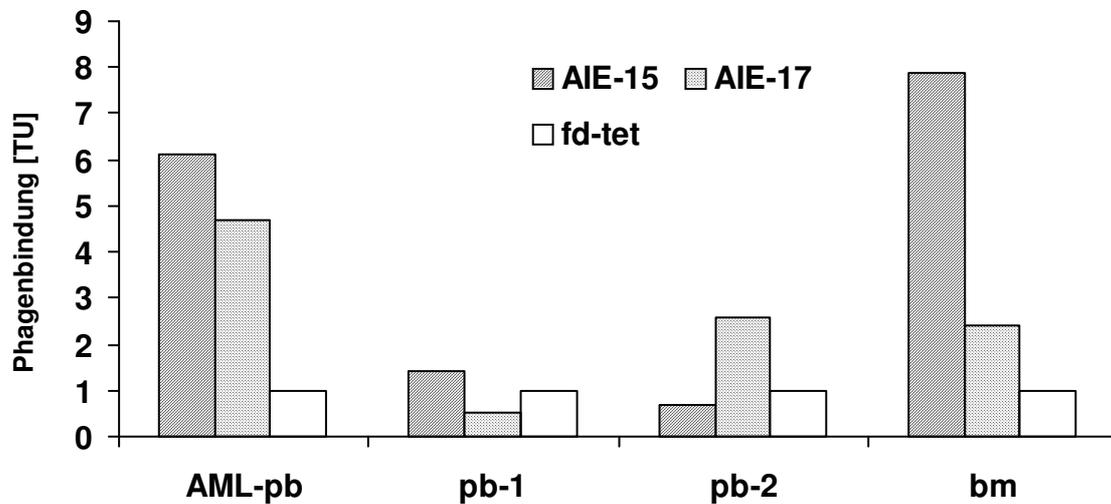


Abbildung 3.10
Einzelklonbindung von AIE-15 und AIE-17 auf primären AML1/ETO-positiven peripheren leukämischen Blasten nach Chemotherapie:

Die Bindungsfähigkeit der Klone AIE-15 und AIE-17 wurde gegen die des Negativkontrollphagen fd-tet auf primären AML1/ETO-positiven Leukämiezellen des peripheren Blutes (AML-pb) nach einem Zyklus Decitabine und auf mononukleären Zellen des peripheren Blutes (pb) und Knochenmarks (bm) gesunder Spender überprüft. Die Blastengewinnung erfolgte durch Isolierung der CD34-positiven Zellen mittels Affinitätsaufreinigung über eine mit CD34-Antikörpern besetzte Säule. Der Einzelklonbindungsversuch wurde auf je $1,5 \times 10^6$ Zielzellen wie in Abbildungslegende 3.9 beschrieben durchgeführt. Die Phagen-Zell-Bindung wurde auf die =1-gesetzte fd-tet-Bindung bezogen.

4 Diskussion

4.1 Überblick

Für viele der an akuten myeloischen Leukämien (AML) erkrankten Patienten ist die Prognose weiterhin ungünstig (King et al., 2007). Die begrenzte Wirksamkeit der aktuell verfügbaren Therapien ist partiell auf ihre starke unspezifische Toxizität zurückzuführen, die einer Dosissteigerung der Medikation oder oft auch nur der planmäßigen Durchführung der Therapie häufig entgegensteht. Die Entwicklung eines neuen auf Leukämiezellen zielgerichteten Therapieansatzes, in welchem AML-zellspezifische Oberflächenrezeptoren durch mit antineoplastischen Komponenten konjugierten Liganden direkt adressiert werden, ist von großem klinischen Interesse. Ein für die Generierung eines solchen Konjugats geeigneter leukämiespezifischer Ligand sollte in der hier beschriebenen Arbeit mit Hilfe von Phagen-Peptidbanken isoliert werden. Bis zu Beginn der hier dargestellten Untersuchungen war ein solcher Ligand nicht publiziert.

Ziel war somit zunächst die Etablierung eines Modells, dessen Bedingungen die Selektion von randomisierten Peptiden auf verschiedenen malignen hämatopoetischen Zellen zuließ und somit als methodische Grundlage zur Identifizierung und Charakterisierung spezifisch bindender Liganden und ihrer Rezeptoren dienen konnte (im Einzelnen diskutiert in Kapitel 4.2).

Nach Etablierung der Selektionsbedingungen untersuchten wir, ob sich auf primären Zellen von an verschiedenen AML erkrankten Patienten Peptidliganden anreichern und identifizieren ließen. Diese sollten möglichst an alle Leukämie-Zellen aus der heterogenen Gruppe akuter myeloischer Leukämien, aber nicht an gesunde hämatopoetischen Zellen binden. Ein solches Bindungsverhalten wäre aus klinischer Sicht hinsichtlich eines subgruppenunabhängigen Therapieansatzes von besonderem Vorteil. Die Anreicherung solcher Peptide unter den etablierten Selektionsbedingungen zeigte sich als durchführbar, die selektierten Peptide konnten durch Sequenzierung identifiziert werden (s. Kapitel 4.2 und 4.3).

Die Bindung der selektierten Phagen an AML-Blasten wurde in Einzelklonbindungsversuchen an primären und kultivierten Leukämiezellen bestätigt, allerdings schien diese doch phänotypabhängig zu sein (im Einzelnen diskutiert in Kapitel 4.4).

In einem alternativen Ansatz strebten wir die Identifizierung von Liganden an, welche mit Oberflächenmolekülen interagieren, die auf einer bestimmten Subgruppe der AML, den AML1/ETO-positiven Leukämien, exprimiert werden. Hierbei konnten wir zwei Peptidklone selektieren und identifizieren, deren Bindung an AML1/ETO-positive Zellen im induzierbaren Zellsystem, in Zellkultur und auf primärem AML-Blasten verifiziert werden konnte (im Einzelnen diskutiert in Kapitel 4.5).

Hiermit wurde die Grundlage für weitere Arbeiten zur möglichen Generierung zytotoxischer Konjugate gelegt. Die weitere Charakterisierung der identifizierten Liganden und ihrer Rezeptoren mögen zur Etablierung diagnostischer Marker dienen und zur Vertiefung des Verständnisses der pathophysiologischen Mechanismen der AML beitragen.

4.2 „Phage display“ auf primären akuten myeloischen Leukämiezellen

Die Entwicklung zielgerichteter Therapien setzt die Identifikation zielzellspezifischer Rezeptoren und/oder deren Liganden voraus, mit Hilfe derer man ein therapeutisches Agens (Medikament, Gentherapievektor) gezielt auf Zellen „lenken“ kann (Drug-Targeting). In klinischer Erprobung finden sich derzeit einige neuartige Therapieansätze, welche spezifisch auf molekulare Charakteristika der einzelnen AML-Formen abzielen. Diese inkludieren z.B. Histondeacetylaseinhibitoren (Kosugi et al., 1999), Proteasomeninhibitoren (Yu et al., 2003), Farnesyltransferaseinhibitoren (Karp et al., 2001) und Angiogenesehemmer wie z.B. Bevacizumab (Zini et al., 2007). Mit der Selektion zelltypspezifischer Liganden aus randomisierten Phagen-Peptidbanken steht eine effiziente Möglichkeit zur Identifikation neuer interessanter Rezeptor-Liganden-Komplexe zu Verfügung, eine Methode, welche in ihren ersten Grundlagen Mitte der 80er Jahre entwickelt wurde (Smith, 1985). Seit einigen Jahren werden zahlreiche Arbeiten zur Selektion von Liganden aus Phagen-Peptidbanken beschrieben, die an Tumorzellen, Tumorgefäßzellen, aber auch an hämatopoetische Zellen binden. So konnte die Isolierung und Identifizierung von Liganden, die in vivo bei systemischer Verabreichung an gewebespezifische, endotheliale Rezeptoren binden demonstriert werden (Pasqualini et al., 1996 und 1997; Arap et al., 1998 und 2002; Burg et al., 1999; Rajotte et al., 1999; Bussolati et al., 2007). Mittels „phage display“ konnten verschiedene spezifisch bindende Liganden und ihre Rezeptoren identifiziert werden (Trepel et al., 2002). Für pulmonales Gewebe wurden Homing-Peptide mit GFE-Motiv, für die Retina mit RDV-Motiv identifiziert (Rajotte et al., 1998). Ein RGD-Bindungsmotiv spielt eine wichtige Rolle in der Bindungsaffinität und -spezifität von Liganden zu bestimmten Integrin-heterodimeren (Koivunen et al., 1994; Ruoslahti, 1996). Kelly et al. identifizierten Hepsin-bindende Liganden und zeigten im Mausmodell die Anreicherung der Phagen im malignen Prostatagewebe (2008). Auch beim Menschen sind organspezifisch exprimierte Rezeptoren beschrieben, die einer Identifizierung durch in vivo-Selektion von Phagen-Peptidbanken zugänglich sind (Arap et al., 2002). Hsiung et al. konnten auf Colon-Adenom-Gewebe Peptidliganden selektieren, die deutlich stärker an dysplastische als an gesunde Colonepithelzellen banden (2008).

Im Tierversuch konnte eine deutlich erhöhte zytostatische Wirksamkeit bei geringerer systemischer Toxizität durch Kopplung eines Anthrazyklin-Chemotherapeutikums an tumorspezifisch bindende Peptide erzielt werden als bei Applikation des ungekoppelten

Anthrazyklins (Arap et al., 1998). Ähnliche Ergebnisse zeigten Ellerby et al. mit der Kopplung eines zytotoxischen Peptids an tumorbindende Peptide. Ferner konnte gezeigt werden, dass mit der Kopplung von Doxorubicin enthaltenden Liposomen an selektierte Peptidliganden bei Mäusen mit humanen Lungentumoren eine höhere Überlebensrate erzielt werden konnte (Lee et al., 2007). Die Koppelung therapeutischer Agenzien an zelltypspezifisch bindende Peptide und deren in vivo Einsatz ist also durchführbar. Hiermit ergeben sich neue Möglichkeiten für Behandlungsformen wie der zielgerichteten zytotoxischen und funktionellen Therapie. Hinsichtlich der akuten myeloischen Leukämien war ein solcher Ansatz in Unkenntnis eines leukämiespezifisch bindenden Liganden bisher nicht durchführbar. Ein seit längerer Zeit verfügbares Konjugat eines Zytostatikums mit einem anti-CD33-Antikörper (Gemtuzumab Ozogamicin, Mylotarg[®], ein Immunokonjugat mit dem zytotoxischen Agens Calicheamicin) zeigt zwar beachtliche antileukämische Effekte (Sievers et al., 2001; Pagano et al., 2007), kann das Problem aber trotz offenbar unterschiedlichen Nebenwirkungsprofils im Vergleich zu konventionellen AML-Therapien nicht hinreichend lösen, da CD33 ein Marker für unreife myeloische Zellen an sich und keineswegs spezifisch für Leukämiezellen ist. Auch der vor einigen Jahren beschriebene HERG-Kalium-Kanal wird ebenfalls auf physiologischen Blutzellvorstufen exprimiert (Pillozzi et al., 2002). Ein kürzlich identifizierter und beschriebener AML-assoziiertes Oberflächenmarker der myeloiden Zellreihe, C-type lectin-like molecule-1 (CLL-1) (Bakker et al., 2004) zeigt zwar kaum Expression auf nicht transformierten hämatopoetischen Stammzellen und CD34-positiven Progenitorzellen, präsentiert sich aber als ein stark exprimierter Marker der myeloischen Differenzierungslinie, unabhängig vom neoplastischen Potential. Auch wenn Bakker et al. eine extra-hämatopoetische Expression nicht nachweisen konnten, so zeigten Marshall et al, dass eine gekürzte Variante des Glykoproteins durchaus in Herz, Lunge, Colon und Plazenta exprimiert wird (Marshall et al., 2004). Dennoch ist die Beschreibung von CLL-1 als AML-assoziiertes Rezeptor hinsichtlich Diagnostik und therapeutischer Ansätze vielversprechend, die weitere Entwicklung bleibt abzuwarten.

Zu Beginn der hier beschriebenen Arbeit war ein Selektionsmodell auf Zellen der akuten myeloischen Leukämie nicht etabliert, eine Publikation über einen AML-spezifischen Liganden lag nicht vor. Zur Etablierung eines Systems zur Isolierung eines möglichst an alle akuten myeloischen Leukämiezellen jedoch nicht an nicht-malignen Zellen bindenden Peptidliganden wurde bewusst ein heterogener Selektionsansatz gewählt. Hierbei erfolgte die Negativselektion der zyklischen Phagen-Peptidbank CX₇C auf mononukleären Zellen des peripheren Blutes und des Knochenmarks gesunder Spender mit anschließender Positivselektion auf primären leukämischen Blasten des peripheren Blutes oder Knochenmarks von an AML erkrankten Patienten.

Eine höhere Bindungsneigung einer zyklischen gegenüber einer linearen Phagen-Peptidbank zu Zelloberflächenmolekülen wurde bereits von Koivunen et al. beschrieben (1993 und 1994). Die zyklische Struktur der Oberflächenpeptide wird durch Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten vermittelt, eine dadurch bedingte Präsentation des klonierten Peptides mag diesen Effekt erklären. Auch O'Neil et al. beschrieben eine mögliche höher-affine Peptid-Zellmolekül-Interaktion durch entsprechende Peptidkonformation (O'Neil et al., 1992; McGregor, 1996). In eigenen Vorversuchen mit der linearen Phagen-Peptidbank X₆ zeichnete sich in Übereinstimmung zu den publizierten Daten ein niedrigeres Bindungsniveau ab (Daten in dieser Arbeit nicht gezeigt), so dass wir im Weiteren die zyklische Peptidbank CX₇C verwendeten.

Systematisch wurden für jede Selektionsrunde die Parameter der Selektionsstringenz variiert bis eine erfolgreiche Anreicherung über drei Selektionsrunden beobachtet und reproduziert werden konnte. Eine Schwierigkeit dieses Selektionsmodells bestand in der beabsichtigten Heterogenität des Systems: ein in einer Selektionsrunde angereicherter Phage konnte schon in der nächsten Runde verloren gehen, wenn der passende Rezeptor auf dem in der nächsten Selektionsrunde verwendeten AML-Phänotyp nicht exprimiert wurde. Diese Bindungs-Divergenzen lassen sich durch Optimierung der Selektionsbedingungen schwer reduzieren, da sie ja beabsichtigter Teil des heterogenen Selektionsmodells auf primären AML-Blasten waren. Die theoretische Verbesserungsmöglichkeit multipler paralleler Selektionsansätze auf unterschiedlichen AML-Phänotypen mit anschließendem „Poolen“ ist schon auf Grund der zeitgleichen Verfügbarkeit primären Zellmaterials praktisch schwer zu realisieren. Diese der Heterogenität zuzuschreibenden Verluste potentiell bindender Phagen und die Isolierung von Phagen auf nur den verfügbaren AML-Phänotypen können die vorliegenden Bindungsunterschiede der selektierten Phagen an Zellen eines bestimmten AML-Phänotyps in Einzelklonbindungsversuchen erklären.

Dennoch konnte unter den etablierten Bedingungen reproduzierbar über die einzelnen Selektionsrunden eine zunehmende Bindung an AML-Blasten im Vergleich zur Bindung an nicht-maligne mononukleäre Zellen gesunder Spender gezeigt werden. Eine weitere Schwierigkeit des Systems fand sich in der Verfügbarkeit des primären Materials, da die Durchführung eines vollständigen Selektionsansatzes mit erheblichem Zellbedarf einherging. Unter leichter Modifizierung dieser hier etablierten Selektionsbedingungen konnten Jäger et al. eine erfolgreiche Anreicherung auf kultivierten Leukämiezellen zeigen (Jäger et al., 2007). Auch gelang in der hier vorliegenden Arbeit die erfolgreiche Anreicherung auf einem AML1/ETO-induzierbaren Zelliniensystem. Die Bedingungen des von uns etablierten Selektionsmodells ließen also die erfolgreiche Anreicherung von an primäre AML-Blasten bindenden Peptidliganden aus Phagen-Peptidbanken zu. Das Modell konnte durch Adaption und Validierung auf kultivierte Zellsysteme übertragen werden.

4.3 Identifizierung AML- Blasten bindender Peptide

Aus unterschiedlichen Selektionsrunden und -ansätzen mit deutlicher Phagenanreicherung wurden insgesamt 80 Phagenklone sequenziert. Überraschenderweise zeigten sich trotz viel versprechender Unterschiede in der Bindung des Phagenpools aus der Selektion an Leukämiezellen und nicht-maligne Zellen bei der Sequenzierung nur wenige mehrfach vorkommende identische Sequenzen oder Konsensusmotive. In der Durchsicht der Aminosäuresequenzen der identifizierten Klone aus der Selektionsrunde III fanden sich mit CGWHVGAGC (RII-05, RIII-24) und CTHAARDSC (RIII-07, RIII-12), sowie aus der Selektionsrunde IV mit CYGLFGERC (RIV-08, RIV-24) und CYRLDAVVC (RIV-35, RIV-36) lediglich je zwei Phagen-Duplikate. Auch weitere übereinstimmende Bindungsmotive mit einer bestimmte Abfolge von mindestens drei aufeinander folgenden Aminosäuren, welche genügen können, um die Spezifität dieser Peptidbindung zu gewährleisten (Vendruscolo et al., 2001; Arap et al., 2002), ließen sich nicht ausmachen. Eine Erklärung für diese Beobachtung im Hinblick auf die vorab beschriebene stärkere Bindung der selektierten Phagen an AML-Blasten mag sich in der Heterogenität des Selektionansatzes finden. Viele divergierende Oberflächenmarker auf den heterogenen AML-Proben aller Subgruppen, außer M3, könnten zur Selektion einer Vielzahl von Phagen geführt haben, die dennoch in geringerem Maße an die nicht-malignen mononukleäre Zellen binden. Eine Anreicherung eines einzelnen Phagen hingegen scheint unter diesen heterogenen Bedingungen nicht selbstverständlich. Hierzu passend zeigte sich eine deutliche Anreicherungen in Form von sequenzgleichen Klonen in homogeneren Selektionssystemen in Zellkultur (Jäger et al., 2007) und auf einem AML1/ETO-induzierbaren Zellsystem (s. Kapitel 4.5).

Für eine weitere Charakterisierung wählten wir den Phagen RIV-36 (CYRLDAVVC), der mit RIV-35 im Duplikat vorlag, aus einer vierten Selektionsprozedur identifiziert worden war und in ersten Einzelklonbindungsversuchen ein deutlich stärkeres Bindungsverhalten an AML-Blasten zeigte. Über Datenbankanalyse (BLAST) ließ sich eine Vielzahl an humanen Proteinen identifizieren, die eine entsprechende Sequenzübereinstimmung aufwiesen. Solche möglichen Homologien eines selektierten Peptides mit der Bindungsstelle eines natürlichen Liganden können über Datenbankanalyse zur Ermittlung des Liganden und indirekt (sofern bekannt) seinem Rezeptor führen. Dieses Verfahren ist wiederholt erfolgreich durchgeführt worden (Pasqualini et al., 2000; Essler et al., 2002). Eine Homologie des isolierten Bindungspeptides zu einem bekannten Liganden ist jedoch nicht zwingend gegeben. Eine genauere Eingrenzung eines potentiell natürlichen Liganden war in dieser Arbeit nicht möglich.

4.4 Peptidvermittelte Bindung des Phagenklons RIV-36 an akute Leukämiezellen und mononukleäre Zellen gesunder Spender

In Einzelklonbindungsversuchen wurde die peptidvermittelte Bindungsfähigkeit des auf primären AML-Blasten selektierten Peptid-Phagen mit der Sequenz CYRLDAVVC an primäre AML-Blasten des peripheren Blutes oder Knochenmarks im Vergleich zur Bindungsfähigkeit an nicht-maligne mononukleäre Zellen gesunder Spender überprüft. Reproduzierbar konnte eine deutlich höhere Bindung an AML-Blasten sowohl des peripheren Blutes als auch des Knochenmarks an AML erkrankter Patienten gezeigt werden. Die Stärke der Bindung divergierte jedoch für jede Patientenprobe individuell. Auch bewegte sich die Bindung des selektierten Phagen RIV-36 an nicht-maligne periphere Blut- oder Knochenmark Zellen nicht für jeden Probanden im Bereich der Negativkontrolle. So zeigte sich vereinzelt eine deutliche Bindung an mononukleäre Knochenmarkszellen gesunder Spender, wenn diese Bindung auch wesentlich geringer war als die an die AML-Blasten. Es scheint sich also bei dem von RIV-36 gebundenen Rezeptor weder um einen allen akuten Leukämien gemeinsamen Marker, noch um ein spezifisch auf AML-Blasten exprimiertes Oberflächenmolekül zu handeln. Vielmehr ergibt sich aus der präferentiellen AML-Zellbindung eine phänotypabhängige Bindung an einen wohl auf AML-Blasten häufiger aber nicht ausschließlich hochreguliert exprimiertes Oberflächenmolekül. Diese Hypothese wird auch durch das Bindungsverhalten des Phagen RIV-36 an verschiedene leukämische Zelllinien gestützt. Auch hier zeigte sich ein Zelllinien- und damit ebenfalls phänotypabhängiges Bindungsverhalten. So konnte eine stärkere Bindung an K562 und KG1 mehrfach reproduziert werden, während sich die Bindung an die AML1/ETO-positiven Zelllinien Kasumi-1 und SKNO-1, sowie die Bindung an die Zellen einer akuten myeloischen Leukämie in Reifung, HL60, im Bereich der unspezifischen Bindung der Negativkontrollphagen fanden. Es ist anzunehmen, dass dieses von uns etablierte und extrem heterogen gewählte Selektionsmodell auf primären AML-Blasten fast aller Subgruppierungen eine Vielzahl von Phagen geringfügig anreichert, die an tendenziell häufiger, aber nicht exklusiv auf AML-Blasten exprimierte Oberflächenmoleküle binden. Mit RIV-36 zeigte ein solcher selektierter und identifizierter Phage eine deutlich erhöhte jedoch nicht spezifische Bindung an primäre AML-Blasten im Vergleich zur Bindung an mononukleäre Zellen gesunder Spender, sowie eine erhöhte phänotypabhängige Bindungsfähigkeit an einzelne Zelllinien akuter myeloischer Leukämien.

4.5 Peptidliganden für AML1/ETO-positive Zellen

In einem weiteren Ansatz wurde der Fokus auf die Identifizierung von Peptidliganden gerichtet, welche mit Oberflächenmolekülen interagieren, die auf einer bestimmten AML-Subgruppe, den AML1/ETO-positiven Leukämien exprimiert werden. Die dem Fusionsprotein

zu Grunde liegende Translokation (8; 21)(q22; q22) findet man häufig in der Gruppe der myeloblastischen Leukämien mit Ausreifung, M2, welche mit 25-30% die häufigste AML im Erwachsenen- und Kindesalter darstellt (Peterson et al., 2004; King et al., 2007). Zudem ist bekannt, dass sich die Funktion des Fusionsproteins sowohl in der transkriptionellen Repression als auch in der Aktivierung von Zielgenen manifestiert (Shimizu et al., 2000; Hwang et al., 1999; Uchida et al., 1997; Klampfer et al., 1996; Shimada et al., 2000; Burel et al., 2001; Pabst et al., 2001). Ferner ist die AML1/ETO-Positivität mit bestimmten zellmorphologischen und immunophänotypischen Charakteristika assoziiert, so exprimieren sie zumeist die myeloiden Oberflächenantigene CD13 und CD15, sind positiv hinsichtlich der Stammzell- und Progenitorantigene CD34 und HLA-DR, sowie des B-Zellmarkers CD19 und des neuralen Zelladhäsionsmoleküls und NK-Zellmarkers CD56. Eine Expression des Multi-Drug-Resistenzgens (MDR1) konnte nicht nachgewiesen werden (Scandura et al., 2002). Auf Grund der beschriebenen genregulatorischen Eigenschaften von AML1/ETO liegt eine Beeinflussung des Oberflächenmarkerprofils t(8/21)-positiver Leukämien durch AML1/ETO-Expression nahe, was die Zellen zu geeigneten Zielzellen zur Selektion AML-bindender Liganden macht. Dennoch gibt es kaum Zelloberflächenmoleküle, deren AML1/ETO-abhängige Expression kausal nachgewiesen werden konnte. Shimizu et al. konnten zeigen, dass die ektope AML1/ETO-Expression in murinen myeloiden Vorläuferzellen zur erhöhten Expression des G-CSF-Rezeptors mit G-CSF-stimulierbarer Zellproliferation führte. Auch in Patienten mit t(8;21)-positiver AML konnten hohe G-CSF-R-Expressionsniveaus gefunden werden (Shimizu et al., 2000). Ob es sich bei den in dieser Arbeit auf AML1/ETO-positiven Zellen selektierten Phagen AIE-15 und AIE-17 um an möglicherweise hochregulierte G-CSF-Rezeptoren bindende Liganden handelt, bliebe zu evaluieren.

Ferner untersuchten Baesecke et al. den Effekt einer ektope AML1/ETO-Expression in humanen hämatopoetischen Zellen im Xenograft-Mausmodell. Die AML1/ETO-positiven Zellen fanden sich überwiegend in gering differenzierten Zellfraktionen mit den Oberflächenmarkern CD34 und CD38, obgleich die Fähigkeit zur Differenzierung fast aller myeloiden Zellreihen erhalten blieb (Baesecke et al., 2005). Auf Grund der publizierten Daten lässt sich spekulieren, dass es sich bei AML1/ETO-hochreguliert exprimierten Oberflächenmolekülen eher um die Zellproliferation stimulierende als die Zelldifferenzierung inhibierende Moleküle handelt. Bei potentiellen Liganden könnte es sich dementsprechend um wachstumsstimulierende Faktoren, andere lösliche Faktoren, Proteine der extrazellulären Matrix oder Oberflächenmoleküle anderer Zellen handeln, die die Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Interaktion beeinflussen (z.B. Homing-Rezeptoren).

Ein weiterer Vorteil der Verwendung eines AML1/ETO-induzierbaren Zellliniensystems zur Selektion lag in der unbegrenzten Verfügbarkeit des Systems im Vergleich zu primären AML-

Blasten. Ein anderer Grund für die Wahl dieses Modells lag in der Reduktion der Heterogenität des Selektionsansatzes, die ein monoklonales Zelliniensystem mit sich bringt. Hierfür unterschieden sich die Zellen der Negativselektion nur im AML1/ETO-Expressionsausmaß von den Zellen der Positivselektion. Zu berücksichtigen ist hierbei allerdings, dass bei den transfizierten, nicht-induzierten U937-Zellen eine minimale AML1/ETO-„Baseline-Expression“ im Western-Blot nachgewiesen werden konnte.

Die Bindung der auf diesem System selektierten Phagen konnte nun auf einem wesentlich enger definiertem Ziel, eben AML1/ETO-positive Zellen jeglicher Herkunft (Zellkultur, Patientenprobe, induzierbares Zellsystem) getestet und bestätigt werden.

4.5.1 Selektionsmodell und Identifizierung

Zur Anreicherung von Liganden, die mit AML1/ETO-gesteuerten Oberflächenmolekülen interagieren, verwendeten Jäger et al. einen Ansatz mit Positivselektion auf einer konstitutiv AML1/ETO-exprimierenden Zelllinie, Kasumi-1. Hier konnte zwischenzeitlich mit CPLDIDFYC ein deutlich an AML1/ETO-positive Zellen bindendes Peptid selektiert und identifiziert werden, welches sowohl an das AML1/ETO-induzierbare U937-Zellsystem, an AML1/ETO konstitutiv exprimierende Zelllinien, als auch an AML1/ETO-positive Blasten einer AML-Patientin eine starke Bindung zeigte. Jäger et al. zeigten $\alpha 4\beta 1$ Integrin (VLA-4) als den vermuteten Rezeptor, welcher nach Ligandenbindung internalisiert wird. Hieraus ergibt sich ein viel versprechender Ansatz einer möglichen Konjugatbildung mit therapeutischer Implikation (Jäger et al., 2007).

In einem alternativen Ansatz zur Anreicherung von Liganden, die mit AML1/ETO-gesteuerten Oberflächenmolekülen interagieren, selektierten wir Peptidliganden durch Positivselektion auf dem beschriebenen U937-Zellsystem mit induzierter AML1/ETO-Expression (Fliegau et al., 2004). Jäger et al. hatten auf einem Cocktail verschiedener AML1/ETO-negativer AML-Zelllinien negativselektiert, die sich phänotypisch nicht nur durch die AML1/ETO-Expression bedingt von Kasumi-1, der Zelllinie der Positivselektion, unterschieden. Mit dem AML1/ETO-induzierbaren Zelliniensystem ergab sich die Möglichkeit auf fast identischen Zellen (transfizierten aber nicht-induzierten U937-Zellen) negativ zu selektieren, damit gezielt die AML1/ETO-abhängige Änderung im Oberflächenprofil dieser Zellen anzugehen und somit nicht für den Phänotyp der U937-Zelllinie charakteristische Peptide anzureichern.

Die nicht-transfizierte U937-Zelllinie für sich prägt schon ein monoblastärer und somit maligner Charakter wie auch die AML1/ETO konstitutiv exprimierende Zelllinie Kasumi-1. Die Besonderheit der Selektion auf dem induzierbaren System lag u.a. auch in eben nicht der Phagenanreicherung auf dem Oberflächenprofil einer bestimmten malignen Zelllinie, sondern ganz gezielt in dem Nachweis der Oberflächenprofildifferenz, welche durch AML1/ETO bedingt wird und somit potentiell Anteil des partiellen transformierenden Potentials der Translokation darstellen kann. Die Ähnlichkeit der Zellen der Positiv- und

Negativselektion erforderten die Anpassung der zuvor auf primären leukämischen Zellen etablierten Selektionsbedingungen. Um nicht initial zu viele an AML1/ETO-hochregulierte Rezeptoren bindende Phagen an eventuell vereinzelt auf nicht-induzierten Zellen exprimierte Rezeptoren zu verlieren, wurde die Stringenz der Selektionsbedingungen initial minimal gehalten und sukzessive von Selektionsrunde zu Selektionsrunde deutlich gesteigert. Es zeigte sich so mittels bakterieller Kolonien eine dezente Anreicherung der zellgebundenen Phagen über die vier durchgeführten Selektionsrunden. Die geringe Differenz in der Zahl von an AML1/ETO-positive und AML1/ETO-negative Zellen gebundenen Phagen lässt sich durch die niedrig-stringenten Selektionsbedingungen erklären. Das Verhältnis des Phagen-Output zum Phagen-Input sollte bei erfolgreicher Phagenanreicherung ansteigen. Das initial hohe Verhältnis lässt sich durch den initial übermäßigen Input ohne stringente Negativselektion erklären und vernachlässigen, von Selektionsrunde II zu Selektionsrunde III zeigte sich der erwartete diskrete Anstieg des Output/Input-Verhältnisses. Dass der erwartete weitere Anstieg in Selektionsrunde IV ausblieb, ist im Nachhinein mit der parallel zur Selektionsrunde durchgeführten Titerbestimmung der vorgereinigten Phagenlösung zu erklären, da hier durch bakterielle Schwankung ein etwas zu hoher Phagen-Input erfolgte. Interessanterweise zeigte sich - bei der starken Ähnlichkeit der Zellen der Positiv- und Negativselektion nicht ganz unerwartet - ebenfalls eine geringe Anreicherung der auf AML1/ETO-positiven Zellen in den vorangegangenen Selektionsprozeduren positivselektierten Phagen in der Bindung an AML1/ETO-negative, aber transfizierte-U937 Zellen. Geht man von einer Interaktion der Phagen mit durch AML1/ETO an der Zelloberfläche exprimierten Molekülen aus, so könnte eine geringe Anreicherung auch durch die AML1/ETO-Baseline-Expression der transfizierten Zellen erklärt werden.

Es konnten mit Klon AIE-17 (CLSGWGFTC) und Klon AEI-15 (CAQGLFRLC) zwei Peptide identifiziert werden, welche sich neunmal respektive siebenmal angereichert fanden. Da diese Klone aus verschiedenen Aliquots isoliert worden waren, konnte wirklich von einer Anreicherung und nicht einer eventuellen Kontamination ausgegangen werden. Wenn nur einzelne Aminosäureabfolgen, nicht aber die gesamte Peptidsequenz wiederholt auftreten, spricht man von Bindungsmotiven. Die bestimmte Abfolge von drei aufeinander folgenden Aminosäuren innerhalb einer Peptidsequenz kann genügen, um die Spezifität dieser Peptidbindung zu gewährleisten (Vendruscolo et al., 2001; Arap et al., 2002; Pasqualini, 1999). Geht man von der zyklischen Struktur der Peptide aus und berücksichtigt die nicht eindeutig zuzuordnende Aminosäure an Position sieben der Klon AIE-17 gleichenden Klone, so lässt sich eine Bindungsvermittlung über das Motiv LSGWG postulieren, in der Gruppe dem Klon AIE-15-gleichender Klone findet sich AQGL als allen Klonen gemeinsames Motiv. Über Datenbankanalyse (BLAST) lässt sich eine Vielzahl an Proteinen identifizieren, die eine

entsprechende Sequenzübereinstimmung aufweisen (zum Teil intramembranäre Proteine, zum Teil Proteine der extrazellulären Matrix), eine genauere Eingrenzung eines potentiellen natürlichen Liganden war jedoch auch in diesem Ansatz mit dieser Vorgehensweise nicht möglich.

4.5.2 Überprüfung der peptidvermittelten Bindung an AML1/ETO-positive Zellen in Einzelklonbindungsversuchen

Ist die Bindung der auf den AML1/ETO-positiven U-937-Zellen selektierten Phagen AIE-17 und AIE-15 an AML1/ETO-positive Zellen wirklich abhängig von der AML1/ETO-Expression, so erwartet man an AML1/ETO-positive Zellen eine stärkere Bindung unabhängig davon, ob es sich um ein induzierbares Zelliniensystem, kultivierte konstitutiv AML1/ETO-exprimierende Zellen oder primäre AML1/ETO-positive Blasten aus einer frischen Patientenprobe handelt. Dieses konnte für den Klon AIE-15 und partiell auch für den Klon AIE-17 gezeigt werden. AIE-15 zeigte reproduzierbar eine höhere Bindungsneigung an transfizierte induzierte, AML1/ETO-exprimierende U937-Zellen, an konstitutiv AML1/ETO-exprimierende Kasumi-1 und SKNO-1 Zelllinien, sowie an AML1/ETO-positiven Blasten einer AML-Patientin.

Es zeigte sich wiederholt eine erhöhte Bindung des AIE-15-Phagen an die Zelllinie KG1 (AML1/ETO-negativ) sowie an die mononukleären Zellen eines gesunden Knochenmarkspenders. Dieses Bindungsverhalten ließe sich erklären, indem ein durch AML1/ETO an der Zelloberfläche hochregulierter Rezeptor konstitutiv auch auf KG1, respektive den Knochenmarkszellen dieses einen gesunden Spenders exprimiert wird. Somit läge keine spezifische, sondern lediglich eine präferentielle Bindung an AML1/ETO-positive Zellen vor. Dass es sich bei dem selektierten Phagen auf Grund der Blasten- und Knochenmarkzellbindung um einen reinen Stammzellmarker handelt, scheint unwahrscheinlich, da sich das Bindungsverhalten an andere Knochenmarkszellen, bis auf die Zellen dieses einen Probanden, im Negativniveau bewegte. Dass die Bindung des Phagen sogar an die Knochenmarkszellen der an AML1/ETO-positiven AML erkrankten Patientin im Negativniveau liegt, widerspricht nicht unbedingt der These einer präferentiellen AML1/ETO-assoziierten Bindungsfähigkeit, da der Blastenanteil der Patientin im peripheren Blut deutlich über dem im Knochenmark lag. Dass auch nach einem Zyklus einer Chemotherapie der postulierte AML1/ETO-assoziierte Marker noch auf den vorhandenen Blasten den Phagen-Liganden zugänglich war, mag für einen therapeutischen Ansatz von Vorteil zu sein. Eine genauere Charakterisierung des Liganden bzw. dessen Rezeptors wäre diesbezüglich unerlässlich, zumal die aufgezeigten Vorbehalte hinsichtlich der Spezifität in Bezug auf ein potentiell therapeutisches zytotoxisches Konjugat erst genauer evaluiert werden müssten. Dennoch wurden mit den Peptiden CLSGWGFTC und CAQGLFRLC zwei

Liganden identifiziert, welche zumindest eine starke Bindung an AML1/ETO-positive, kultivierte und primäre Zellen aufweisen, während die Bindung an AML1/ETO-negative, kultivierte wie primäre periphere hämatopoetische Zellen der einer unspezifischen Phagenbindung entspricht.

4.6 Perspektiven und Ausblick

Mit dieser Arbeit konnten wir ein Selektionsmodell etablieren, welches die Anreicherung von präferentiell an Leukämiezellen bindende Liganden aus randomisierten Phagen-Peptidbanken erlaubte. Unter optimierten Selektionsbedingungen ließ sich dieses Modell zur erfolgreichen Selektion auf primären Blasten, sowie in modifizierter Form im Zellliniensystem anwenden, so dass mit CYRLDAVVC ein primäre AML-Blasten, sowie mit CLSGWGFTC und CAQGLFRLC zwei AML1/ETO-positive Zellen bindende Liganden identifiziert werden konnten.

Sicherlich lassen sich die Selektionsbedingungen weiter optimieren. Reduziert man die Heterogenität im „Screening“ auf primären Blasten, z.B. durch Berücksichtigung phänotypischer Unterschiede der AML-Proben in der Positivselektion, so ließe sich wohlmöglich ein für diesen Phänotyp konstant stärker bindender Ligand isolieren. Die theoretische Verbesserungsmöglichkeit multipler paralleler Selektionsansätze auf unterschiedlichen AML-Phänotypen mit anschließendem „Poolen“ ist schon auf Grund der zeitgleichen Verfügbarkeit primären Zellmaterials praktisch schwer zu realisieren, auch eine Erhöhung der Stringenz durch weitere Negativselektion auf gesundem Knochenmark ist auf Grund des Materialbedarfes schwer umzusetzen. Im Gegensatz dazu lassen sich im Zellliniensystem die Selektionsbedingungen durch Stringenzerhöhung sicherlich noch weiter optimieren, so dass die Selektion eines Liganden mit einer Bindungsstärke wie der des von Jäger et al. beschrieben Peptides (CPLDIDFYC) oder einer weniger präferentiellen als wirklich spezifischen Bindung an AML-Zellen möglich sein könnte.

Dennoch zeigten die in dieser Arbeit isolierten und identifizierten Peptide in Einzelklonbindungsversuchen eine präferentiell deutlich erhöhte Bindung an AML-Blasten, bzw. AML1/ETO-positive Zellen. Um formal zu beweisen, dass die beobachtete Bindung wirklich durch das exprimierte Peptid vermittelt wird, kann dieses Peptid synthetisch generiert werden (z.B. GST-Fusionsprotein oder über kommerzielle Anbieter). In kompetitiven Inhibitionsversuchen werden AML-Blasten mit diesen synthetischen Peptiden oder nicht homologen Kontrollpeptiden versetzt und anschließend der Inkubation mit den selektierten Klonen zugeführt.

Eine Identifizierung von selektierten Liganden mittels Datenbankanalyse konnte mehrfach erfolgreich unterstützt werden (Essler et al., 2002; Pasqualini et al., 2000). Den in dieser Arbeit selektierten Liganden konnte mit dieser Methode keine Homologie zu einem

bekanntem Liganden zugeteilt werden. In diesem Fall besteht die Möglichkeit, die Rezeptoren der isolierten Peptidliganden über alternative Verfahren zu identifizieren. So etablierten Pytela et al. die Prinzipien der Peptidaffinitätschromatographie (Pytela et al.; 1985). Hierbei werden die selektierten Peptide an aktivierte Sepharose kovalent gekoppelt und stellen die Matrix einer Säule dar, an welche Biotin-markierte Proteine aus Lysaten von AML-Blasten bzw. AML1/ETO-positiven Zellen gebunden werden. Nach Eluierung der gebundenen Proteinfraction wird diese über 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und nachgewiesen. Die Proteinbande des putativen Rezeptors kann schließlich aus dem fixierten SDS-Gel exzidiert und durch Massenspektrometrie analysiert werden. Das so gewonnene Peptidfragmentmuster wird mit bekannten Mustern aus Datenbanken verglichen. Ein so identifizierter Rezeptorkandidat für einen Liganden kann nun mittels antikörpervermittelter FACS-Analyse auf AML-Blasten bzw. AML1/ETO-positiven Zellen nachgewiesen werden. Ist kein kommerzieller Antikörper gegen den Rezeptorkandidaten erhältlich, kann die Expression dieses Moleküls in Ziel-Zelllysaten mittels RT-PCR überprüft werden. Um die Liganden-Rezeptor-Interaktion zu beweisen, könnte ein Phagenbindungs-Inhibitionsassay mit einem gegen den Rezeptor gerichteten Antikörper durchgeführt werden.

Nach Identifizierung des Rezeptors und Verifizierung der Liganden-Rezeptor-Bindung kann die Nutzung der isolierten Peptidliganden zum Therapietargeting evaluiert werden.

Zunächst sollten auch andere Gewebeproben/ Zelllinien auf Bindung des Liganden getestet werden, um die Spezifität des zielgerichteten Therapieansatzes zu gewährleisten.

Zytotoxische Substanzen wie Doxorubicin oder Cytosin-Arabinosid können mittels den Zelltyp bindenden Peptidliganden spezifisch auf Zielzellen mit dem passenden Rezeptor gelenkt werden (Lee et al., 2007; Arap et al., 1998). Dazu kann z.B. das Peptid mit Hilfe des Crosslinkers Carbodiimid kovalent an das zytotoxische Molekül gebunden (Bauminger et al., 1980), die entstandenen Konjugate werden im Vergleich zu den ungebundenen Chemotherapeutika auf AML-Zellen bzw. AML1/ETO-positiven Zellen in vitro, nach weiterer Evaluation eventuell im Mausmodell auf ihre Effizienz evaluiert.

Neben diesem primären Ziel der Herstellung zytotoxischer Konjugate zur AML-Therapie können isolierte Peptidliganden auch zur Herstellung von Gentherapievektoren genutzt werden (Muller et al., 2003). Weiter könnte ein AML- oder AML1/ETO-spezifisches Oberflächenmolekül der Etablierung diagnostischer Marker dienen. Schließlich kann die Kenntnis von hoch- oder herunterregulierten Oberflächenmolekülen auf AML-Blasten, AML1/ETO-positiven Leukämiezellen, sowie deren Liganden zu einem weiterführenden Verständnis über die pathophysiologischen Mechanismen der Erkrankung beitragen (z.B. Homing-Rezeptoren).

Neben anderen Methoden (King et al., 2007; Stone, 2007) bleibt „phage display“ weiterhin ein geeignetes Verfahren zur Detektion von Strukturen für zielgerichtete Therapieansätze. Die Kenntnis über AML-spezifische Rezeptoren und ihre Liganden bleibt weiterhin von Interesse für Diagnostik, grundlagenwissenschaftlichen Fragestellungen hinsichtlich der Pathophysiologie der AML und nicht zuletzt zielgerichteter Therapieansätze.

5 Zusammenfassung

Hintergrund: Peptidliganden, die spezifisch an akute myeloische Leukämiezellen binden, könnten die Grundlage eines zielgerichteten Therapieansatzes (zytotoxische Konjugate, Gentherapievektoren) darstellen, mit Reduktion therapieassoziierter unspezifischer Toxizität und Steigerung der Therapie-Effizienz. Über solche AML-Zellen bindende Liganden und ihre Rezeptoren ist wenig bekannt. Ziel der Untersuchungen war die Etablierung eines Modells, dessen Bedingungen die Selektion, Identifikation und Charakterisierung von Peptidliganden aus Phagen-Peptidbanken zuließ, welche eine Bindung an akute myeloische Leukämie-, jedoch nicht an hämatopoetische Zellen gesunder Spender zeigten.

Methodik: Wir etablierten ein Selektionsmodell, dessen Bedingungen die erfolgreiche Anreicherung von an primäre AML-Blasten bindenden Peptidliganden aus einer randomisierten Phagen-Peptidbank zuließ. Hierfür wurden zunächst unspezifisch bindende Phagen durch Inkubation auf nicht-malignen, mononukleären Zellen gesunder Spender eliminiert und die so vorgereinigte Phagen-Peptidbank einer Positivselektion auf primären AML-Blasten zugeführt. Die an die Zielzellen gebundenen Phagen wurden amplifiziert und erneut auf AML-Zellen selektiert. Nach drei bis vier solcher Selektionsrunden wurden die angereicherten Phagen durch Gensequenzierung identifiziert und die AML-spezifische Bindung in Einzelklonbindungsversuchen überprüft. In einem zweiten Ansatz wurde das Selektionsmodell an ein Zellsystem mit induzierbarer AML1/ETO-Expression adaptiert. Aus einer randomisierten Phagen-Peptidbank wurden AML1/ETO-positive Zellen bindende Peptidliganden selektiert, identifiziert und auf ihre Bindungsfähigkeit an AML1/ETO-positive Zellen überprüft.

Ergebnisse: Durch systematische Optimierung der Selektionsbedingungen konnten auf primären AML-Blasten Peptidliganden angereichert werden, die in konsekutiven Selektionsrunden eine zunehmend stärkere Bindung an AML-Blasten als an gesunde hämatopoetische Zellen zeigten. Auf primären AML-Blasten konnte mit CYRLDAVVC ein Peptidligand selektiert werden, der in Einzelklonbindungsversuchen eine bis zu 104-fach stärkere Bindung an primäre AML-Blasten, bzw. bis zu 8-fach stärkere Bindung an Leukämiezelllinien, als an gesunde mononukleäre Zellen aufwies. Auf dem AML1/ETO-induzierbaren Zellsystem konnten zwei Liganden mit den Sequenzen CLSGWGFTC, bzw. CAQGLFRLC selektiert und identifiziert werden, deren präferentielle Bindung an AML1/ETO-positive Zellen im induzierbaren Zellsystem, auf AML1/ETO konstitutiv exprimierenden Zelllinien und AML1/ETO-positiven primären Blasten bestätigt werden konnte.

Schlussfolgerung: Die präferentielle Bindung der selektierten Phagen an AML1/ETO-positive Leukämiezellen, bzw. primäre AML-Blasten könnte eine Basis zur Identifikation neuer leukämiespezifischer Strukturen und damit für die Entwicklung zielgerichteter therapeutischer Konjugate oder Vektoren darstellen.

6 Literaturverzeichnis

- Ahn, M. Y., G. Huang, S. C. Bae, H. J. Wee, W. Y. Kim and Y. Ito (1998). "Negative regulation of granulocytic differentiation in the myeloid precursor cell line 32Dcl3 by ear-2, a mammalian homolog of *Drosophila* seven-up, and a chimeric leukemogenic gene, AML1/ETO." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(4): 1812-1817.
- Amann, J. M., J. Nip, D. K. Strom, B. Lutterbach, H. Harada, N. Lenny, J. R. Downing, S. Meyers and S. W. Hiebert (2001). "ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, makes distinct contacts with multiple histone deacetylases and binds mSin3A through its oligomerization domain." *Mol Cell Biol* 21(19): 6470-6483.
- Arap, W., R. Pasqualini and E. Ruoslahti (1998). "Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model." *Science* 279(5349): 377-380.
- Arap, W., R. Pasqualini and E. Ruoslahti (1998). "Chemotherapy targeted to tumor vasculature." *Curr Opin Oncol* 10(6): 560-565.
- Arap, W., W. Haedicke, M. Bernasconi, R. Kain, D. Rajotte, S. Krajewski, H. M. Ellerby, D. E. Bredesen, R. Pasqualini and E. Ruoslahti (2002). "Targeting the prostate for destruction through a vascular address." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(3): 1527-1531.
- Asou, H., S. Tashiro, K. Hamamoto, A. Otsuji, K. Kita and N. Kamada (1991). "Establishment of a human acute myeloid leukemia cell line (Kasumi-1) with 8;21 chromosome translocation." *Blood* 77(9): 2031-2036.
- Baer, M. R., C. C. Stewart, R. K. Dodge, G. Leget, N. Sule, K. Mrozek, C. A. Schiffer, B. L. Powell, J. E. Kolitz, J. O. Moore, R. M. Stone, F. R. Davey, A. J. Carroll, R. A. Larson and C. D. Bloomfield (2001). "High frequency of immunophenotype changes in acute myeloid leukemia at relapse: implications for residual disease detection (Cancer and Leukemia Group B Study 8361)." *Blood* 97(11): 3574-3580.
- Bakker, A. B., S. van den Oudenrijn, A. Q. Bakker, N. Feller, M. van Meijer, J. A. Bia, M. A. Jongeneelen, T. J. Visser, N. Bijl, C. A. Geuijen, W. E. Marissen, K. Radosevic, M. Throsby, G. J. Schuurhuis, G. J. Ossenkoppele, J. de Kruif, J. Goudsmit and A. M. Kruisbeek (2004). "C-type lectin-like molecule-1: a novel myeloid cell surface marker associated with acute myeloid leukemia." *Cancer Res* 64(22): 8443-8450.
- Basecke, J., M. Schwieger, F. Griesinger, B. Schiedlmeier, G. Wulf, L. Trumper and C. Stocking (2005). "AML1/ETO promotes the maintenance of early hematopoietic progenitors in NOD/SCID mice but does not abrogate their lineage specific differentiation." *Leuk Lymphoma* 46(2): 265-272.
- Bauminger, S. and M. Wilchek (1980). "The use of carbodiimides in the preparation of immunizing conjugates." *Methods Enzymol* 70(A): 151-159.
- Bennett, J. M., D. Catovsky, M. T. Daniel, G. Flandrin, D. A. Galton, H. R. Gralnick and C. Sultan (1985). "Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group." *Ann Intern Med* 103(4): 620-625.
- Bitter, M. A., M. M. Le Beau, J. D. Rowley, R. A. Larson, H. M. Golomb and J. W. Vardiman (1987). "Associations between morphology, karyotype, and clinical features in myeloid leukemias." *Hum Pathol* 18(3): 211-225.
- Burel, S. A., N. Harakawa, L. Zhou, T. Pabst, D. G. Tenen and D. E. Zhang (2001). "Dichotomy of AML1-ETO functions: growth arrest versus block of differentiation." *Mol Cell Biol* 21(16): 5577-5590.
- Burg, M. A., R. Pasqualini, W. Arap, E. Ruoslahti and W. B. Stallcup (1999). "NG2 proteoglycan-binding peptides target tumor neovasculature." *Cancer Res* 59(12): 2869-2874.

- Casasnovas, R. O., L. Campos, F. Mugneret, C. Charrin, M. C. Bene, R. Garand, M. Favre, C. Sartiaux, I. Chaumarel, M. Bernier, G. Faure and E. Solary (1998). "Immunophenotypic patterns and cytogenetic anomalies in acute non-lymphoblastic leukemia subtypes: a prospective study of 432 patients." *Leukemia* 12(1): 34-43.
- Cheung, A. M., Y. L. Kwong, R. Liang and A. Y. Leung (2006). "Stem cell model of hematopoiesis." *Curr Stem Cell Res Ther* 1(3): 305-315.
- Dalton, W. T., Jr., M. J. Ahearn, K. B. McCredie, E. J. Freireich, S. A. Stass and J. M. Trujillo (1988). "HL-60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3." *Blood* 71(1): 242-247.
- Downing, J. R., D. R. Head, A. M. Curcio-Brint, M. G. Hulshof, T. A. Motroni, S. C. Raimondi, A. J. Carroll, H. A. Drabkin, C. Willman, K. S. Theil and et al. (1993). "An AML1/ETO fusion transcript is consistently detected by RNA-based polymerase chain reaction in acute myelogenous leukemia containing the (8;21)(q22;q22) translocation." *Blood* 81(11): 2860-2865.
- Downing, J. R. (1999). "The AML1-ETO chimaeric transcription factor in acute myeloid leukaemia: biology and clinical significance." *Br J Haematol* 106(2): 296-308.
- Downing, J. R. (2001). "AML1/CBFbeta transcription complex: its role in normal hematopoiesis and leukemia." *Leukemia* 15(4): 664-665.
- Ellerby, H. M., W. Arap, L. M. Ellerby, R. Kain, R. Andrusiak, G. D. Rio, S. Krajewski, C. R. Lombardo, R. Rao, E. Ruoslahti, D. E. Bredesen and R. Pasqualini (1999). "Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides." *Nat Med* 5(9): 1032-1038.
- Essler, M. and E. Ruoslahti (2002). "Molecular specialization of breast vasculature: a breast-homing phage-displayed peptide binds to aminopeptidase P in breast vasculature." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(4): 2252-2257.
- Fliegau, M., M. Stock, T. Berg and M. Lubbert (2004). "Williams-Beuren syndrome critical region-5/non-T-cell activation linker: a novel target gene of AML1/ETO." *Oncogene* 23(56): 9070-9081.
- Frank, R., J. Zhang, H. Uchida, S. Meyers, S. W. Hiebert and S. D. Nimer (1995). "The AML1/ETO fusion protein blocks transactivation of the GM-CSF promoter by AML1B." *Oncogene* 11(12): 2667-2674.
- Gallagher, R., S. Collins, J. Trujillo, K. McCredie, M. Ahearn, S. Tsai, R. Metzgar, G. Aulakh, R. Ting, F. Ruscetti and R. Gallo (1979). "Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia." *Blood* 54(3): 713-733.
- Gamou, T., E. Kitamura, F. Hosoda, K. Shimizu, K. Shinohara, Y. Hayashi, T. Nagase, Y. Yokoyama and M. Ohki (1998). "The partner gene of AML1 in t(16;21) myeloid malignancies is a novel member of the MTG8(ETO) family." *Blood* 91(11): 4028-4037.
- Gelmetti, V., J. Zhang, M. Fanelli, S. Minucci, P. G. Pelicci and M. A. Lazar (1998). "Aberrant recruitment of the nuclear receptor corepressor-histone deacetylase complex by the acute myeloid leukemia fusion partner ETO." *Mol Cell Biol* 18(12): 7185-7191.
- Giordano, R. J., M. Cardo-Vila, J. Lahdenranta, R. Pasqualini and W. Arap (2001). "Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands." *Nat Med* 7(11): 1249-1253.
- Hsiung, P. L., J. Hardy, S. Friedland, R. Soetikno, C. B. Du, A. P. Wu, P. Sahbaie, J. M. Crawford, A. W. Lowe, C. H. Contag and T. D. Wang (2008). "Detection of colonic dysplasia in vivo using a targeted heptapeptide and confocal microendoscopy." *Nat Med* 14(4): 454-458.

-
- Hurwitz, C. A., S. C. Raimondi, D. Head, R. Krance, J. Mirro, Jr., D. K. Kalwinsky, G. D. Ayers and F. G. Behm (1992). "Distinctive immunophenotypic features of t(8;21)(q22;q22) acute myeloblastic leukemia in children." *Blood* 80(12): 3182-3188.
- Hwang, E. S., J. H. Hong, S. C. Bae, Y. Ito and S. K. Lee (1999). "Regulation of c-fos gene transcription and myeloid cell differentiation by acute myeloid leukemia 1 and acute myeloid leukemia-MTG8, a chimeric leukemogenic derivative of acute myeloid leukemia 1." *FEBS Lett* 446(1): 86-90.
- Inaba, T., W. M. Roberts, L. H. Shapiro, K. W. Jolly, S. C. Raimondi, S. D. Smith and A. T. Look (1992). "Fusion of the leucine zipper gene HLF to the E2A gene in human acute B-lineage leukemia." *Science* 257(5069): 531-534.
- Jager, S., A. Jahnke, T. Wilmes, S. Adebahr, F. N. Vogtle, E. Delima-Hahn, D. Pfeifer, T. Berg, M. Lubbert and M. Trepel (2007). "Leukemia-targeting ligands isolated from phage-display peptide libraries." *Leukemia* 21(3): 411-420.
- Jakubowiak, A., C. Pouponnot, F. Berguido, R. Frank, S. Mao, J. Massague and S. D. Nimer (2000). "Inhibition of the transforming growth factor beta 1 signaling pathway by the AML1/ETO leukemia-associated fusion protein." *J Biol Chem* 275(51): 40282-40287.
- Kamps, M. P., C. Murre, X. H. Sun and D. Baltimore (1990). "A new homeobox gene contributes the DNA binding domain of the t(1;19) translocation protein in pre-B ALL." *Cell* 60(4): 547-555.
- Karp, J. E., J. E. Lancet, S. H. Kaufmann, D. W. End, J. J. Wright, K. Bol, I. Horak, M. L. Tidwell, J. Liesveld, T. J. Kottke, D. Ange, L. Buddharaju, I. Gojo, W. E. Highsmith, R. T. Belly, R. J. Hohl, M. E. Rybak, A. Thibault and J. Rosenblatt (2001). "Clinical and biologic activity of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in adults with refractory and relapsed acute leukemias: a phase 1 clinical-laboratory correlative trial." *Blood* 97(11): 3361-3369.
- Kelly, K. A., S. R. Setlur, R. Ross, R. Anbazhagan, P. Waterman, M. A. Rubin and R. Weissleder (2008). "Detection of early prostate cancer using a hepsin-targeted imaging agent." *Cancer Res* 68(7): 2286-2291.
- King, M. E. and J. M. Rowe (2007). "Recent developments in acute myelogenous leukemia therapy." *Oncologist* 12 Suppl 2: 14-21.
- Kitabayashi, I., A. Yokoyama, K. Shimizu and M. Ohki (1998). "Interaction and functional cooperation of the leukemia-associated factors AML1 and p300 in myeloid cell differentiation." *Embo J* 17(11): 2994-3004.
- Klampfer, L., J. Zhang, A. O. Zelenetz, H. Uchida and S. D. Nimer (1996). "The AML1/ETO fusion protein activates transcription of BCL-2." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(24): 14059-14064.
- Koivunen, E., D. A. Gay and E. Ruoslahti (1993). "Selection of peptides binding to the alpha 5 beta 1 integrin from phage display library." *J Biol Chem* 268(27): 20205-20210.
- Koivunen, E., B. Wang, C. D. Dickinson and E. Ruoslahti (1994). "Peptides in cell adhesion research." *Methods Enzymol* 245: 346-369.
- Koivunen, E., B. Wang and E. Ruoslahti (1994). "Isolation of a highly specific ligand for the alpha 5 beta 1 integrin from a phage display library." *J Cell Biol* 124(3): 373-380.
- Koivunen, E., W. Arap, D. Rajotte, J. Lahdenranta and R. Pasqualini (1999). "Identification of receptor ligands with phage display peptide libraries." *J Nucl Med* 40(5): 883-888.
- Koivunen, E., B. H. Restel, D. Rajotte, J. Lahdenranta, M. Hagedorn, W. Arap and R. Pasqualini (1999). "Integrin-binding peptides derived from phage display libraries." *Methods Mol Biol* 129: 3-17.

- Kosugi, H., M. Towatari, S. Hatano, K. Kitamura, H. Kiyoi, T. Kinoshita, M. Tanimoto, T. Murate, K. Kawashima, H. Saito and T. Naoe (1999). "Histone deacetylase inhibitors are the potent inducer/enhancer of differentiation in acute myeloid leukemia: a new approach to anti-leukemia therapy." *Leukemia* 13(9): 1316-1324.
- Lee, T. Y., C. T. Lin, S. Y. Kuo, D. K. Chang and H. C. Wu (2007). "Peptide-mediated targeting to tumor blood vessels of lung cancer for drug delivery." *Cancer Res* 67(22): 10958-10965.
- Lenny, N., S. Meyers and S. W. Hiebert (1995). "Functional domains of the t(8;21) fusion protein, AML-1/ETO." *Oncogene* 11(9): 1761-1769.
- Lutterbach, B., J. J. Westendorf, B. Linggi, A. Patten, M. Moniwa, J. R. Davie, K. D. Huynh, V. J. Bardwell, R. M. Lavinsky, M. G. Rosenfeld, C. Glass, E. Seto and S. W. Hiebert (1998). "ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, interacts with the N-CoR and mSin3 corepressors." *Mol Cell Biol* 18(12): 7176-7184.
- Marshall, A. S. and S. Gordon (2004). "Commentary: C-type lectins on the macrophage cell surface--recent findings." *Eur J Immunol* 34(1): 18-24.
- Marshall, A. S., J. A. Willment, H. H. Lin, D. L. Williams, S. Gordon and G. D. Brown (2004). "Identification and characterization of a novel human myeloid inhibitory C-type lectin-like receptor (MICL) that is predominantly expressed on granulocytes and monocytes." *J Biol Chem* 279(15): 14792-14802.
- Matozaki, S., T. Nakagawa, R. Kawaguchi, R. Aozaki, M. Tsutsumi, T. Murayama, T. Koizumi, R. Nishimura, T. Isobe and K. Chihara (1995). "Establishment of a myeloid leukaemic cell line (SKNO-1) from a patient with t(8;21) who acquired monosomy 17 during disease progression." *Br J Haematol* 89(4): 805-811.
- McGregor, D. (1996). "Selection of proteins and peptides from libraries displayed on filamentous bacteriophage." *Mol Biotechnol* 6(2): 155-162.
- Melnick, A. M., J. J. Westendorf, A. Polinger, G. W. Carlile, S. Arai, H. J. Ball, B. Lutterbach, S. W. Hiebert and J. D. Licht (2000). "The ETO protein disrupted in t(8;21)-associated acute myeloid leukemia is a corepressor for the promyelocytic leukemia zinc finger protein." *Mol Cell Biol* 20(6): 2075-2086.
- Meyers, S., N. Lenny and S. W. Hiebert (1995). "The t(8;21) fusion protein interferes with AML-1B-dependent transcriptional activation." *Mol Cell Biol* 15(4): 1974-1982.
- Muller, O. J., F. Kaul, M. D. Weitzman, R. Pasqualini, W. Arap, J. A. Kleinschmidt and M. Trepel (2003). "Random peptide libraries displayed on adeno-associated virus to select for targeted gene therapy vectors." *Nat Biotechnol* 21(9): 1040-1046.
- No, D., T. P. Yao and R. M. Evans (1996). "Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(8): 3346-3351.
- Nuchprayoon, I., S. Meyers, L. M. Scott, J. Suzow, S. Hiebert and A. D. Friedman (1994). "PEBP2/CBF, the murine homolog of the human myeloid AML1 and PEBP2 beta/CBF beta proto-oncoproteins, regulates the murine myeloperoxidase and neutrophil elastase genes in immature myeloid cells." *Mol Cell Biol* 14(8): 5558-5568.
- Nucifora, G. and J. D. Rowley (1995). "AML1 and the 8;21 and 3;21 translocations in acute and chronic myeloid leukemia." *Blood* 86(1): 1-14.
- Ogawa, E., M. Inuzuka, M. Maruyama, M. Satake, M. Naito-Fujimoto, Y. Ito and K. Shigesada (1993). "Molecular cloning and characterization of PEBP2 beta, the heterodimeric partner of a novel Drosophila runt-related DNA binding protein PEBP2 alpha." *Virology* 194(1): 314-331.
- Okuda, T., Z. Cai, S. Yang, N. Lenny, C. J. Lyu, J. M. van Deursen, H. Harada and J. R. Downing (1998). "Expression of a knocked-in AML1-ETO leukemia gene inhibits the establishment of

- normal definitive hematopoiesis and directly generates dysplastic hematopoietic progenitors." *Blood* 91(9): 3134-3143.
- O'Neil, K. T., R. H. Hoess, S. A. Jackson, N. S. Ramachandran, S. A. Mousa and W. F. DeGrado (1992). "Identification of novel peptide antagonists for GPIIb/IIIa from a conformationally constrained phage peptide library." *Proteins* 14(4): 509-515.
- Pabst, T., B. U. Mueller, N. Harakawa, C. Schoch, T. Haferlach, G. Behre, W. Hiddemann, D. E. Zhang and D. G. Tenen (2001). "AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia." *Nat Med* 7(4): 444-451.
- Pagano, L., L. Fianchi, M. Caira, S. Rutella and G. Leone (2007). "The role of Gemtuzumab Ozogamicin in the treatment of acute myeloid leukemia patients." *Oncogene* 26(25): 3679-3690.
- Pasqualini, R. and E. Ruoslahti (1996). "Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries." *Nature* 380(6572): 364-366.
- Pasqualini, R. and E. Ruoslahti (1996). "Tissue targeting with phage peptide libraries." *Mol Psychiatry* 1(6): 423.
- Pasqualini, R., E. Koivunen and E. Ruoslahti (1997). "Alpha v integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands." *Nat Biotechnol* 15(6): 542-546.
- Pasqualini, R. (1999). "Vascular targeting with phage peptide libraries." *Q J Nucl Med* 43(2): 159-162.
- Pasqualini, R., E. Koivunen, R. Kain, J. Lahdenranta, M. Sakamoto, A. Stryhn, R. A. Ashmun, L. H. Shapiro, W. Arap and E. Ruoslahti (2000). "Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis." *Cancer Res* 60(3): 722-727.
- Pasqualini, R., W. Arap and D. M. McDonald (2002). "Probing the structural and molecular diversity of tumor vasculature." *Trends Mol Med* 8(12): 563-571.
- Pasqualini, R. and W. Arap (2002). "Profiling the molecular diversity of blood vessels." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 67: 223-225.
- Pastan, I., R. Hassan, D. J. Fitzgerald and R. J. Kreitman (2006). "Immunotoxin therapy of cancer." *Nat Rev Cancer* 6(7): 559-565.
- Pedersen-Bjergaard, J. and J. D. Rowley (1994). "The balanced and the unbalanced chromosome aberrations of acute myeloid leukemia may develop in different ways and may contribute differently to malignant transformation." *Blood* 83(10): 2780-2786.
- Peterson, L. F. and D. E. Zhang (2004). "The 8;21 translocation in leukemogenesis." *Oncogene* 23(24): 4255-4262.
- Pillozzi, S., M. F. Brizzi, M. Balzi, O. Crociani, A. Cherubini, L. Guasti, B. Bartolozzi, A. Becchetti, E. Wanke, P. A. Bernabei, M. Olivotto, L. Pegoraro and A. Arcangeli (2002). "HERG potassium channels are constitutively expressed in primary human acute myeloid leukemias and regulate cell proliferation of normal and leukemic hemopoietic progenitors." *Leukemia* 16(9): 1791-1798.
- Puig-Kroger, A., C. Lopez-Rodriguez, M. Relloso, T. Sanchez-Elsner, A. Nueda, E. Munoz, C. Bernabeu and A. L. Corbi (2000). "Polyomavirus enhancer-binding protein 2/core binding factor/acute myeloid leukemia factors contribute to the cell type-specific activity of the CD11a integrin gene promoter." *J Biol Chem* 275(37): 28507-28512.
- Pytela, R., M. D. Pierschbacher and E. Ruoslahti (1985). "Identification and isolation of a 140 kd cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor." *Cell* 40(1): 191-198.
- Rabbitts, T. H. (1994). "Chromosomal translocations in human cancer." *Nature* 372(6502): 143-149.

- Rajotte, D., W. Arap, M. Hagedorn, E. Koivunen, R. Pasqualini and E. Ruoslahti (1998). "Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by in vivo phage display." *J Clin Invest* 102(2): 430-437.
- Rajotte, D. and E. Ruoslahti (1999). "Membrane dipeptidase is the receptor for a lung-targeting peptide identified by in vivo phage display." *J Biol Chem* 274(17): 11593-11598.
- Rhoades, K. L., C. J. Hetherington, J. D. Rowley, S. W. Hiebert, G. Nucifora, D. G. Tenen and D. E. Zhang (1996). "Synergistic up-regulation of the myeloid-specific promoter for the macrophage colony-stimulating factor receptor by AML1 and the t(8;21) fusion protein may contribute to leukemogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(21): 11895-11900.
- Rhoades, K. L., C. J. Hetherington, N. Harakawa, D. A. Yergeau, L. Zhou, L. Q. Liu, M. T. Little, D. G. Tenen and D. E. Zhang (2000). "Analysis of the role of AML1-ETO in leukemogenesis, using an inducible transgenic mouse model." *Blood* 96(6): 2108-2115.
- Rowley, J. D. (1990). "Recurring chromosome abnormalities in leukemia and lymphoma." *Semin Hematol* 27(2): 122-136.
- Ruoslahti, E. (1996). "RGD and other recognition sequences for integrins." *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 697-715.
- Saez, E., M. C. Nelson, B. Eshelman, E. Banayo, A. Koder, G. J. Cho and R. M. Evans (2000). "Identification of ligands and coligands for the ecdysone-regulated gene switch." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(26): 14512-14517.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* 239(4839): 487-491.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): 5463-5467.
- Sawyers, C. L. (1997). "Molecular genetics of acute leukaemia." *Lancet* 349(9046): 196-200.
- Scandura, J. M., P. Boccuni, J. Cammenga and S. D. Nimer (2002). "Transcription factor fusions in acute leukemia: variations on a theme." *Oncogene* 21(21): 3422-3444.
- Shimada, H., H. Ichikawa, S. Nakamura, R. Katsu, M. Iwasa, I. Kitabayashi and M. Ohki (2000). "Analysis of genes under the downstream control of the t(8;21) fusion protein AML1-MTG8: overexpression of the TIS11b (ERF-1, cMG1) gene induces myeloid cell proliferation in response to G-CSF." *Blood* 96(2): 655-663.
- Shimizu, K., I. Kitabayashi, N. Kamada, T. Abe, N. Maseki, K. Suzukawa and M. Ohki (2000). "AML1-MTG8 leukemic protein induces the expression of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptor through the up-regulation of CCAAT/enhancer binding protein epsilon." *Blood* 96(1): 288-296.
- Sievers, E. L., R. A. Larson, E. A. Stadtmauer, E. Estey, B. Lowenberg, H. Dombret, C. Karanes, M. Theobald, J. M. Bennett, M. L. Sherman, M. S. Berger, C. B. Eten, M. R. Loken, J. J. van Dongen, I. D. Bernstein and F. R. Appelbaum (2001). "Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse." *J Clin Oncol* 19(13): 3244-3254.
- Smith, G. P. (1985). "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface." *Science* 228(4705): 1315-1317.
- Smith, G. P. and J. K. Scott (1993). "Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage." *Methods Enzymol* 217: 228-257.

-
- Stone, R. M. (2007). "Novel therapeutic agents in acute myeloid leukemia." *Exp Hematol* 35(4 Suppl 1): 163-166.
- Sundstrom, C. and K. Nilsson (1976). "Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937)." *Int J Cancer* 17(5): 565-577.
- Takahashi, A., M. Satake, Y. Yamaguchi-Iwai, S. C. Bae, J. Lu, M. Maruyama, Y. W. Zhang, H. Oka, N. Arai, K. Arai and et al. (1995). "Positive and negative regulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promoter activity by AML1-related transcription factor, PEBP2." *Blood* 86(2): 607-616.
- Thirman, M. J., H. J. Gill, R. C. Burnett, D. Mbangkollo, N. R. McCabe, H. Kobayashi, S. Ziemer-van der Poel, Y. Kaneko, R. Morgan, A. A. Sandberg and et al. (1993). "Rearrangement of the MLL gene in acute lymphoblastic and acute myeloid leukemias with 11q23 chromosomal translocations." *N Engl J Med* 329(13): 909-914.
- Thormeyer, D., S. P. Tenbaum, R. Renkawitz and A. Baniahmad (1999). "EcR interacts with corepressors and harbours an autonomous silencing domain functional in both Drosophila and vertebrate cells." *J Steroid Biochem Mol Biol* 68(3-4): 163-169.
- Trepel, M., W. Arap and R. Pasqualini (2002). "In vivo phage display and vascular heterogeneity: implications for targeted medicine." *Curr Opin Chem Biol* 6(3): 399-404.
- Uchida, H., J. Zhang and S. D. Nimer (1997). "AML1A and AML1B can transactivate the human IL-3 promoter." *J Immunol* 158(5): 2251-2258.
- Vendruscolo, M., E. Paci, C. M. Dobson and M. Karplus (2001). "Three key residues form a critical contact network in a protein folding transition state." *Nature* 409(6820): 641-645.
- Wang, J., T. Hoshino, R. L. Redner, S. Kajigaya and J. M. Liu (1998). "ETO, fusion partner in t(8;21) acute myeloid leukemia, represses transcription by interaction with the human N-CoR/mSin3/HDAC1 complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(18): 10860-10865.
- Wang, S., Q. Wang, B. E. Crute, I. N. Melnikova, S. R. Keller and N. A. Speck (1993). "Cloning and characterization of subunits of the T-cell receptor and murine leukemia virus enhancer core-binding factor." *Mol Cell Biol* 13(6): 3324-3339.
- Wargnier, A., S. Legros-Maida, R. Bosselut, J. F. Bourge, C. Lafaurie, C. J. Ghysdael, M. Sasportes and P. Paul (1995). "Identification of human granzyme B promoter regulatory elements interacting with activated T-cell-specific proteins: implication of Ikaros and CBF binding sites in promoter activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(15): 6930-6934.
- Westendorf, J. J., C. M. Yamamoto, N. Lenny, J. R. Downing, M. E. Selsted and S. W. Hiebert (1998). "The t(8;21) fusion product, AML-1-ETO, associates with C/EBP-alpha, inhibits C/EBP-alpha-dependent transcription, and blocks granulocytic differentiation." *Mol Cell Biol* 18(1): 322-333.
- Yergeau, D. A., C. J. Hetherington, Q. Wang, P. Zhang, A. H. Sharpe, M. Binder, M. Marin-Padilla, D. G. Tenen, N. A. Speck and D. E. Zhang (1997). "Embryonic lethality and impairment of haematopoiesis in mice heterozygous for an AML1-ETO fusion gene." *Nat Genet* 15(3): 303-306.
- Yu, C., M. Rahmani, D. Conrad, M. Subler, P. Dent and S. Grant (2003). "The proteasome inhibitor bortezomib interacts synergistically with histone deacetylase inhibitors to induce apoptosis in Bcr/Abl+ cells sensitive and resistant to ST1571." *Blood* 102(10): 3765-3774.
- Yuan, Y., L. Zhou, T. Miyamoto, H. Iwasaki, N. Harakawa, C. J. Hetherington, S. A. Burel, E. Lagasse, I. L. Weissman, K. Akashi and D. E. Zhang (2001). "AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(18): 10398-10403.

- Zelesnik-Le, N. J., G. Nucifora and J. D. Rowley (1995). "The molecular biology of myeloproliferative disorders as revealed by chromosomal abnormalities." *Semin Hematol* 32(3): 201-219.
- Zhang, D. E., C. J. Hetherington, S. Meyers, K. L. Rhoades, C. J. Larson, H. M. Chen, S. W. Hiebert and D. G. Tenen (1996). "CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP) and AML1 (CBF alpha2) synergistically activate the macrophage colony-stimulating factor receptor promoter." *Mol Cell Biol* 16(3): 1231-1240.
- Zini, J. M. and G. Tobelem (2007). "[Angiogenesis and hematologic malignancy]." *Bull Cancer* 94 Spec No: S241-246.

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martin Trepel, nicht nur für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Übernahme des Erstgutachtens, sondern vor allem für die stets exzellente Betreuung der Arbeit mit ständiger Diskussionsbereitschaft und für die große Geduld und nicht selbstverständliche Einsatzbereitschaft, die die Korrektur der Arbeit mit sich brachte!

Weiter danke ich Herrn Prof. Dr. Michael Henke für die Übernahme des Zweitgutachtens!

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Roland Mertelsmann bin ich zu besonderem Dank verpflichtet, nicht nur für die Möglichkeit der Durchführung der Untersuchungen in der von ihm geleiteten Abteilung, sondern vor allem für seine Unterstützung und Diskussionsbereitschaft bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Ein großer Abschnitt dieses Projektes war nur durch die Kooperation mit Herrn Prof. Dr. M. Lübbert und seine Arbeitsgruppe möglich, für diese Zusammenarbeit möchte ich besonders danken!

Weiter gilt mein Dank Elisete de Lima-Hahn, Katrin Schlenker, Dr. Michael Stock, Dr. Sebastian Jäger, Dr. Felix Kaul, Heide Dierbach, Mahmoud Abdelkarim und allen namentlich nicht genannten Mitarbeitern des Labor Nothnagels und der Abteilung Innere Medizin I, die mich im Labor bei meiner Arbeit mit allen Kräften unterstützt haben und mir bei Techniken der Zellkultur und Molekularbiologie hilfreich zur Seite standen.

Ich danke meinem Lebensgefährten Herrn Dr. Rainer Claus für seine Unterstützung im Labor und bei der Bewerkstelligung zahlreicher Computerkrisen, sowie für seine Geduld, mir den zeitlichen Freiraum zur Fertigstellung der Arbeit einzuräumen, die diesbezüglichen Launen zu ertragen.

Ganz herzlichen Dank an all meinen Freunden für ihre fortwährende Begleitung und Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir immer zur Seite stehen, mich kritisieren, bestärken und unterstützen.

Danke!

8 Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name, Vorname: Adebahr, Sonja
 Geburtsdatum: 01.08.1977
 Geburtsort: Henstedt-Ulzburg
 Nationalität: Deutsch
 Familienstand: Ledig
 Familie: Ingrid und Kurt Adebahr, Bruder Jan
 Heimatanschrift: Dreikönigstraße 15
 79102 Freiburg
 Deutschland
 Telefon: 0761 769 27 48
 0179 48 26 864 (mobil)
 E-Mail: adebahrsonja@web.de

Schulbildung

1984-88 Grundschole Heidberg, Norderstedt
 1988-97 Lessing-Gymnasium Norderstedt
 1993 Aden-Bowman-Collegiate, Saskatoon, Saskatchewan, Kanada
 05/1997 Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife

Studium

1997-2005 Studium der Humanmedizin an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
 06.09.1999 Ärztliche Vorprüfung
 22.03.2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 29.03.2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 03.05.2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Wissenschaftliche Tätigkeiten

05/01- 06/03: Studiumsbegleitende Praktika in der AG Dr. M.Trepel, Medizinische Klinik, Abt. Hämatologie/ Onkologie, Uni-Klinik Freiburg
 2003 Wissenschaftliche Hilfskraft, AG Prof. Dr. Lübbert, Abt. Hämatologie/ Onkologie, Uni-Klinik Freiburg
 Thema: Detektion AML I /ETO induzierter Oberflächenproteine mittels phage display im induzierbaren Zellsystem sowie auf nativen Zellproben
 Seit 2004 Promotionsarbeit, AG PD Dr. M.Trepel, Medizinische Klinik I, Abt. Hämatologie/ Onkologie, Uni-Klinik Freiburg
 Thema: Selektion und Identifikation leukämiezellbindender Peptidliganden
 2002 Sommerakademie in Rovinj, Kroatien; Thema: Stammzellbiologie, Leitung Prof. Dr. C. Peters
 Seit 2007 Klinische Studie zur Evaluierung PET-detektierbarer Veränderungen in der Morphologie und/oder Verteilung hypoxischer Subvolumina in Hals-Kopf-Tumoren bei Patienten unter Radio(chemo)therapie, AG Prof. Grosu, Klinik für Strahlenheilkunde, Uni-Klinik Freiburg

Kongressbeiträge:

- Poster: DGHO annual meeting 2002, München
DGHO annual meeting 2003, Basel
DEGRO annual meeting 2007, Hannover
- Vorträge: Annual meeting of the association for Oncology of the Upper Rhine, 01/03, Basel
Deutscher Krebskongress 03/2004, Berlin
DGHO annual meeting 2004, Innsbruck
Deutscher Krebskongress 03/2006, Berlin

Publikation:

Leukemia-targeting ligands isolated from phage-display peptide libraries,
Jäger et. al, Leukemia, 2007 Mar; 21(3):411-20

Beruflicher Werdegang

Seit 10/05 Assistenzärztin in der Klinik für Strahlenheilkunde, Universitätsklinikum Freiburg
(bis 06/07: Ärztl. Direktor Prof. Dr. Dr.h.c H. Frommhold)
(seit 09/07: Ärztl. Direktorin Prof. Dr. A.-L. Grosu)

Stipendien

1998-2003 Stipendiatin der Studienstiftung des Deutschen Volkes