

# **Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf**

Onkologisches Zentrum  
II. Medizinische Klinik und Poliklinik

Direktor: Prof. Dr. med. C. Bokemeyer

## **The Actin Binding Protein Plastin-3 Is Involved in the Pathogenesis of Acute Myeloid Leukemia**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Arne Velthaus  
aus Papenburg

Hamburg 2023

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:  
20.12.2023**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:**  
Prof. Dr. Eva Tolosa

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:**  
Prof. Dr. Walter Fiedler

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Artikel im Original</b>	<b>1</b>
<b>2. Darstellung der Publikation mit Literaturverzeichnis</b>	<b>13</b>
<b>3. Zusammenfassung</b>	<b>29</b>
<b>4. Erklärung des Eigenanteils</b>	<b>30</b>
<b>5. Danksagung</b>	<b>31</b>
<b>6. Lebenslauf</b>	<b>32</b>
<b>7. Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>34</b>

Article

# The Actin Binding Protein Plastin-3 Is Involved in the Pathogenesis of Acute Myeloid Leukemia

Arne Velthaus <sup>1</sup>, Kerstin Cornils <sup>2,3</sup>, Jan K. Hennigs <sup>1</sup>, Saskia Grüb <sup>4</sup>, Hauke Stamm <sup>1</sup>, Daniel Wicklein <sup>5</sup>, Carsten Bokemeyer <sup>1</sup>, Michael Heuser <sup>6</sup>, Sabine Windhorst <sup>4</sup>, Walter Fiedler <sup>1</sup> and Jasmin Wellbrock <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Oncology, Hematology and Bone Marrow Transplantation with Division of Pneumology, Hubertus Wald University Cancer Center, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, 20246 Hamburg, Germany; arne.velthaus@gmx.de (A.V.); j.hennigs@uke.de (J.K.H.); stamm.hauke@gmail.com (H.S.); cbokemeyer@uke.de (C.B.); fiedler@uke.de (W.F.)

<sup>2</sup> Department of Pediatric Hematology and Oncology, Division of Pediatric Stem Cell Transplantation and Immunology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, 20246 Hamburg, Germany; k.cornils@uke.de

<sup>3</sup> Research Institute Children's Cancer Center Hamburg, 20246 Hamburg, Germany

<sup>4</sup> Center for Experimental Medicine, Institute of Biochemistry and Signal Transduction, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, 20246 Hamburg, Germany; s.grueb@uke.de (S.G.); s.windhorst@uke.de (S.W.)

<sup>5</sup> Department of Anatomy and Experimental Morphology, University Cancer Center, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, 20246 Hamburg, Germany; d.wicklein@uke.de

<sup>6</sup> Hematology, Hemostasis, Oncology and Stem Cell Transplantation, Hannover Medical School, 20246 Hannover, Germany; Heuser.michael@mh.hannover.de

\* Correspondence: j.wellbrock@uke.de; Tel.: +49-40-7410-55606

Received: 29 September 2019; Accepted: 25 October 2019; Published: 26 October 2019



**Abstract:** Leukemia-initiating cells reside within the bone marrow in specialized niches where they undergo complex interactions with their surrounding stromal cells. We have identified the actin-binding protein Plastin-3 (PLS3) as potential player within the leukemic bone marrow niche and investigated its functional role in acute myeloid leukemia. High expression of PLS3 was associated with a poor overall and event-free survival for AML patients. These findings were supported by functional in vitro and in vivo experiments. AML cells with a PLS3 knockdown showed significantly reduced colony numbers in vitro while the PLS3 overexpression variants resulted in significantly enhanced colony numbers compared to their respective controls. Furthermore, the survival of NSG mice transplanted with the PLS3 knockdown cells showed a significantly prolonged survival in comparison to mice transplanted with the control AML cells. Further studies should focus on the underlying leukemia-promoting mechanisms and investigate PLS3 as therapeutic target.

**Keywords:** Acute myeloid leukemia; Plastin-3; prognostic marker

## 1. Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) has still a dismal prognosis due to persistence of minimal residual disease (MRD) which results in high relapse rates. Chemotherapy-resistant and therefore non-targetable leukemia-initiating cells are the cause for MRD [1,2]. The leukemia-initiating cells reside within the bone marrow (BM) in specialized niches where they undergo complex interactions with their surrounding stromal cells [3]. This microenvironment offers protection against external influences [4]. One of the major goals of modern therapeutic approaches is thus to elucidate the complex signaling within the leukemic bone marrow niche as it might represent a rich source of novel therapeutic targets.

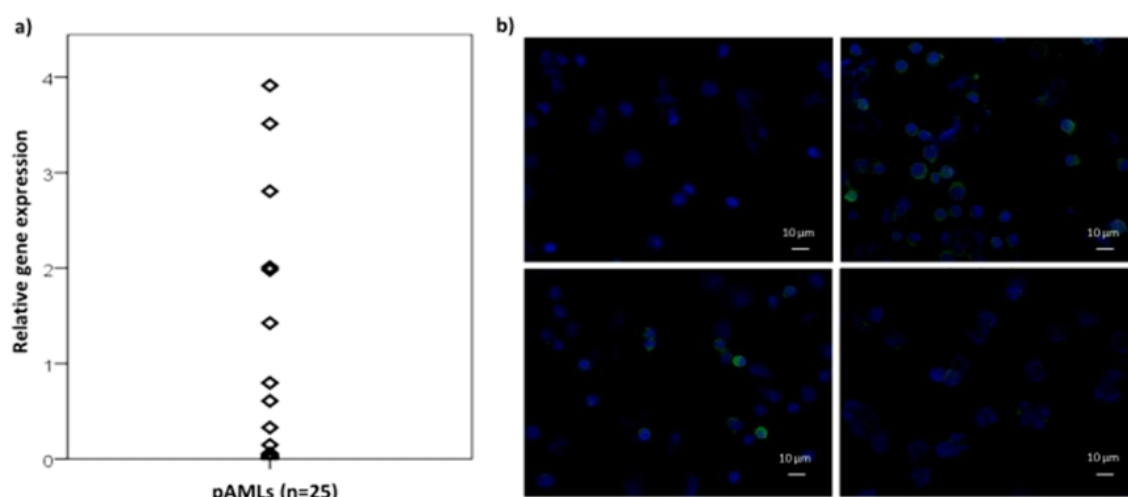
In the current study, we investigated the impact of Plastin-3 (PLS3) in acute myeloid leukemia as we had identified PLS3 as potential player within the leukemic bone marrow niche through gene expression analysis of AML and endothelial cell co-cultures.

Plastins, which are also called fimbrins, belong to a subclass of actin-binding proteins known as actin bundling proteins that can cross-link actin filaments into higher-order assemblies like bundles. In mammals, three isoforms have been characterized: Plastin-1 (PLS1 or I-Plastin) is specifically expressed in the small intestine, colon and kidney. Plastin-2 (PLS2 or L-Plastin) is predominantly expressed in hematopoietic cells, while Plastin 3 (PLS3 or T-plastin) is described to be expressed in cells of non-hematopoietic origin [5,6]. In addition, to its actin-bundling capacity, PLS3 may also control actin turnover, stabilization and assembly [7].

## 2. Results

### 2.1. The Actin Binding Protein PLS3 Is Expressed in Primary AML Cells

In order to identify genes being implicated in the interaction of acute myeloid leukemia (AML) cells and stromal cells, we performed co-cultures of primary AML cells with primary endothelial cells and screened for genes that were up- or down-regulated under the co-culture conditions by microarray analysis (Human Gene 2.0 ST Array, Affymetrix, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Co-cultures of CD34 positive hematopoietic progenitor cells from healthy donors were analyzed in parallel. Our aim was the identification of genes that were exclusively expressed in the leukemic cells. The actin binding protein PLS3 (Plastin-3) was identified to be up-regulated in the AML cells co-cultured with endothelial cells (9.8  $\pm$  5.0 fold up-regulation) while no significant alteration was observed in the co-culture of CD34 positive hematopoietic progenitor cells and endothelial cells (1.6  $\pm$  1.3 fold up-regulation; Supplementary Table S1). Further RT-qPCR analysis revealed an endogenous PLS3 expression in about 50% of BM samples from AML patients ( $n = 25$ ; Figure 1a). The PLS3 expression in primary AML cells was verified at the protein level by immunofluorescence ( $n = 9$ , Figure 1b). In contrast, mRNA expression of PLS3 was only detected in 2 of 12 AML cell lines analyzed with Kasumi-1 showing strong and THP-1 showing only very weak expression. Therefore, we concentrated our functional analysis of PLS3 on the AML cell line Kasumi-1.



**Figure 1.** Expression of PLS3 in primary AML samples. (a) The mRNA expression of primary AML samples was analyzed by RT-qPCR and normalized to GAPDH. The relative expression is shown in comparison to Kasumi-1 cells (expression value of 1). (b) PLS3 protein expression in primary AML samples was analyzed by immunofluorescence (green signals). The panel upper left shows the negative control without primary antibody while the lower left and right panels show the PLS3 staining of three primary AML samples of varying PLS3 expression intensity, respectively.

## 2.2. Functional Analysis of PLS3 by Knockdown or Overexpression in Kasumi-1 Cells

To study the functional effect of PLS3 on the cell biology, we performed a shRNA-mediated knockdown as well as overexpression of PLS3 in Kasumi-1 cells by lentiviral transduction. For the knockdown, we used two different PLS3-targeting shRNA constructs (PLS3-shRNA1 and PLS3-shRNA2) which resulted both in an efficient PLS3 mRNA knockdown of 80% to 90% (supplemental Figure S1). For the PLS3 overexpression, we cloned a vector with a N-terminal (PLS3-GFP) and a C-terminal (GFP-PLS3) PLS3 and GFP fusion construct, respectively. The relative mRNA overexpression of the PLS3-GFP- and GFP-PLS3-transduced Kasumi-1 cells was 18-fold and 35-fold, respectively (supplemental Figure S1). Differences between the PLS3 knockdown and overexpression cells in comparison to their respective controls were studied with different functional in vitro assays.

As PLS3 is an actin-binding protein, we first investigated co-localization of PLS3 and F-actin in Kasumi-1 overexpressing cells. As shown in Figure 2a, a clear co-localization of PLS3 and F-actin could be observed. Next, we studied whether PLS3 had an influence on the growth of Kasumi-1 cells in vitro. We could detect a slightly decreased proliferation rate when PLS3 was knocked down in Kasumi-1 cells but no significant increase in the PLS3 overexpression variants in proliferation assays (Figure 2b–e). AML is believed to be hierarchical with leukemia-initiating cells at the top that generate the pool of all leukemic progeny. The in vitro colony formation capacity mirrors the ability to give rise to leukemic progeny. Therefore, we analyzed whether PLS3 has an impact on the colony formation capacity of AML cells. Kasumi-1 cells transduced with PLS3-specific shRNAs or PLS3 overexpression constructs were seeded in methylcellulose-based semi-solid medium, and the number of colonies was counted after 7 to 10 days. We found that Kasumi-1 cells with a PLS3 knockdown showed significantly reduced colony formation capacity in comparison to cells transduced with a control vector ( $p < 0.0001$ , Figure 2f). In line with these data, we found significantly increased colony numbers in the PLS3 overexpressing Kasumi-1 cells ( $p < 0.001$ ; Figure 2g).

In order to get more insight into the signaling cascades PLS3 might be involved in leukemia, we performed RNA sequencing of Kasumi-1 PLS3-sh1 and PLS3-sh2 knockdown vs. control cells. Although the knockdown reached nearly 90% for both shRNA variants, to our surprise the overall gene dysregulations in the knockdown cells were only modest. Nevertheless, with an adjusted  $p$ -value of  $p < 0.1$ , we could detect ten genes and two non-coding RNAs that were significantly dysregulated in both PLS3 knockdown variants in comparison to their control cells. Dysregulated genes or non-coding RNAs included the fasciculation and elongation protein zeta (FEZ1), multimerin 1 (MMRN1) or RGMB antisense RNA 1 (RGMB-AS1; see Supplementary Table S2 for complete list). Using publicly available gene expression data of a large cohort of AML patients (GEO accession number GSE6891), we analyzed whether the gene expression level of PLS3 was correlated to the gene expression levels of the identified genes by performing a Pearson correlation [8]. Significant correlations could be found for PLS3 and ENPP3 (for one of two probesets,  $r = 0.279$ ,  $p < 0.001$ ), KIAA1751 (for three of four probesets,  $r = 0.182$ ,  $r = 0.294$ ,  $r = 0.232$ , respectively,  $p < 0.001$  for all), MMRN1 ( $r = 0.157$ ,  $p < 0.001$ ), POU4F3 ( $r = 0.294$ ,  $p < 0.001$ ), RSPH10B ( $r = 0.310$ ,  $p < 0.001$ ) and RGMB-AS1 ( $r = 0.228$ ,  $p < 0.001$ ).

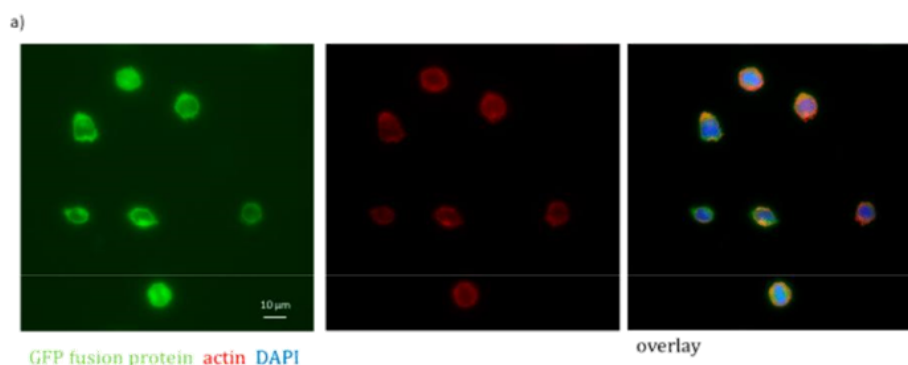
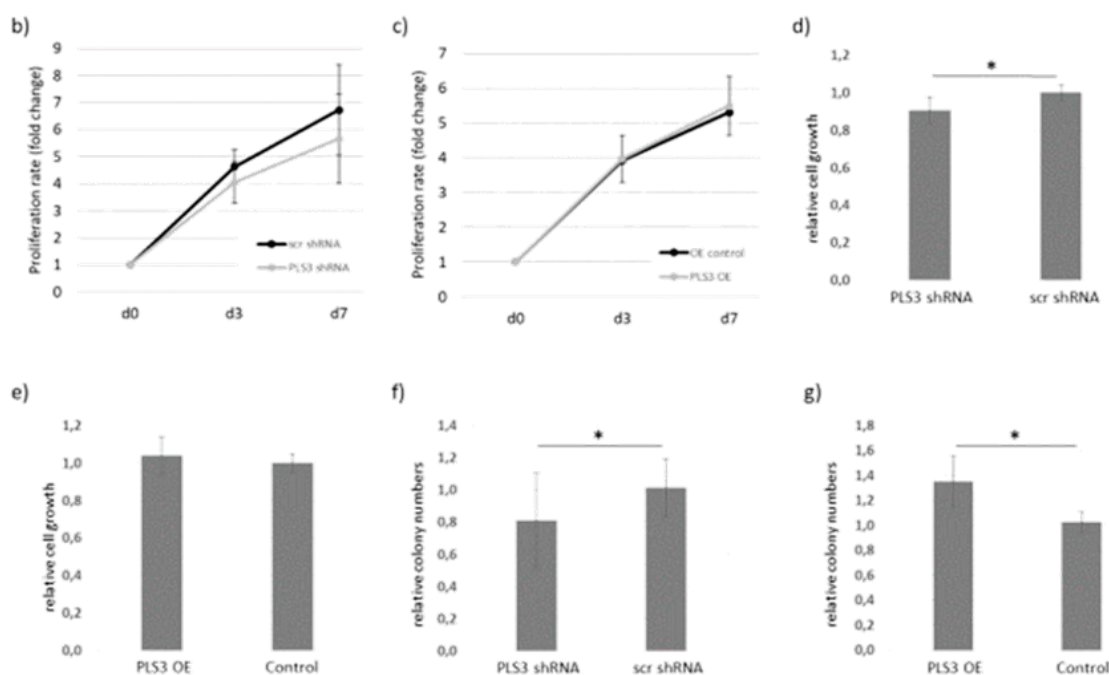


Figure 2. Cont.



**Figure 2.** Functional in vitro assays with PLS3 knockdown and overexpression Kasumi-1 cells. (a) GFP PLS3 overexpression cells were used to study the co-localization of PLS3 and F-actin. F-actin was labeled with Alex-fluor568-conjugated phalloidin (red). (b–e) Proliferation of PLS3-knockdown (b,d) and PLS3-overexpression (c,e) Kasumi-1 cells were analyzed in proliferation assays over 7 days. (b,c) Show a growth curve over 7 days, (d,e) show the bar graphs of the relative cell growth on day 7. (f,g) The colony formation capacity of PLS3-knockdown (f) and PLS3-overexpression (g) Kasumi-1 cells were analyzed in colony formation assays over 7 days. \*  $p < 0.05$ .

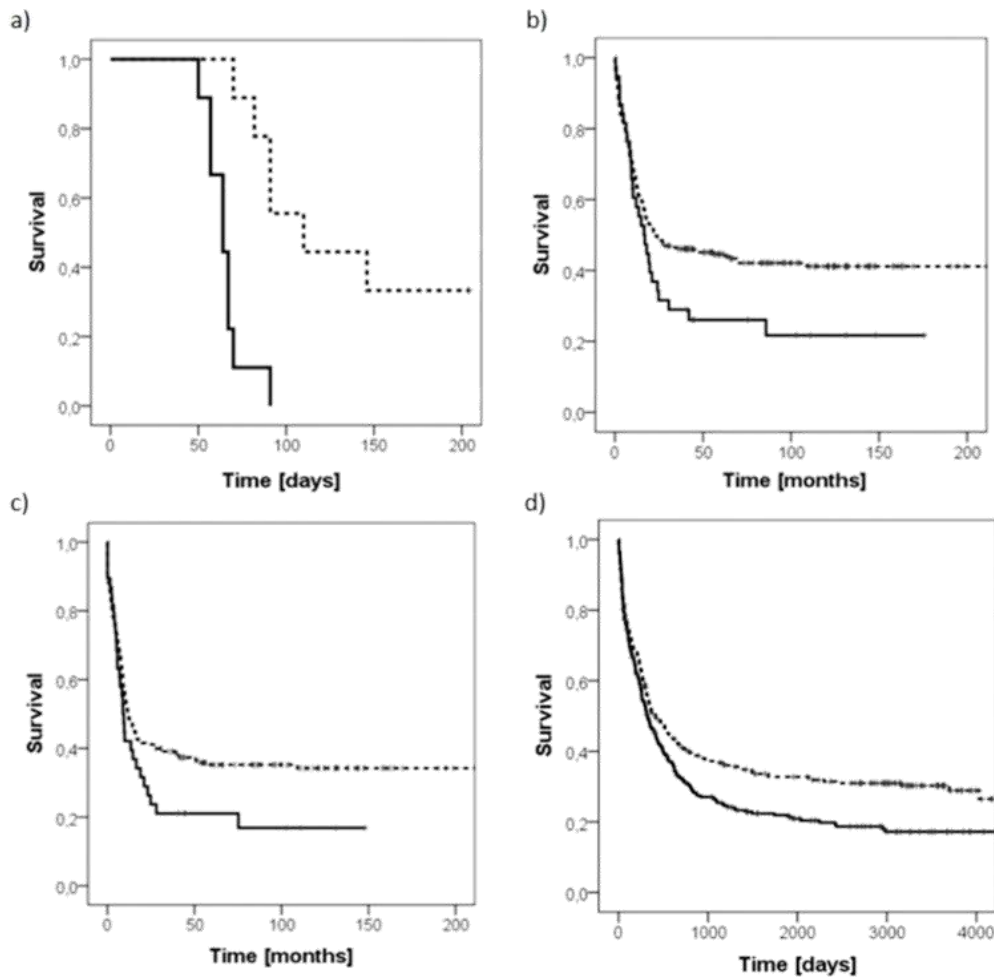
### 2.3. Knockdown of PLS3 Significantly Improves Survival In Vivo

To investigate the role of PLS3 in vivo, NSG mice were transplanted with the PLS3 knockdown Kasumi-1 cells. Compared to mice transplanted with Kasumi-1 control cells transduced with a vector carrying a scrambled shRNA, the PLS3 knockdown mice survived significantly longer (median survival time 64 vs. 110 days, respectively;  $p < 0.001$ ;  $n = 9$  mice per group; Figure 3a). Moreover, three animals of the PLS3 knockdown group did not show any signs of leukemia 200 days after transplantation of Kasumi-1 cells. Therefore, the experiment was terminated, and the three animals were sacrificed and analyzed for leukemic infiltration by flow cytometry. Remarkably, no tumors or leukemia infiltration in the peripheral blood, bone marrow, spleen or liver could be detected.

### 2.4. PLS3 Represents a Negative Prognostic Marker in AML

Finally, we investigated whether expression of PLS3 was associated with AML patients' outcome using published microarray-based gene expression data (GEO accession number GSE6891) [8]. Clinical data of 290 AML patients were available. Based on the mean gene expression value, the patient cohort was divided into high vs low PLS3 expressors. The overall survival and event-free survival was analyzed in a multivariate Cox proportional hazards model including PLS3 gene expression and the baseline parameters age, karyotype and FLT3 mutational status. After a stepwise removal of insignificant terms, the patient's age and a high PLS3 expression remained as independent prognostic markers for the overall survival (for PLS3:  $p = 0.028$ , HR 1.58 (CI 1.05–2.37) and for age:  $p = 0.036$ , HR 1.01 (CI 1.00–1.03)). Regarding the EFS, none of the analyzed factors remained significant in the multivariate analysis but PLS3 had the strongest impact and was borderline significant ( $p = 0.071$ , HR 1.39 (CI 0.97–2.09)). There was no significant difference regarding the distribution of high PLS3 expressors in FAB subtypes M1, M2, M4 or M5 although the frequency was slightly lower in subtypes

M2 and M4 (Table 1). Due to the low number of 20 cases in total, FAB subtypes M0, M3, M6 and M7 were excluded from the subgroup analysis.



**Figure 3.** High PLS3 expression is associated with a poor prognosis. (a) Kaplan–Meier survival curve of NSG mice transplanted with PLS3-knockdown (dashed line) or control Kasumi-1 cells (continuous line;  $n = 9$  mice per group;  $p < 0.001$ ). (b,c) A clear difference for high PLS3 expression (continuous line) versus low PLS3 expression (dashed line) on overall (OS) and event-free (EFS) survival was observed in a publicly available AML patient cohort ( $n = 293$ ;  $p = 0.062$  for OS and  $p = 0.067$  for EFS). (d) High PLS3 expression levels (continuous line) were associated with a poor overall survival in comparison to low PLS3 expression levels (dashed line) in a second independent AML patient cohort ( $n = 553$ ;  $p = 0.009$ ).

**Table 1.** Distribution of low vs. high PLS3 expressors in different FAB subtypes.

FAB Subtype	PLS3 (%)		Fisher’s Exact Test
	Low	High	
M1 ( $n = 67$ )	81	19	$p = 0.077$
M2 ( $n = 64$ )	94	6	
M4 ( $n = 59$ )	93	7	
M5 ( $n = 62$ )	97	13	

The negative prognostic impact of PLS3 could be verified in a second publicly available AML patient cohort where high PLS3 expression was associated with a poor overall survival ( $p = 0.009$ ;  $n = 553$  patients, GEO accession number GSE37642) [9]. The respective Kaplan–Meier survival curves are shown in Figure 3b–d.



### 3. Discussion

In the current study, the actin binding protein PLS3 was identified as potential player in acute myeloid leukemia. We found that high expression of PLS3 was associated with a poor overall and event-free survival for AML patients in two independent patient cohorts. These data are supported by our *in vitro* and *in vivo* experiments. Kasumi-1 cells with a shRNA-mediated PLS3 knockdown showed significantly reduced colony numbers *in vitro* while PLS3 overexpression resulted in significantly enhanced colony numbers compared to their respective controls. The clonogenicity of cancer cells mirrors their stem cell potential, which represents an important characteristic for the engraftment and establishment of cancer cells *in vivo*. In line with this consideration, the survival of NSG mice transplanted with the PLS3 knockdown cells was significantly prolonged in comparison to mice transplanted with the control Kasumi-1 cells. More importantly, three animals of the knockdown group did never develop a leukemia confirming our hypothesis that PLS3 is important for the leukemic engraftment.

The involvement of PLS3 in cancer biology was described in a number of studies. For example, in patients with Sezary syndrome, a leukemic and erythrodermic variant of cutaneous T cell lymphomas, upregulation of PLS3 has been observed which is in part due to the hypomethylation of the PLS3 promoter [10,11]. Furthermore, PLS3 was identified as negative prognostic marker in gastric cancer as patients with high PLS3 expression levels had a higher incidence of advanced tumor stage, cancer differentiation, tumor invasion depth, distant metastases and a significantly poorer prognosis than the low expression group. *In vitro*, gastric cancer cell lines transduced with PLS3 siRNA exhibited reduced migration and invasiveness [12]. Szkandera et al. could show that a common gene variant in PLS3 represents an independent prognostic marker in female patients with stage II and stage III colon cancer as the occurrence of the polymorphism was associated with a decreased time to recurrence [13]. Moreover, PLS3 expression was discovered as potential marker for circulating tumor cells undergoing epithelial-mesenchymal transition in a variety of cancers. PLS3 expression on circulating tumor cells was described in metastatic colorectal cancer patients. Furthermore, multivariate analysis showed that the occurrence of PLS3-positive circulating tumor cells was independently associated with the patients' prognosis [14]. In another study, PLS3 expression on circulating tumor cells could be linked to lymph node metastasis [15]. Ueo and colleagues observed PLS3 expression in circulating tumor cells of patients with breast cancer. Furthermore, the PLS3-positive patients showed significantly poorer overall and disease-free survival than PLS3-negative patients. Subset analysis revealed that this prognostic biomarker was relevant in patients with stage I-III cancer, particularly in patients with luminal-type and triple-negative-type tumors [16]. These observations, namely, the association with a poor outcome and expression in circulating tumor cells, indicate that PLS3 might be involved in the process of metastasis. This finding is of special interest as leukemic engraftment and maintenance of leukemia-initiating cells within their stem cell niche has presumably parallels to the process of metastasis of solid tumors.

Additionally, PLS3 was also associated with therapy resistance. For example, Ma and colleagues could show that PLS3 silencing in triple-negative breast cancer cells increased the sensitivity to paclitaxel via the p38 MAPK signaling cascade [17]. Furthermore, several studies indicate that PLS3 might be involved in the cellular response to DNA-damaging agents such as cisplatin. Cisplatin is an anticancer agent binding to DNA and interfering with DNA repair. Cisplatin-resistant cancer cell lines including bladder, prostate or head and neck cancer showed higher PLS3 levels compared to their parental cell lines. Furthermore, the reduction of PLS3 expression using antisense RNA in a bladder cancer cell line was associated with increased sensitivity to cisplatin [18]. Moreover, T-plastin was also upregulated in UV radiation-resistant cells [19]. In Chinese hamster ovary (CHO) cells with an X-radiation-induced G2 arrest, increased PLS3 expression was observed. The G2 arrest levels decreased upon downregulation of PLS3 indicating a correlation between PLS3 and G2/M cell-cycle control [20]. Resistance to chemotherapy might contribute to the poor outcome of the PLS3 high expressors in AML.

Mutations in PLS3 cause X-linked primary osteoporosis in men and furthermore, the occurrence of osteoporosis in elderly women after the menopause is associated with a rare single nucleotide polymorphism in PLS3. In line with these data, PLS3 knockout mice exhibit osteoporosis while PLS3 overexpressing mice show thickening of cortical bone due to disturbed osteoclast function. High PLS3 levels were associated with upregulation of the NF $\kappa$ B subunit p65 [21]. Interestingly, NF $\kappa$ B (comprised of subunits p65 and p50) is a potent transcriptional activator of the cMYC promoter and additionally inhibits the cMYC protein degradation [22,23]. The MYC oncogene contributes to the genesis of many human cancers and cMYC is an important prognostic factor in AML [24,25]. PLS3 might mediate its leukemia-promoting effects in our study at least partly through activation of cMYC.

As PLS3's functional role is not completely understood, we performed RNA sequencing analysis of the PLS3-knockdown cells. Although we reached a knockdown of more than 90%, only very few overlapping genes were found in the two different shRNAs targeting PLS3. The fasciculation and elongation zeta-1 protein (FEZ1) was one of those genes. FEZ1 is supposed to be a tumor suppressor in several cancer entities including bladder, breast or lung cancer [26–28]. But interestingly in leukemia, dysregulated FEZ1 might have opposing effects. Overexpression of FEZ1 in HEK293 and HeLa cells resulted in multi-lobulated nuclei as often observed in human leukemia cells [29]. Furthermore, it was shown that FEZ1 interacts with the retinoic acid receptor (RAR) thereby regulating the transcription of the HOXB4 gene [30]. HOXB4 has been implicated as a tumor-related gene in many cancer entities, including leukemia where it is also related to poor prognosis and chemoresistance [31–33]. MMRN1 which is a factor V/Va binding protein that might also be involved in extracellular matrix processes was also identified by RNA sequencing [34]. No functional relation to cancer biology is known, but MMRN1 was identified as negative prognostic marker in pediatric AML [35]. Additionally, the non-coding RNA RGMB-AS1 was downregulated in the PLS3-knockdown cells. RGMB-AS1's role in cancer is controversial. On the one hand, high RGMB-AS1 levels were associated with advanced clinical features in laryngeal squamous cell carcinoma and lung adenocarcinoma [36,37] while on the other hand it was identified as favorable prognostic marker in hepatocellular carcinoma [38]. Whether and how PLS3 is associated with one of the dysregulated genes or non-coding RNAs that have been identified by RNA sequencing should be investigated in further studies.

Taken together, we could identify the actin binding protein PLS3 as potential player for the establishment and maintenance of acute myeloid leukemia. Further studies should focus on the underlying leukemia-promoting molecular mechanisms and PLS3 should be investigated as therapeutic target.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Patients and Samples

Primary AML cells for in vitro experiments were obtained after patient's informed consent and approval of the study by the ethics committee (PV3469, Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg). Cells were isolated from bone marrow using density gradient centrifugation.

Furthermore, we analyzed two independent AML patient cohorts of whom microarray-based gene expression data was published by Verhaak et al. (cohort A,  $n = 290$  patients, data accessible at NCBI GEO database, accession GSE6891) and Li et al. (cohort B,  $n = 553$  patients, data accessible at NCBI GEO database, accession GSE37642), respectively [8,9]. For cohort A, patients were derived from a clinical study by Löwenberg et al. [39]. Patients aged between 15 and 60 years with newly diagnosed AML (APL excluded) received 3 cycles of standard chemotherapy. In a  $2 \times 2$  factorial design patients were randomized to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor either during chemotherapy only, after chemotherapy until recovery of blood counts, during both periods or none. Leukemia-specific outcome was independent of randomization. For cohort B, patients were enrolled into the German AMLCG 1999 trial. Patients received intensive standard induction chemotherapy

followed by either autologous stem cell transplantation or consolidation therapy plus 3 years of maintenance chemotherapy.

#### 4.2. Cell Culture

The human AML cell line Kasumi-1 was cultured in RPMI-1640 medium (Gibco) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS, Biochrom GmbH, Berlin, Germany). HEK293T cells were cultured in DMEM medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% FBS. All cells were maintained in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C.

#### 4.3. Reverse Transcription Quantitative PCR Analysis

Total RNA was extracted using the innuSPEED Tissue RNA Kit (Analytik Jena, Jena, Germany) and transcribed into cDNA using the PrimeScript RT Master Mix (Clontech, Madison, WI, USA). Exon-spanning primers for PLS3 and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were designed with Primer 3 software (Whitehead Institute for Biomedical Research, Boston, MA, USA). PLS and GAPDH primers were as follows: PLS3 forward 5'-attgtgctctgggtggaac-3', PLS3 reverse 5' acaggtcatcgggttaggg-3', GAPDH forward 5' gtcagtggggacactgacct 3', GAPDH reverse 5' tgctgtagccaaattcgttg-3'. Reverse transcription quantitative PCR analysis was carried out on the LightCycler 96 (Roche, Basel, Switzerland) using the SYBR Premix Ex Taq 2 Kit (Takara, Tokyo, Japan) over 40 PCR cycles. PCR efficiencies were calculated using a standard curve obtained from log dilutions of a positive cDNA sample. Samples were analyzed in triplicates and averaged. The relative mRNA expression of PLS3 was calculated using a method introduced by Pfaffl [40]. Expression of GAPDH served as reference gene.

#### 4.4. Immunofluorescence Staining

The whole leukemic mononuclear cell fraction of AML bone marrows was spun onto glass slides using the Rotofix 32A centrifuge (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany). Slides were fixed in 4% paraformaldehyde/PBS for 10 min, permeabilized in 0.1% Triton-X 100 for 5 min and then blocked for 60 min with 10% normal donkey serum. The primary PLS3 antibody (dilution 1:500, #PA5-27883; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was incubated overnight followed by incubation with a secondary AF488-conjugated donkey anti-rabbit IgG (1:400, #A21206, Invitrogen) for 1 h and staining with DAPI.

#### 4.5. Lentiviral Transduction of Kasumi-1 Cells with PLS3-Specific shRNA or a PLS3 Overexpression Construct

pLKO.1-puro vector encoding PLS3-targeting (sh1 sequence 5'-CCGGGCTCAGAACTTAGA CCGGATTCTCGAGAATCCCGTCTAAGTTCTGAGCTTTTTG-3' and sh2 sequence 5'-CCGGGC TGAGAGTATGCTTCAACAACCTCGAGTTGTTGAAGCATACTCTCAGCTTTTTG-3') or scrambled shRNA (negative control) were purchased from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany). The shRNA sequences were cloned into the LeGO vector system (a 3rd generation HIV1-derived lentiviral vector) as they carry fluorescent marker proteins allowing easy testing of transduction efficiencies ([www.LentiGO-Vectors.de](http://www.LentiGO-Vectors.de)) and genes for antibiotic resistance facilitating the selection of transduced cells. For the overexpression variants, a LeGO vector carrying the PLS3 coding sequence upstream or downstream of the GFP insert was constructed which resulted in a N-terminal (PLS3-GFP) and a C terminal (GFP-PLS3) PLS3 and GFP fusion construct, respectively. The GFP vector served as negative control.

HEK293T cells were used for the production of lentiviral particles that were harvested 24 h after transfection and added to Kasumi-1 cells. Transduced cells were selected by addition of puromycin (2 µg/mL; Sigma-Aldrich; for sh1-transduced and PLS3-GFP and GFP-PLS3 overexpression variants) or zeocin (2 µg/mL; Sigma-Aldrich; for sh2-transduced cells), respectively, for 4 days prior to functional assays. The knock-down and over-expression efficiency was analyzed in quantitative PCR analysis on day 4 of puromycin or zeocin selection. All work with lentiviral particles was done in a S2 facility after approval according to German law.

#### 4.6. Staining of F-Actin

AML cells grown on poly-L-lysine coated chamber slides (Ibidi) were fixed with 4% paraformaldehyde/PBS for 10 min at 37 °C. After washing the cells 3-times with PBS, they were incubated with Alexa-fluor 568-coupled phalloidin (Thermo Fisher Scientifics, Waltham, MA, USA), diluted 1:1000 in PBS, for 30 min at RT. Thereafter, the cells were washed again 3-times with PBS and stained with 4',6-Diamidino-2-phenylindole (1:2000 in PBS) for 5 min at RT. After final washing, fluorescence was analyzed by the Keyence BZ 9000 microscope.

#### 4.7. Proliferation Assays

Kasumi-1 cells with a PLS3 knockdown, PLS3 overexpression and their respective controls were seeded in triplicates in 24-well plates at a density of  $0.3 \times 10^6$  cells/mL. Cell numbers were determined on day 3 and day 7 using the cell viability analyzer Vi-Cell XR (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

#### 4.8. Colony Formation Assay

The colony formation capacity of AML cells with the PLS3 knockdown or overexpression was compared to their respective controls. AML cells were seeded in Methocult (Methocult H4230, Stemcell Technologies) at a density of 250 cells/mL. The number of colonies was counted after 7 days using an inverted microscope (Axiovert 25, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany).

#### 4.9. Xenograft Model

$1 \times 10^6$  Kasumi-1 PLS3 knockdown or scrambled-shRNA cells were intravenously transplanted into female NSG (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) mice, respectively (9 animals per group). Mice were sacrificed when showing clear symptoms of leukemia such as dramatic loss of weight, tumor weight, hypothermia or apathy. Three remaining mice in the control group showing no signs of leukemia, were sacrificed 200 days after transplantation and checked for leukemic infiltration in the peripheral blood, bone marrow, spleen and liver by flow cytometry using a human-specific CD45 antibody (Clone HI30, Biolegend, San Diego, CA, USA).

#### 4.10. RNA Sequencing

Total RNA was extracted from lentivirally transduced Kasumi-1 cells with RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), and opposing strand-specific library preparation was performed with the NEBNext Ultra II RNA directional Kit (New England Biolabs, Hoescht, Germany) and single read sequencing was performed using a NextSeq<sup>®</sup> 500 System (Illumina, San Diego, CA, USA) with a read length of 75 bp. Samples were demultiplexed (bcl2fastq2), quality controlled (FastQC) and groomed (FastQ groomer) using the Stanford Genetics Bioinformatics Service Center Galaxy platform (Stanford, CA, USA). Resulting reads were aligned to the human genome using the built-in hg19 reference genome utilizing STAR aligner. The aligned reads were transferred into SeqMonk 1.45 (Babraham Institute) and quantified using the built-in RNA quantification pipeline on merged transcripts of two different PLS3-shRNAs combined versus control shRNA. Differentially expressed genes (DEGs) were defined as significantly regulated merged transcripts by LIMMA analysis (FDR < 0.05, Benjamin–Hochberg correction).

#### 4.11. Statistics

All statistical analyses were done with SPSS 21 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and R 3.5.0 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) utilizing the BioConductor repository. Overall survival (OS) was defined as time from study inclusion to death. Event-free survival (EFS) was defined as time from study inclusion to any predefined event (first therapy failure, relapse or death). Kaplan–Meier survival curves were calculated for different categories and compared with log-rank tests. The mean PLS3 expression level was used to divide the cohort into low and high expressors. To identify those gene expressions with independent significant predictive power, gene expressions

were entered simultaneously into the same multivariable Cox model, and a backwards selection was applied. Differences in proliferation or colony forming capacities were accessed by Mann–Whitney U tests. For all analyses, a  $p$ -value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## 5. Conclusions

We could identify the actin binding protein PLS3 as potential player for the establishment and maintenance of acute myeloid leukemia. Further studies should focus on the underlying leukemia-promoting molecular mechanisms and PLS3 should be investigated as therapeutic target.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/11/11/1663/s1>, Figure S1. Knockdown and overexpression efficiency of PLS3 in Kasumi-1 cells. Table S1: Microarray data of PLS3 gene expression alteration in the co-culture condition; Table S2: Genes and non-coding RNAs down-regulated in the PLS3 knockdown cells.

**Author Contributions:** Conceptualization, W.F. and J.W.; funding acquisition, J.K.H. and J.W.; investigation, A.V., S.G., D.W. and S.W.; methodology, A.V., K.C., S.G., D.W. and S.W.; project administration, J.W.; resources, C.B. and M.H.; software, J.K.H.; supervision, K.C., H.S., S.W., W.F. and J.W.; validation, J.K.H. and J.W.; writing—original draft, W.F. and J.W.; writing—review and editing, A.V., K.C., J.K.H., S.G., H.S., D.W., C.B., M.H. and S.W.

**Funding:** This research was funded by the Carsten Bender Leukämienstiftung (J.W.) the Eppendorfer Krebs- und Leukämiehilfe e.V. (J.W. and J.K.H.) and the Roggenbuck-Stiftung (J.K.H.).

**Acknowledgments:** RNA sequencing was performed at the Core Facility Genomics at the University of Münster, Germany.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest for the current project.

## References

- Döhner, H.; Weisdorf, D.J.; Bloomfield, C.D. Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 1136–1152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Meads, M.B.; Gatenby, R.A.; Dalton, W.S. Environment-mediated drug resistance: A major contributor to minimal residual disease. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 665–674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bonnet, D.; Dick, J.E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* **1997**, *3*, 730–737. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cogle, C.R.; Bosse, R.C.; Brewer, T.; Migdady, Y.; Shirzad, R.; Kampen, K.R.; Saki, N. Acute myeloid leukemia in the vascular niche. *Cancer Lett.* **2016**, *380*, 552–560. [[CrossRef](#)]
- Delanote, V.; Vandekerckhove, J.; Gettemans, J. Plastins: Versatile modulators of actin organization in (patho)physiological cellular processes. *Acta Pharmacol. Sin.* **2005**, *26*, 769–779. [[CrossRef](#)]
- Lin, C.S.; Aebersold, R.H.; Kent, S.B.; Varma, M.; Leavitt, J. Molecular cloning and characterization of plastin, a human leukocyte protein expressed in transformed human fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **1988**, *8*, 4659–4668. [[CrossRef](#)]
- Giganti, A.; Plastino, J.; Janji, B.; Van Troys, M.; Lentz, D.; Ampe, C.; Sykes, C.; Friederich, E. Actin-filament cross-linking protein T-plastin increases Arp2/3-mediated actin-based movement. *J. Cell Sci.* **2005**, *118*, 1255–1265. [[CrossRef](#)]
- Verhaak, R.G.W.; Wouters, B.J.; Erpelinck, C.A.J.; Abbas, S.; Beverloo, H.B.; Lugthart, S.; Lowenberg, B.; Delwel, R.; Valk, P.J.M. Prediction of molecular subtypes in acute myeloid leukemia based on gene expression profiling. *Haematologica* **2009**, *94*, 131–134. [[CrossRef](#)]
- Li, Z.; Herold, T.; He, C.; Valk, P.J.M.; Chen, P.; Jurinovic, V.; Mansmann, U.; Radmacher, M.D.; Maharry, K.S.; Sun, M.; et al. Identification of a 24-gene prognostic signature that improves the European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: An international collaborative study. *J. Clin. Oncol.* **2013**, *31*, 1172–1181. [[CrossRef](#)]
- Jones, C.L.; Ferreira, S.; McKenzie, R.C.T.; Tosi, I.; Caesar, J.A.; Bagot, M.; Whittaker, S.J.; Mitchell, T.J. Regulation of T-plastin expression by promoter hypomethylation in primary cutaneous T-cell lymphoma. *J. Investig. Dermatol.* **2012**, *132*, 2042–2049. [[CrossRef](#)]
- Henn, A.; Michel, L.; Fite, C.; Deschamps, L.; Ortonne, N.; Ingen-Housz-Oro, S.; Marinho, E.; Beylot-Barry, M.; Bagot, M.; Laroche, L.; et al. Sézary syndrome without erythroderma. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2015**, *72*, 1003–1009.e1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

12. Kurashige, J.; Yokobori, T.; Mima, K.; Sawada, G.; Takahashi, Y.; Ueo, H.; Takano, Y.; Matsumura, T.; Uchi, R.; Eguchi, H.; et al. Plastin3 is associated with epithelial-mesenchymal transition and poor prognosis in gastric cancer. *Oncol. Lett.* **2019**, *17*, 2393–2399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Szkandera, J.; Winder, T.; Stotz, M.; Weissmueller, M.; Langsenlehner, T.; Pichler, M.; Samonigg, H.; Renner, W.; Gerger, A.; Absenger, G. A common gene variant in PLS3 predicts colon cancer recurrence in women. *Tumour Biol.* **2013**, *34*, 2183–2188. [[CrossRef](#)]
14. Yokobori, T.; Iinuma, H.; Shimamura, T.; Imoto, S.; Sugimachi, K.; Ishii, H.; Iwatsuki, M.; Ota, D.; Ohkuma, M.; Iwaya, T.; et al. Plastin3 is a novel marker for circulating tumor cells undergoing the epithelial-mesenchymal transition and is associated with colorectal cancer prognosis. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 2059–2069. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Kujawski, R.; Przybyłowska-Sygut, K.; Mik, M.; Lewandowski, M.; Trzciński, R.; Berut, M.; Dziki, Ł.; Majsterek, I.; Dziki, A. Expression of the PLS3 Gene in Circulating Cells in Patients with Colorectal Cancer. *Pol. Przegl. Chir.* **2015**, *87*, 59–64. [[CrossRef](#)]
16. Ueo, H.; Sugimachi, K.; Gorges, T.M.; Bartkowiak, K.; Yokobori, T.; Müller, V.; Shinden, Y.; Ueda, M.; Ueo, H.; Mori, M.; et al. Circulating tumour cell-derived plastin3 is a novel marker for predicting long-term prognosis in patients with breast cancer. *Br. J. Cancer* **2015**, *112*, 1519–1526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Ma, Y.; Lai, W.; Zhao, M.; Yue, C.; Shi, F.; Li, R.; Hu, Z. Plastin 3 down-regulation augments the sensitivity of MDA-MB-231 cells to paclitaxel via the p38 MAPK signalling pathway. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2019**, *47*, 685–695. [[CrossRef](#)]
18. Hisano, T.; Ono, M.; Nakayama, M.; Naito, S.; Kuwano, M.; Wada, M. Increased expression of T-plastin gene in cisplatin-resistant human cancer cells: Identification by mRNA differential display. *FEBS Lett.* **1996**, *397*, 101–107. [[CrossRef](#)]
19. Higuchi, Y.; Kita, K.; Nakanishi, H.; Wang, X.L.; Sugaya, S.; Tanzawa, H.; Yamamori, H.; Sugita, K.; Yamaura, A.; Suzuki, N. Search for genes involved in UV-resistance in human cells by mRNA differential display: Increased transcriptional expression of nucleophosmin and T-plastin genes in association with the resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *248*, 597–602. [[CrossRef](#)]
20. Sasaki, Y.; Itoh, F.; Kobayashi, T.; Kikuchi, T.; Suzuki, H.; Toyota, M.; Imai, K. Increased expression of T-fimbrin gene after DNA damage in CHO cells and inactivation of T-fimbrin by CpG methylation in human colorectal cancer cells. *Int. J. Cancer* **2002**, *97*, 211–216. [[CrossRef](#)]
21. Neugebauer, J.; Heilig, J.; Hosseinibarkooie, S.; Ross, B.C.; Mendoza-Ferreira, N.; Nolte, F.; Peters, M.; Hölker, I.; Hupperich, K.; Tschanz, T.; et al. Plastin 3 influences bone homeostasis through regulation of osteoclast activity. *Hum. Mol. Genet.* **2018**, *27*, 4249–4262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. La Rosa, F.A.; Pierce, J.W.; Sonenshein, G.E. Differential regulation of the c-myc oncogene promoter by the NF-kappa B rel family of transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* **1994**, *14*, 1039–1044. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Huang, H.; Ma, L.; Li, J.; Yu, Y.; Zhang, D.; Wei, J.; Jin, H.; Xu, D.; Gao, J.; Huang, C. NF-κB1 inhibits c-Myc protein degradation through suppression of FBW7 expression. *Oncotarget* **2014**, *5*, 493–505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Dang, C. V MYC on the path to cancer. *Cell* **2012**, *149*, 22–35. [[CrossRef](#)]
25. Ohanian, M.; Rozovski, U.; Kanagal-Shamanna, R.; Abruzzo, L.V.; Loghavi, S.; Kadia, T.; Futreal, A.; Bhalla, K.; Zuo, Z.; Huh, Y.O.; et al. MYC protein expression is an important prognostic factor in acute myeloid leukemia. *Leuk. Lymphoma* **2019**, *60*, 37–48. [[CrossRef](#)]
26. Vecchione, A.; Ishii, H.; Baldassarre, G.; Bassi, P.; Trapasso, F.; Alder, H.; Pagano, F.; Gomella, L.G.; Croce, C.M.; Baffa, R. FEZ1/LZTS1 is down-regulated in high-grade bladder cancer, and its restoration suppresses tumorigenicity in transitional cell carcinoma cells. *Am. J. Pathol.* **2002**, *160*, 1345–1352. [[CrossRef](#)]
27. Chen, L.; Zhu, Z.; Sun, X.; Dong, X.-Y.; Wei, J.; Gu, F.; Sun, Y.-L.; Zhou, J.; Dong, J.-T.; Fu, L. Down-regulation of tumor suppressor gene FEZ1/LZTS1 in breast carcinoma involves promoter methylation and associates with metastasis. *Breast Cancer Res. Treat.* **2009**, *116*, 471–478. [[CrossRef](#)]
28. Toyooka, S.; Fukuyama, Y.; Wistuba, I.I.; Tockman, M.S.; Minna, J.D.; Gazdar, A.F. Differential expression of FEZ1/LZTS1 gene in lung cancers and their cell cultures. *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 2292–2297.
29. Lanza, D.C.F.; Trindade, D.M.; Assmann, E.M.; Kobarg, J. Over-expression of GFP-FEZ1 causes generation of multi-lobulated nuclei mediated by microtubules in HEK293 cells. *Exp. Cell Res.* **2008**, *314*, 2028–2039. [[CrossRef](#)]

30. Bertini Teixeira, M.; Figueira, A.C.M.; Furlan, A.S.; Aquino, B.; Alborghetti, M.R.; Paes Leme, A.F.; Wei, L.-N.; Kobarg, J. Fasciculation and elongation zeta-1 protein (FEZ1) interacts with the retinoic acid receptor and participates in transcriptional regulation of the *Hoxb4* gene. *FEBS Open Bio* **2018**, *8*, 4–14. [[CrossRef](#)]
31. Zhang, X.-B.; Beard, B.C.; Trobridge, G.D.; Wood, B.L.; Sale, G.E.; Sud, R.; Humphries, R.K.; Kiem, H.-P. High incidence of leukemia in large animals after stem cell gene therapy with a HOXB4-expressing retroviral vector. *J. Clin. Investig.* **2008**, *118*, 1502–1510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Bodey, B.; Bodey, B.; Siegel, S.E.; Kaiser, H.E. Immunocytochemical detection of the homeobox B3, B4, and C6 gene products in breast carcinomas. *Anticancer Res.* **2000**, *20*, 3281–3286. [[PubMed](#)]
33. Wang, H.; Jia, X.-H.; Chen, J.-R.; Yi, Y.-J.; Wang, J.-Y.; Li, Y.-J.; Xie, S.-Y. HOXB4 knockdown reverses multidrug resistance of human myelogenous leukemia K562/ADM cells by downregulating P-gp, MRP1 and BCRP expression via PI3K/Akt signaling pathway. *Int. J. Oncol.* **2016**, *49*, 2529–2537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Jeimy, S.B.; Tasneem, S.; Cramer, E.M.; Hayward, C.P.M. Multimerin 1. *Platelets* **2008**, *19*, 83–95. [[CrossRef](#)]
35. Laszlo, G.S.; Alonzo, T.A.; Gudgeon, C.J.; Harrington, K.H.; Gerbing, R.B.; Wang, Y.-C.; Ries, R.E.; Raimondi, S.C.; Hirsch, B.A.; Gams, A.S.; et al. Multimerin-1 (MMRN1) as Novel Adverse Marker in Pediatric Acute Myeloid Leukemia: A Report from the Children’s Oncology Group. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 3187–3195. [[CrossRef](#)]
36. Xu, Z.; Xi, K. LncRNA RGMB-AS1 promotes laryngeal squamous cell carcinoma cells progression via sponging miR-22/NLRP3 axis. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *118*, 109222. [[CrossRef](#)]
37. Li, P.; Zhang, G.; Li, J.; Yang, R.; Chen, S.; Wu, S.; Zhang, F.; Bai, Y.; Zhao, H.; Wang, Y.; et al. Long Noncoding RNA RGMB-AS1 Indicates a Poor Prognosis and Modulates Cell Proliferation, Migration and Invasion in Lung Adenocarcinoma. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0150790. [[CrossRef](#)]
38. Sheng, N.; Li, Y.; Qian, R.; Li, Y. The clinical significance and biological function of lncRNA RGMB-AS1 in hepatocellular carcinoma. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *98*, 577–584. [[CrossRef](#)]
39. Löwenberg, B.; Boogaerts, M.A.; Daenen, S.M.; Verhoef, G.E.; Hagenbeek, A.; Vellenga, E.; Ossenkoppele, G.J.; Huijgens, P.C.; Verdonck, L.F.; van der Lelie, J.; et al. Value of different modalities of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor applied during or after induction therapy of acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* **1997**, *15*, 3496–3506. [[CrossRef](#)]
40. Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, e45. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 2. Darstellung der Publikation mit Literaturverzeichnis

### 2.1 Einleitung

Diese Dissertation beschäftigt sich mit dem Einfluss des Aktinbindeproteins Plastin-T (PLS3) auf die Pathogenese und den Krankheitserhalt der akuten myeloischen Leukämie (AML). Die in diesem Rahmen erhobenen Daten haben auch zu der Publikation „The Actin Binding Protein Plastin-3 Is Involved in the Pathogenesis of Acute Myeloid Leukemia“ (Velthaus et al. 2019) beigetragen.

Als Krankheit, deren Prognose insbesondere aufgrund von Rückfällen trotz neuer therapeutischer Möglichkeiten deutlich eingeschränkt sein kann, bedarf es bei der AML dringend weiterer therapeutischer Optionen. Hierfür ist eine bessere Einsicht in die Ursachen der therapieresistenten Verläufe von großer Bedeutung.

Therapieresistente AML-Zellen können in der sogenannten Knochenmarksnische überdauern, wo sie durch komplexe Interaktionen mit dem umliegenden Stromazellen (Bonnet und Dick 1997) von äußeren Einflüssen geschützt sind (Cogle et al. 2016). Diese werden als Ursache für eine minimale residuelle Resterkkrankung (minimal residual disease, MRD) angesehen (Döhner et al. 2015; Meads et al. 2009), die in der Folge mit der Möglichkeit der Wiederausbreitung der AML-Zellen und damit einem Rückfall der AML einhergeht. Deshalb stellt die Erforschung der dafür relevanten Signalkaskaden mit der Identifizierung entsprechender involvierter Proteine einen wichtigen Baustein dar, um die Pathogenese der AML und ihrer Rückfälle besser zu verstehen und neue therapeutische Ansätze zu entwickeln.

Basierend auf Genexpressionsanalysen von Co-Kulturen zwischen AML-Zellen und Endothelzellen als Stellvertreter für die Zellen der Knochenmarksnische wurde PLS3 als dysreguliertes Gen identifiziert, welches einen möglichen Mediator der Signalkaskaden, die in dieser Umgebung stattfinden, darstellt. In dieser Dissertation wurde der Einfluss von PLS3 auf AML näher untersucht.

PLS3 gehört zur Familie der Plastine. Hierbei handelt es sich um Aktinbindeproteine, die in der Lage sind, Aktinfasern zu bündeln und zu vernetzen. Von ihnen wurden in Säugetieren drei Isoformen identifiziert: I-Plastin (PLS1), das hauptsächlich im Verdauungstrakt und in der Niere vorkommt, L-Plastin (PLS2), welches sich vorwiegend in hämatopoetischen Zellen findet und T-Plastin (PLS3), das normalerweise in nicht-hämatopoetischen Zellen vorliegt (Delanote et al. 2005; Lin et al. 1988). Außerdem wird eine Rolle des PLS3 bei der Synthese von Aktinfilamenten sowie deren Stabilisierung und Abbau diskutiert (Giganti et al. 2005).

Es sind verschiedene Krankheiten bekannt, bei denen PLS3 eine Rolle spielt. So führt z.B. eine hemizygote PLS3-Mutation zu erhöhter Knochenfragilität und dem Bild einer idiopathischen juvenilen Osteoporose (Fahiminiya et al. 2014). Eine erhöhte PLS3-Expression kann im Mausmodell bei spinaler Muskelatrophie (SMA) das Auswachsen und die Länge der Axone wiederherstellen (Opera et al. 2008). Darüber hinaus existiert eine Reihe von Tumorentitäten, in denen PLS3 exprimiert wird und teilweise einen negativen prognostischen Faktor darstellt (Hisano et al. 1996; Kurashige et al. 2019). Es wurde weiterhin gezeigt, dass PLS3 in zirkulierenden Tumorzellen (circulating tumor cells, CTCs) exprimiert wird, die eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) durchlaufen und die das Potential haben, Metastasen zu bilden (Ueo et al. 2015; Yokobori et al. 2013).



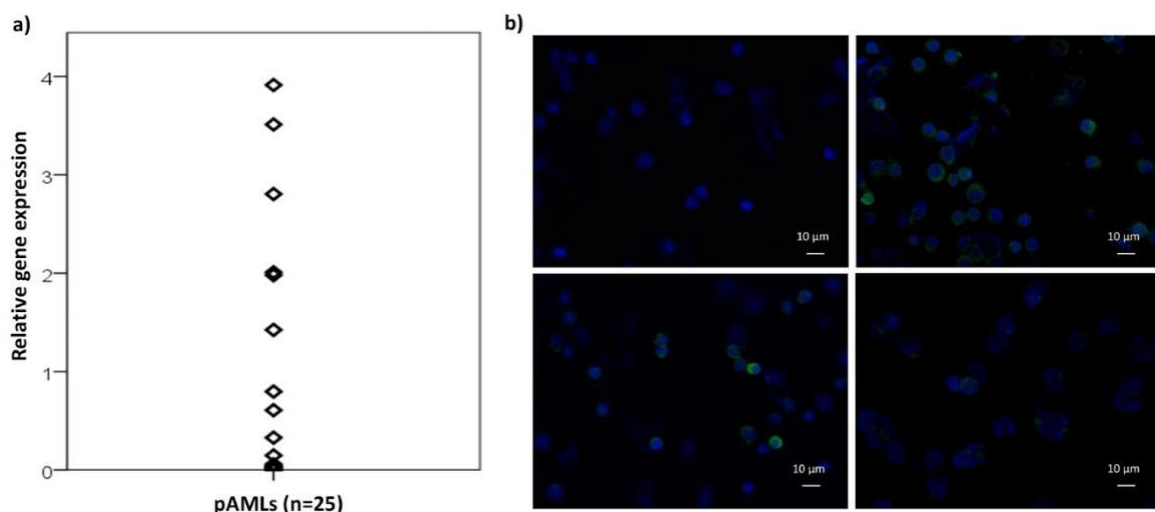
## 2.2 Ergebnisse

### 2.2.1 PLS3-Expression in AML-Zellen

Um Gene zu identifizieren, die an der Pathogenese der AML und im Speziellen an den Signalkaskaden in der Knochenmarksnische zur Entstehung einer tumorbegünstigenden Mikroumgebung beteiligt sind, wurden Co-Kulturen mit primären AML- und primären Endothelzellen einerseits und CD34-positiven hämatopoetischen Vorläuferzellen von gesunden Spendern und Endothelzellen andererseits durchgeführt. So sollten die in der Knochenmarksnische herrschenden Bedingungen im Gesunden und bei AML modellhaft nachgeahmt werden, um einen Vergleich der Genexpression von AML-Zellen nach Interaktion mit Stromazellen mit der der entsprechenden gesunden hämatopoetischen Progenitorzellen zu ermöglichen.

PLS3 zeigte in der folgenden Microarray-Analyse (Human Gene 2.0 ST Array, Affymetrix, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) eine signifikant erhöhte Expression in AML-Zellen nach Co-Kultur im Vergleich zur Monokultur, während die PLS3-Expression in den CD34-positiven hämatopoetischen Vorläuferzellen von gesunden Spendern unverändert blieb. Daraufhin wurden verschiedene AML-Zelllinien mittels quantitativer Realtime-PCR (RT-qPCR) auf ihre PLS3-Expression untersucht. Hier zeigte sich lediglich in Kasumi-1-Zellen eine deutliche PLS3-Expression. In THP1-Zellen wurde nur eine geringe Expression, in 10 weiteren Zelllinien keine relevante PLS3-Expression nachgewiesen, sodass in der Folge der Fokus auf die Untersuchung von Kasumi-1 gelegt wurde, was die funktionelle Bedeutung dieser erhöhten PLS3-Expression betrifft.

In den primären AML-Zellen aus Knochenmarksbiopsien von 25 AML Patienten lag in etwa der Hälfte der Fälle eine PLS3-Expression vor (Abbildung 1a). Auf Proteinebene wurde die PLS3-Expression in primären AML-Zellen zusätzlich durch Immunfluoreszenzdarstellung nachgewiesen (n = 9, Abbildung 1b).



[Abbildung 1]

Expression von PLS3 in primären AML-Proben. (a) Die PLS3 mRNA-Expression von primären AML-Proben wurde mittels quantitativer Real-Time-PCR (RT-qPCR) ermittelt und auf GAPDH normalisiert. Die relative Expression ist im Vergleich zu Kasumi-1-Zellen dargestellt (diese haben den Wert 1). (b) Die PLS3-Proteinexpression in primären AML-Proben wurde mittels Immunfluoreszenz analysiert

(grün dargestellt). Der Abschnitt oben links zeigt die Negativkontrolle ohne primären Antikörper, während die Abschnitte unten links und die auf der rechten Seite die Färbung von 3 primären AML-Proben mit unterschiedlicher PLS-Expression zeigen. Aus Velthaus et al. (2019)

## 2.2.2 Funktionelle Analyse von PLS3-Knockdown und -Hochregulierung in Kasumi-1-Zellen

Um die funktionelle Bedeutung von PLS3 in AML-Zellen näher zu beleuchten, wurden einerseits mittels zweier PLS3-komplementärer Short-Hairpin-RNAs (shRNAs, PLS3-shRNA1 und PLS3-shRNA2) PLS3-Knockdown-Kasumi-1-Zellen und andererseits mittels lentiviraler Transduktion eines Überexpressionsvektors mit einem jeweils N-terminalen (PLS3-GFP) oder C-terminalen (GFP-PLS3) PLS3-GFP-Fusionskonstrukt PLS3 überexprimierende Kasumi-1-Zellen hergestellt. Die PLS3-Expression wurde daraufhin mittels RTqPCR überprüft und es zeigte sich eine ca. 80% bzw. 90% geringere Expression in den Knockdown-Zellen sowie eine 18- bzw. 35-fach erhöhte PLS3-Expression in den PLS3-hochregulierten Zellen.

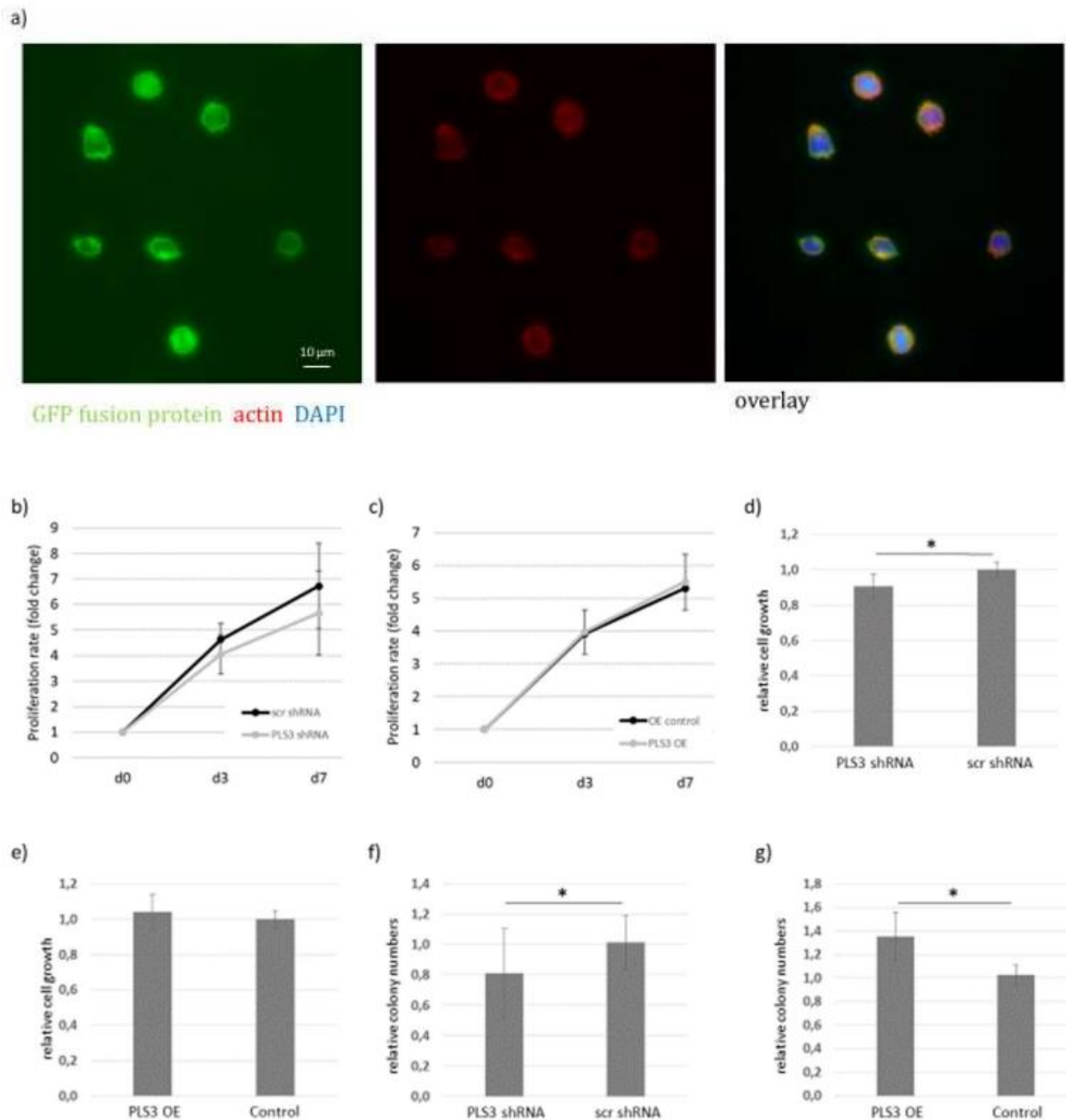
Das Vorhandensein von PLS3 in den Kasumi-1-Zellen wurde daraufhin fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht und es wurde insbesondere die räumliche Überlagerung von PLS3 als Aktinbindeprotein zu F-Aktinfasern überprüft, welche in Abbildung 2a deutlich dargestellt ist.

Im Weiteren wurde die Fähigkeit der Kasumi-1-Zellen zu proliferieren untersucht. Die PLS3-Knockdown-Zellen wiesen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollzellen eine geringere Proliferationsaktivität nach 7 Tagen im Nährmedium auf. Die PLS3 überexprimierenden Zellen zeigten ein etwas, jedoch nicht signifikant gesteigertes Zellwachstum (Abbildung 2b-e).

Um die Fähigkeit der Zellen, leukämische Nachfolgerzellen zu bilden, zu untersuchen, wurden Kolonieformations-Assays in semisolidem, methylzellulosebasiertem Medium durchgeführt. Diese Methode impliziert die Fähigkeit einer AML-Zelle neue Abkömmlinge von sich zu bilden. Dazu wurden PLS3-Knockdown-Zellen und PLS3-Überexpressionszellen in oben genanntem Medium ausgesät und die entstandenen Zellkolonien nach 7 – 10 Tagen gezählt und mit den der jeweiligen Zellreihe entsprechenden Kontrollzellen verglichen. Hier wurden signifikant geringere Koloniezahlen der PLS3-Knockdown-Zellen festgestellt. Gleichzeitig wiesen die PLS3-Überexpressionszellen eine erhöhte Kolonieformationsfähigkeit im Vergleich zu den mit einem Kontrollvektor transduzierten Kasumi-1-Zellen auf (Abbildung 2f,g).

Des Weiteren sollten mögliche Mitspieler in den zugrunde liegenden Signalkaskaden der eben dargestellten Effekte identifiziert werden. Zu diesem Zweck wurde eine vollständige RNA-Sequenzierung der PLS3-Knockdown-Kasumi-1 (PLS3-shRNA1 Kasumi-1; PLS3-shRNA2 Kasumi-1) angefertigt und die Genexpression mit entsprechenden Kontrollzellen verglichen. Erstaunlicherweise fand sich hierbei eine lediglich moderate Änderung der Genexpression. Nach Anpassen des p-Wertes auf  $p < 0,1$  zeigten zehn Gene sowie zwei nicht kodierende RNA-Sequenzen eine veränderte Expression in beiden Knockdown-Varianten im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen. Darunter waren das Faszikulations- und Elongationsprotein Zeta (FEZ1), Multimerin 1 (MMRN1), und antisense RNA 1 (RGMB-AS1). Zusätzlich wurden öffentlich verfügbare Genexpressionsdaten einer großen Kohorte von AML-Patienten (GEO Zugangsnummer GSE6891) mittels Pearson-Korrelation (Verhaak et al. 2009) analysiert, um festzustellen, ob gemeinsame mit hoher PLS3-Expression korrelierende

Genexpressionsveränderungen bestehen. Es wurden für ENPP3, KIAA1751, MMRN1, POU4F3, RSPH10B und RGMB-AS1 signifikante, mit hoher PLS3-Expression korrelierende Expressionsveränderungen ermittelt.



[Abbildung 2]

Funktionale in vitro Analysen mit PLS3-Knockdown- und -Überexpressions Kasumi-1-Zellen. (a) In GFP-PLS3-Überexpressionszellen wurde die Co-Lokalisierung von PLS3 und F-Aktin untersucht. F-Aktin wurde mit Alex-fluor568-konjugiertem Phalloidin markiert (rot). (b-e) Die Proliferation von PLS3-Knockdown- (PLS3 shRNA) (b,d) und PLS3-Überexpressions- (PLS3 OE = overexpression) Kasumi-1-Zellen wurde in Proliferationsassays über 7 Tage analysiert. (b,c) zeigen eine Wachstumskurve über 7 Tage, (d,e) zeigen Balkendiagramme des relativen Zellwachstums an Tag 7. (f,g) Die Kolonieformationskapazität von PLS3-Knockdown- (f) und PLS3-Überexpressions- (g) Kasumi-1-Zellen wurde in Kolonieformations-Assays über 7 Tage beobachtet. \* $p < 0,05$  Aus Velthaus et al. (2019).

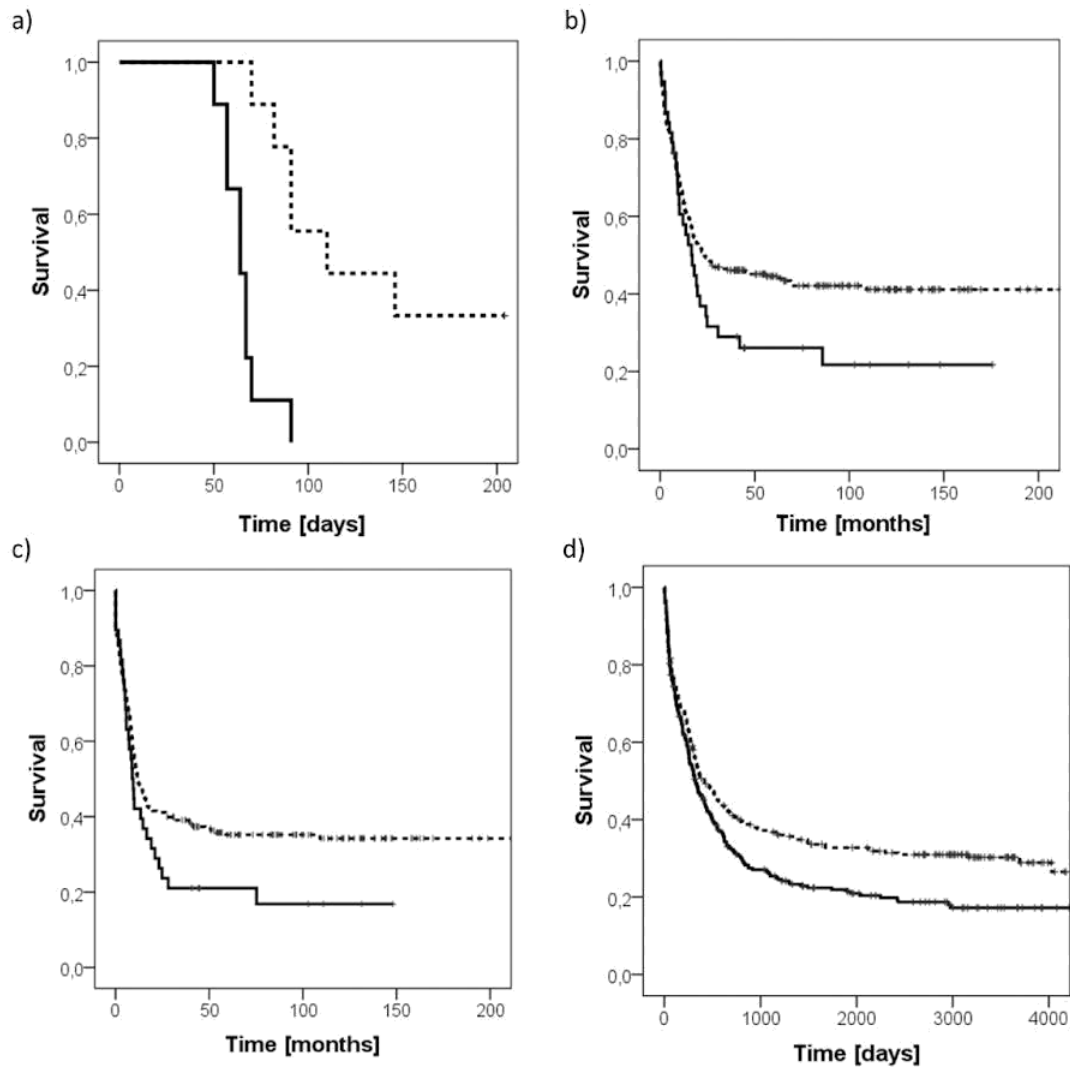
### 2.2.3 In Vivo Experiment mit NSG Mäusen

Aufgrund des Nachweises eines Effekts von PLS3 auf die Funktionalität von AML-Zellen in vitro sollte ein möglicher Einfluss in vivo überprüft werden. Dazu wurden Knockdown-Kasumi-1-Zellen und Kasumi-1-Zellen, die mit einem Kontrollvektor, der eine scrambled-shRNA trug, transduziert worden waren, in immundefiziente NSG-Mäuse (n=9 pro Gruppe) implantiert und das Überleben, sowie die Entwicklung leukämischer Symptome beobachtet. In Übereinstimmung mit den in vitro Experimenten zeigten die Mäuse, denen PLS3-Knockdown-Kasumi-1 implantiert worden waren, ein signifikant längeres Überleben (medianes Überleben 64 bzw. 110 Tage;  $p < 0,001$ ; Abbildung 3a). Drei der untersuchten Tiere entwickelten sogar keinerlei Krankheitssymptome und wurden schließlich getötet, um leukämische Herde zu identifizieren, die sich interessanterweise mittels durchflusszytometrischer Untersuchung nicht fanden.

### 2.2.4 PLS3 als negativer prognostischer Marker in AML-Patienten

Zuletzt wurde überprüft, ob auch in AML-Patienten eine hohe PLS3-Expression zu einem geringeren Überleben führt. Dazu wurden bereits veröffentlichte, microarray-basierte Genexpressionsdaten von 290 AML Patienten (GEO Zugangsnummer GSE6891) analysiert (Verhaak et al. 2009). Diese Kohorte wurde in eine Gruppe mit hoher PLS3-Expression und eine mit niedriger PLS3-Expression geteilt und bezüglich des Gesamtüberlebens (overall survival, OS) bzw. des ereignisfreien Überlebens (event free survival, EFS) untersucht. Zusätzlich gingen bekannte Einflussfaktoren, wie Karyotyp, der FLT3-Mutationsstatus und das Alter in die durchgeführte Cox-Regression mit ein. Nach schrittweisem Herausrechnen von nicht signifikanten Einflussfaktoren blieben eine hohe PLS3-Expression und das Alter als alleinige, signifikante Prognosefaktoren für das Gesamtüberleben übrig. Bezüglich des EFS hatte der Grad der PLS3-Expression den größten Einfluss, ohne dass es statistisch signifikante Prognosefaktoren gab. Unter den FAB-Subtypen M1, M2, M4 oder M5 wurden hinsichtlich der Verteilung von Patienten mit hoher PLS3-Expression keine signifikanten Unterschiede gefunden (Tabelle 1). Aufgrund zu geringer Fallzahlen in der untersuchten Kohorte wurden die FAB-Subtypen M0, M3, M6 und M7 nicht herangezogen.

Die Untersuchung einer weiteren öffentlich verfügbaren AML-Patientenkohorte bestätigte den negativen prognostischen Einfluss von PLS3. Auch hier war eine hohes PLS3-Expressionslevel mit einem geringeren Gesamtüberleben vergesellschaftet ( $p=0,009$ ; n=553 Patienten, GEO Aufrufnummer GSE37642; Abbildung 3b-d) (Li et al. 2013).



[Abbildung 3]

Eine hohe PLS3-Expression ist mit schlechterer Prognose assoziiert. (a) Kaplan-Meier-Kurven von NSG-Mäusen, denen PLS3-Knockdown- (gestrichelte Linie) oder Kontroll-Kasumi-1-Zellen (durchgezogene Linie;  $n=9$  Mäuse pro Gruppe;  $p < 0,001$ ) transplantiert wurden. (b,c) Es wurde ein deutlicher Unterschied für hohe PLS3-Expression (durchgezogene Linie) gegenüber einer niedrigen PLS3-Expression (gestrichelte Linie) bezüglich des OS und EFS in einer öffentlich verfügbaren AML-Patientenkohorte ( $n=293$ ;  $p=0,062$  für OS und  $p=0,067$  für EFS) festgestellt. (d) Hohe PLS3-Expressionslevel (durchgezogene Linie) waren assoziiert mit schlechtem Gesamtüberleben im Vergleich zu niedrigen PLS3-Expressionslevel (gestrichelte Linie) in einer weiteren unabhängigen AML-Patientenkohorte ( $n=553$ ;  $p=0,009$ ). Aus Velthaus et al. (2019).

[Tabelle 1]

Verteilung von PLS3-hoch- oder niedrigexprimierenden Patienten anhand verschiedener FAB-Subtypen. Aus Velthaus et al. (2019).

FAB-Subtyp	PLS3 (%)		exakter Test nach Fischer
	niedrigexprimierend	hochexprimierend	
M1 (n = 67)	81	19	p = 0,077
M2 (n = 64)	94	6	
M4 (n = 59)	93	7	
M5 (n = 62)	97	3	

### 2.3 Diskussion

Die dargestellten Ergebnisse haben gezeigt, dass PLS3 ein möglicher Einflussfaktor auf AML-Zellen und die akute myeloische Leukämie an sich ist. Kasumi-1-Zellen, bei denen ein Knockdown von PLS3 durchgeführt wurde, zeigten eine geringere Proliferationsfähigkeit im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollzellen, während PLS3 überexprimierende Kasumi-1-Zellen eine leicht - wenn auch nicht signifikant - höhere Proliferationsfähigkeit aufwiesen. Wichtiger ist jedoch, dass bezüglich der Klonogenität, die mithilfe der Kolonieformations-Assays untersucht wurde, die PLS3-Überexpressionszellen gegenüber den mit PLS3-shRNA behandelten Zellen eine signifikant erhöhte Fähigkeit besaßen, Abkömmlinge zu bilden. Ein Prozess, der sowohl auf die Stammzellefähigkeit einer Zelle schließen lässt als auch für das Niederlassen und Anwachsen von Tumorzellen in vivo eine entscheidende Rolle spielt. Dazu passend wurde gezeigt, dass NSG-Mäuse, denen PLS3-Knockdown-Kasumi-1-Zellen transplantiert wurden, nicht nur ein signifikant längeres Überleben aufwiesen als die Tiere, denen entsprechend die Kontrollzellen injiziert worden waren, sondern dass drei der Tiere im Verlauf des Experimentes überhaupt keine Krankheitssymptome entwickelten. Dies lässt die These zu, dass hier aufgrund der PLS3-Unterdrückung kein Anwachsen der AML-Zellen stattgefunden hat. Schließlich konnte nachgewiesen werden, dass PLS3 auch im Menschen eine wichtige Rolle spielt, was dadurch gezeigt wurde, dass in den beiden untersuchten Patientenkohorten eine hohe PLS3-Expression direkt mit einem schlechten Gesamt- und krankheitsfreien Überleben (disease free survival, DFS) der AML-Patienten korrelierte.

Ein Einfluss von PLS3 auf das Wachstum, die Ausbreitung und den Krankheitsverlauf im Generellen wurde bereits in einigen Studien für verschiedene Tumorentitäten beschrieben. So zeigten Dulmage und Geskin, dass kutane T-Zell-Lymphom-Zellen mit geringerer PLS3-Expression eine geringere Motilität und gleichzeitig eine höhere Apoptoserate aufweisen als die Zellen mit hoher PLS3-Expression (Dulmage and Geskin 2013). In einigen Patienten mit Sézary-Syndrom, einer leukämischen, erythrodermen Form des kutanen T-Zell-Lymphoms, wurde gezeigt, dass durch Hypomethylierung der PLS3-Promotorregion dessen Expression hochreguliert war (Henn et al. 2015; Jones et al. 2012; Wong et al. 2015) und dass das PLS3-Expressionslevel mit der Krankheitsschwere des Sézary-Syndroms korreliert (Tang et al. 2010). Bei Magenkrebspatienten konnte eine hohe PLS3-Expression als negativer

prognostischer Marker identifiziert werden und ging z.B. mit einem fortgeschrittenerem Tumorstadium, häufigerer Metastasierung und größerer Invasionstiefe einher (Kurashige et al. 2019). Des Weiteren wurde bei Patienten mit kolorektalem Karzinom (CRC) eine Verbindung von PLS3-Expression in zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) mit Lymphknotenmetastasen nachgewiesen (Kujawski et al. 2015) und es wurde gezeigt, dass CTC-assoziiertes PLS3 ein geeigneter Marker sein kann, inflammatorische von malignen Darmerkrankungen zu unterscheiden (Born et al. 2021). Mittels Microarray-Analyse von Patienten mit CRC wurde zudem eine erhöhte Expressionsrate von PLS3 bei Vorhandensein von Metastasen, sowie eine Korrelation erhöhter PLS3-Expression mit größeren Stammzeleigenschaften der Tumorzellen gezeigt. Darüber hinaus ergab sich eine Verbindung zwischen PLS3-Expression in CTCs mit schlechterer Prognose und Wiederauftreten der Krankheit (Yokobori et al. 2013) und es wurde gezeigt, dass eine verbreitete Genvariante von PLS3 einen unabhängigen prognostischen Faktor für früheres Wiederauftreten der Krankheit bei Patientinnen mit Kolonkarzinom in Stadium II und III darstellt (Szkandera et al. 2013). Ähnliche Ergebnisse wurden bei Patientinnen mit Brustkrebs erzielt. Auch hier wurde eine erhöhte PLS3-Expression in CTCs nachgewiesen und PLS3-positive Patienten wiesen ein geringeres OS und DFS auf. Daneben zeigte sich PLS3 als unabhängiger negativ prädiktiver Faktor für das Gesamtüberleben (Ueo et al. 2015). Eine weitere Tumorentität, bei der PLS3 für die Prognose und Differenzierung eine Rolle spielt, ist das Adenokarzinom des Pankreas. Hier war hohe PLS3-Expression ebenfalls mit einer schlechteren Prognose assoziiert und ermöglichte eine Unterscheidung vom diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom (Xiong et al. 2021). Neben seiner Rolle als Marker in CTCs ergab auch eine hohe PLS3-Plasmakonzentration eine Korrelation mit schlechterem OS, sowie geringerem Therapieansprechen bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom, die mit Nivolumab behandelt wurden (Kuriyama et al. 2021). Insbesondere die Verbindung der PLS3-Expression zu zirkulierenden Tumorzellen, zur Metastasierung und zu einem schlechteren Krankheitsverlauf legt die Hypothese nahe, dass PLS3 in die zugrunde liegenden Signalkaskaden involviert ist, die Tumorzellen dazu bringen, die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) zu durchlaufen, Stammzeleigenschaften zu erlangen und sich niederzulassen und Metastasen bilden zu können. Dieser Prozess läuft wahrscheinlich in soliden Tumoren, wie in hämatologischen Erkrankungen, beispielsweise der AML, ähnlich ab. So wäre es möglich, dass eine erhöhte PLS3-Expression auch zum Krankheitserhalt der AML beiträgt. Ob sich PLS3 möglicherweise auch als Angriffspunkt für Therapien eignet, müsste in weitergehenden Studien erforscht werden.

Außerdem hat sich neben der Arbeit von Kuriyama et al. in weiteren Forschungsarbeiten ergeben, dass PLS3 auch mit Therapieresistenz von Tumoren in Verbindung steht. Hisano und Kollegen zeigten in Zelllinien verschiedener humaner Tumorentitäten, darunter Blasenkrebs, Prostatakrebs, sowie Kopf- und Halstumoren, die eine Cisplatin-Resistenz aufwiesen, höhere PLS3-Level als in den nicht resistenten parental Zellen. Gleichzeitig führte eine Reduktion der PLS3-Expression in Blasenkrebszellen zu einer erhöhten Cisplatin-Sensitivität. (Hisano et al. 1996). Ähnliche Ergebnisse lieferte eine Studie von Ma et al., die zeigte, dass das Ausschalten von PLS3 in tripelnegativen Brustkrebszellen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Paclitaxel über eine Aktivierung der p38 MAPK-Signalkaskade vermittelt (Ma et al. 2019). Daneben zeigten Versuche mit der Zelllinie CHO (Chinese Hamster Ovary) einen Zusammenhang zwischen PLS3-Expression und Zellzykluskontrolle. Zellen im strahlungsinduzierten G2-Arrest zeigten eine erhöhte PLS3-Expression. Sobald PLS3 herunterreguliert wurde, zeigten sich weniger Zellen im G2-Arrest. (Sasaki et al. 2002). PLS3

zeigte sich außerdem in UV-resistenten Zellen hochreguliert (Higuchi et al. 1998). Sowohl Cisplatin als verbreitetes Chemotherapeutikum als auch (UV-)Strahlung stören die DNA-Struktur und damit ihre Funktion. In der Folge werden die betroffenen Zellen apoptotisch. Aus den genannten Ergebnissen lässt sich folgern, dass eine Hochregulierung von PLS3 möglicherweise dazu führt, dass Zellen in geringerem Maße in die Apoptose gehen und so eine Resistenz gegen zytostatische Therapien wie Cisplatin entsteht, die möglicherweise auch zu einem geringeren Überleben von KrebspatientInnen führt.

Daneben gibt es Knochenerkrankungen, bei denen PLS3 Einfluss auf die Pathogenese hat. Zu nennen sind die X-chromosomal vermittelte idiopathische juvenile Osteoporose (IJO), die junge Männer betrifft, sowie die postmenopausale Osteoporose älterer Frauen. In beiden Fällen kann eine PLS3-Isoform die Krankheitsentstehung oder Krankheitsschwere begünstigen. Dies geschieht über eine Aktivitätsveränderung der Osteoklasten, die dazu führt, dass bei den betroffenen Patienten eine dickere, jedoch weniger funktionsfähige Kortikalis gebildet wird. Ursächlich dafür ist eine wahrscheinlich PLS3 vermittelte Hochregulierung von NFκB, die zu einer Osteoklasteninaktivierung führt (Neugebauer et al. 2018). Interessanterweise spielt NFκB als Onkogen auch in verschiedenen Krebserkrankungen eine Rolle. So nimmt es beispielsweise als Aktivator der cMYC Promotorregion Einfluss auf die Expression des Onkogens MYC und verhindert zusätzlich dessen Abbau (Huang et al. 2014; La Rosa et al. 1994). MYC wiederum ist neben der Tatsache, dass es einen negativen prognostischen Faktor in der AML darstellt, an der Pathogenese einiger weiterer Tumorentitäten beteiligt (Dang 2012; Ohanian et al. 2019). Über diese Kette der Einflussnahme auf die Expression könnte PLS3 über NFκB-vermittelte MYC-Überexpression zumindest teilweise die hier gezeigten leukämiebegünstigenden Effekte aufweisen.

Um zu beleuchten, mit welchen anderen Proteinen PLS3 im Rahmen der vorgestellten Einflüsse auf die Zellbiologie interagiert, führten wir eine RNA-Sequenzierung der PLS3-Knockdown-Zellen durch. Unter den dysregulierten RNA-Sequenzen, von denen sich trotz der ausgeprägten Expressionsunterdrückung von PLS3 erstaunlicherweise nur wenige fanden, war FEZ1. Ein Protein, das in einigen Tumorentitäten tumorsuppressive Eigenschaften besitzt (Chen et al. 2009; Toyooka et al. 2002; Vecchione et al. 2002), über das jedoch bezüglich der AML entgegengesetzte Effekte diskutiert werden. Eine Hochregulierung von FEZ1 in HEK293- und HeLa-Zellen führte zum Auftreten mehrlappiger Zellkerne, einem Aspekt, den leukämische Zellen häufig aufweisen (Lanza et al. 2008). Weiterhin beeinflusst FEZ1 über eine Interaktion mit dem Retinsäurerezeptor (retinoic-acid-receptor, RAR) die Transkription des Gens HOXB4 (Bertini Teixeira et al. 2018). Hierbei handelt es sich um ein Gen, von dem angenommen wird, dass es Einfluss auf verschiedene Tumorentitäten, darunter Leukämie, hat und das mit geringerem Überleben der Patienten und Resistenz gegenüber Chemotherapien zusammenhängt (Bodey et al. 2000; Wang et al. 2016; Zhang et al. 2008). Außerdem kam es zur Expressionsveränderung von MMRN1, einem Gen, das als negativer prognostischer Marker bei pädiatrischer AML bekannt ist (Laszlo et al. 2015), und von dem vermutet wird, dass es als Faktor-V/Va-Bindeprotein an Prozessen in der extrazellulären Matrix (EZM) beteiligt ist (Jeimy et al. 2008), darüber hinaus aber keine bekannten funktionellen Einflüsse besitzt. Schließlich wies die nichtkodierende RNA-Sequenz RGMB-AS1 eine niedrigere Expression auf. In einigen Tumorentitäten wie Larynxkarzinom und Adenokarzinom der Lunge korreliert die Expression positiv mit fortgeschrittenen Krankheitsstadien (Li et al. 2016 (Publikation zurückgezogen); Xu and Xi 2019). Andere Daten aus einer Studie mit hepatozellulärem Karzinom legen nahe, dass es sich hier um einen



positiven prognostischen Marker handelt (Sheng et al. 2018), sodass die Rolle, die RGM-AS1 in der Tumorbilogie spielt, derzeit nicht ausreichend erforscht ist.

Alles in allem wurde in dieser Dissertation der Einfluss von PLS3 auf die Entwicklung und die Aufrechterhaltung von AML gezeigt. In weiteren Studien sollte untersucht werden, welche zugrundeliegenden Mechanismen und Signalkaskaden für die tumorbegünstigenden Effekte verantwortlich sind und ob sich PLS3 als Ziel für neuartige Therapien eignet.

## 2.4 Material und Methoden

### 2.4.1 Patienten und Proben

Primäre AML-Zellen wurden nach schriftlichem Einverständnis der Patienten und Zustimmung der Ethik-Kommission zur Durchführung der Studie gewonnen (PV3469, Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg). Die Isolation der Zellen erfolgte aus Knochenmark mittels Dichtegradienten-Zentrifugation.

Weiterhin wurden zwei unabhängige Kohorten von AML-Patienten, von denen microarray-basierte Genexpressionsdaten von Verhaak et al. (Kohorte A, n=290 Patienten, Daten in der NCBI GEO Datenbank abrufbar, GEO Zugangsnummer GSE6891), sowie Li et al. (Kohorte B, n=553 Patienten, Daten in der NCBI GEO Datenbank abrufbar, GEO Aufrufnummer GSE37642) veröffentlicht worden waren, analysiert (Li et al. 2013; Verhaak et al. 2009). Die Patienten der Kohorte A stammten von einer klinischen Studie durchgeführt von Löwenberg et al. (Löwenberg et al. 1997), mit einem Alter von 15-60 Jahren, kürzlich diagnostizierter AML (APL wurde ausgeschlossen), die 3 Zyklen einer Standardchemotherapie erhalten hatten. In einem 2 x 2 faktoriellen Design wurden die Patienten randomisiert und erhielten Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor entweder nur während der Chemotherapie, nach der Chemotherapie bis zur Erholung des Blutbildes, während beider Perioden oder gar nicht. Das leukämiespezifische Behandlungsergebnis war unabhängig von der Gruppenzuordnung. Für die Kohorte B wurden die Patienten in die deutsche AMLCG-1999-Studie aufgenommen. Die Patienten erhielten eine intensive Standard-Induktionschemotherapie, auf die entweder eine autologe Stammzelltransplantation oder eine Konsolidierungstherapie plus eine dreijährige Erhaltungstherapie folgte.

### 2.4.2 Zellkultur

Die humane AML-Zelllinie Kasumi-1 wurde in RPMI-1640-Medium (Gibco) kultiviert, das mit 20% fetalem Rinderserum (FBS, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) angereichert wurde. HEK293T-Zellen wurden in DMEM-Medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) kultiviert, das mit 10 % FBS angereichert wurde. Alle Zellen wurden in einem befeuchteten Inkubator mit 5% CO<sub>2</sub> bei 37 °C gehalten.

#### 2.4.3 Quantitative PCR-Analyse mit reverser Transkription

Gesamt-RNA wurde mit dem innuSPEED Tissue RNA Kit (Analytik Jena, Jena, Deutschland) extrahiert und mit dem PrimeScript RT Master Mix (Clontech, Madison, WI, USA) in cDNA transkribiert. Exon-übergreifende Primer für PLS3 und Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurden mit Primer-3-Software (Whitehead Institute for Biomedical Research, Boston, MA, USA) wie folgt entworfen: PLS3 vorwärts 5'-attgtgctctgggtggaac-3', PLS3 rückwärts 5' acaggtcatcggtgtaggg-3', GAPDH vorwärts 5' gtcagtgggtggacctgacct 3', GAPDH rückwärts 5' tgctgtagccaaattcgttg-3'. Die quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) wurde mit dem LightCycler 96 (Roche, Basel, Schweiz) unter Verwendung des SYBR Premix Ex Taq 2 Kit (Takara, Tokio, Japan) über 40 PCR-Zyklen durchgeführt. Die PCR-Effizienzen wurden anhand einer Standardkurve berechnet, die aus logarithmischen Verdünnungen einer positiven cDNA-Probe gewonnen wurde. Die Proben wurden in Triplikaten gemessen und anschließend der Mittelwert berechnet. Die relative mRNA-Expression von PLS3 wurde mit einer von Pfaffl (Pfaffl 2001) entwickelten Methode berechnet. Als Referenzgen diente die Expression von GAPDH.

#### 2.4.4 Immunofluoreszenzfärbung

Die gesamten Zellbestandteile leukämischer monozytärer Zellen aus Knochenmark von AML-Patienten wurde mittels Rotofix 32A-Zentrifuge (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland) auf Glasobjektträger übertragen. Die Objektträger wurden 10 Minuten lang in 4 % Paraformaldehyd/PBS fixiert, 5 Minuten lang in 0,1 % Triton-X 100 permeabilisiert und anschließend 60 Minuten lang mit 10 % normalem Eselserum geblockt. Der primäre PLS3-Antikörper (Verdünnung 1:500, #PA5-27883; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) wurde über Nacht inkubiert woraufhin nach einstündiger Inkubation mit einem sekundären AF488-konjugierten Esel-Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (1:400, #A21206, Invitrogen) die Färbung mit DAPI durchgeführt wurde.

#### 2.4.5 Lentivirale Transduktion von Kasumi-1-Zellen mit PLS3-spezifischer shRNA oder einem PLS3-Überexpressions-Konstrukt

pLKO.1- puro-Vektoren, die für PLS3 als Target kodieren (sh1-Sequenz 5'-CCGGGCTCAGAACTTAGACGGGATTCTCGAGAATCCCGTCTAAGTTCTGAGCTTTTTG-3' und sh2-Sequenz 5'-CCGGGCTGAGAGTATGCTTCAACAACCTCGAGTTGTGAAGCATACTCTCAGCTTTTTG-3') oder scrambled shRNA (Negativkontrolle) wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) erworben. Die shRNA-Sequenzen wurden in das LeGO-Vektorsystem (ein von HIV1 abgeleiteter lentiviraler Vektor der 3. Generation) kloniert. Dieses System trägt fluoreszierende Markerproteine, die eine einfache Testung der Transduktionseffizienz ([www.LentiGO-Vectors.de](http://www.LentiGO-Vectors.de)) erlauben und verfügt über Gene, die für Antibiotikaresistenz kodieren, und so die Auswahl der transduzierten Zellen erleichtern. Für die Überexpressionsvarianten wurde ein LeGO-Vektor konstruiert, der die PLS3-Kodierungssequenz upstream oder downstream des GFP-Inserts trägt. So wurde ein N-

terminales (PLS3-GFP) bzw. ein C-terminales (GFP-PLS3) PLS3- und GFP-Fusionskonstrukt hergestellt. Der GFP-Vektor diente als Negativkontrolle.

HEK293T-Zellen wurden für die Herstellung der lentiviralen Partikel verwendet. Diese wurden 24 Stunden nach der Transfektion geerntet und zu Kasumi-1-Zellen hinzugefügt. Die Selektion der transduzierten Zellen erfolgte durch Zugabe von Puromycin (2 µg/mL; Sigma-Aldrich; für sh1-transduzierte und PLS3-GFP- und GFP-PLS3-Überexpressionsvarianten) bzw. Zeocin (2 µg/mL; Sigma-Aldrich; für sh2-transduzierte Zellen). Die Effizienz des Knockdowns bzw. der Überexpression wurde in einer quantitativen PCR-Analyse an Tag 4 der Behandlung mit Puromycin oder Zeocin analysiert. Jegliche Arbeit mit lentiviralen Partikeln wurde in einem Labor der Sicherheitsstufe S2 nach deutschem Recht durchgeführt.

#### 2.4.6 F-Aktin-Färbung

AML-Zellen, die auf Kammerobjektträgern mit Poly-L-Lysin-Beschichtung (Ibidi) gewachsen waren, wurden mit 4% Paraformaldehyd/PBS für 10 min bei 37 °C fixiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden sie mit Alexa Fluor 568 Phalloidin (Thermo Fisher Scientifics, Waltham, MA, USA) in 1:1000 Verdünnung mit PBS für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen und mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol in 1:2000 Verdünnung mit PBS für 5 min bei Raumtemperatur gefärbt. Nach einem letzten Waschen erfolgte die Fluoreszenzanalyse mittels Keyence BZ 9000 Mikroskop.

#### 2.4.7 Proliferationsassays

PLS3-Knockdown-, PLS-Überexpressions und die entsprechenden Kontrollzellen wurden in Triplikaten in 24-Well-Platten mit einer Zelldichte von  $0,3 \times 10^6$  Zellen/ml ausgesät. An Tag 3 und Tag 7 nach Aussaat wurde die Zellkonzentrationsbestimmung und Vitalitätsanalyse mittels Vi-Cell XR (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) durchgeführt.

#### 2.4.8 Kolonie-Formations-Assays

Die Fähigkeit der PLS3-Knockdown- bzw. PLS3-Überexpressions-Zellen Kolonien zu bilden wurde mit den entsprechenden Kontrollzellen verglichen. Dazu wurden die AML-Zellen in Methocult (Methocult H4230, Stemcell Technologies) mit einer Zelldichte von 250 Zellen/ml ausgesät und die Zahl der entstandenen Kolonien nach 7 Tagen mittels inversem Mikroskop (Axiovert 25, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) gezählt.

#### 2.4.9 Xenograft Modell

$1 \times 10^6$  Kasumi-1-Zellen mit PLS3-Knockdown oder scrambled-shRNA wurden intravenös in weibliche NSG (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) Mäuse transplantiert (9 Tiere pro

Gruppe). Die Tiere wurden getötet, sobald sie eindeutige leukämische Symptome wie drastischen Gewichtsverlust, sichtbare Tumormasse, Hypothermie oder Apathie zeigten. 3 Mäuse der Kontrollgruppe, die schlussendlich keine Symptome zeigten, wurden 200 Tage nach Transplantation der AML-Zellen getötet und mittels Durchflusszytometrie auf AML-Infiltration in peripherem Blut, Knochenmark, Milz, und Leber untersucht. Hierzu wurde ein humanspezifischer CD45 Antikörper (Clone HI30, Biolegend, San Diego, CA, USA) verwendet.

#### 2.4.10 RNA Sequenzierung

Mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) wurde die Gesamt-RNA der lentiviral transduzierten Kasumi-1-Zellen extrahiert. Im Anschluss erfolgte die weitere Aufbereitung zur RNA-Sequenzierung mithilfe des NEBNext Ultra II RNA directional Kit (New England Biolabs, Höchst, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte mit dem NextSeq® 500 System (Illumina, San Diego, CA, USA). Nach weiterer Aufbereitung (bcl2fastq2, FastQC, FastQ groomer, Stanford Genetics Bioinformatics Service Center Galaxy Plattform (Stanford, CA, USA)) und Quantifizierung (SeqMonk 1.45 (Babraham Institute)) wurden anhand zweier kombinierter PLS3-shRNAs die signifikant anders exprimierten Gene analysiert. Dies erfolgte mittels LIMMA Analyse (FDR < 0.05, Benjamin–Hochberg-Korrektur).

#### 2.4.11 Statistische Auswertung

Die gesamten statistischen Analysen wurden mit SPSS 21 (SPSS inc., Chicago IL, USA) sowie R 3.5.0 (R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich) unter Rückgriff auf das BioConductor Archiv durchgeführt. Das OS wurde als Zeitraum zwischen Inklusion in die Studie bis zum Tod definiert. EFS wurde definiert als Zeitraum zwischen Inklusion in die Studie bis zu einem vorher definierten Ereignis (erstes Therapieversagen, Rückfall oder Tod). Es wurden für verschiedene Kategorien Kaplan-Meier-Kurven berechnet und mit Log-rank-Tests verglichen. Die mittlere PLS3-Expression wurde benutzt, um Patienten in eine hoch- und eine niedrigexprimierende Gruppe zu teilen. Um diejenigen Genexpressionen zu identifizieren, die einen unabhängig signifikanten prädiktiven Faktor darstellen, wurden die Genexpressionen gleichzeitig in dasselbe multivariable Cox-Modell eingefügt mit anschließender Rückwärtsselektion. Die Unterschiede in der Proliferations- oder der Fähigkeit, Kolonien zu bilden, wurden mithilfe eines Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. Für alle Untersuchungen wurde ein p-Wert von < 0,05 als statistisch signifikant zugrunde gelegt.

#### 2.5 Fazit

Wir konnten das Aktinbindeprotein PLS3 als möglichen Einflussfaktor für die Entstehung und Aufrechterhaltung der akuten myeloischen Leukämie identifizieren. Weitere Studien sollten durchgeführt werden, um die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen zu untersuchen und PLS3 sollte als mögliches therapeutisches Zielprotein in Betracht gezogen werden.

## 2.6 Literaturverzeichnis

1. Bertini Teixeira M, Figueira ACM, Furlan AS, Aquino B, Alborghetti MR, Paes Leme AF, et al. Fasciculation and elongation zeta-1 protein (FEZ1) interacts with the retinoic acid receptor and participates in transcriptional regulation of the *Hoxb4* gene. *FEBS Open Bio*. 2018 Jan;8(1):4–14.
2. Bodey B, Bodey B, Siegel SE, Kaiser HE. Immunocytochemical detection of the homeobox B3, B4, and C6 gene products in breast carcinomas. *Anticancer Res*. 2000 Oct;20(5A):3281–6.
3. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med*. 1997 Jul;3(7):730–7.
4. Born J, Hendricks A, Hauser C, Egberts J-H, Becker T, Röder C, et al. Detection of Marker Associated with CTC in Colorectal Cancer in Mononuclear Cells of Patients with Benign Inflammatory Intestinal Diseases. *Cancers*. 2021 Dec 23;14(1):47.
5. Chen L, Zhu Z, Sun X, Dong X-Y, Wei J, Gu F, et al. Down-regulation of tumor suppressor gene FEZ1/LZTS1 in breast carcinoma involves promoter methylation and associates with metastasis. *Breast Cancer Res. Treat*. 2009 Aug;116(3):471–8.
6. Cogle CR, Bosse RC, Brewer T, Migdady Y, Shirzad R, Kampen KR, et al. Acute myeloid leukemia in the vascular niche. *Cancer Lett*. 2016 Oct;380(2):552–60.
7. Dang CV. MYC on the Path to Cancer. *Cell*. 2012 Mar;149(1):22–35.
8. Delanote V, Vandekerckhove J, Gettemans J. Plastins: versatile modulators of actin organization in (patho)physiological cellular processes. *Acta Pharmacol. Sin*. 2005 Jul;26(7):769–79.
9. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. Longo DL, editor. *N. Engl. J. Med*. 2015 Sep 17;373(12):1136–52.
10. Dulmage BO, Geskin LJ. Lessons learned from gene expression profiling of cutaneous T-cell lymphoma. *Br. J. Dermatol*. 2013 Dec;169(6):1188–97.
11. Giganti A, Plastino J, Janji B, Van Troys M, Lentz D, Ampe C, et al. Actin-filament cross-linking protein T-plastin increases Arp2/3-mediated actin-based movement. *J. Cell Sci*. 2005 Mar 15;118(6):1255–65.
12. Henn A, Michel L, Fite C, Deschamps L, Ortonne N, Ingen-Housz-Oro S, et al. Sézary syndrome without erythroderma. *J. Am. Acad. Dermatol*. 2015 Jun;72(6):1003-1009.e1.
13. Higuchi Y, Kita K, Nakanishi H, Wang X-L, Sugaya S, Tanzawa H, et al. Search for Genes Involved in UV-Resistance in Human Cells by mRNA Differential Display: Increased Transcriptional Expression of Nucleophosmin and T-Plastin Genes in Association with the Resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1998 Jul;248(3):597–602.
14. Hisano T, Ono M, Nakayama M, Naito S, Kuwano M, Wada M. Increased expression of T-plastin gene in cisplatin-resistant human cancer cells: identification by mRNA differential display. *FEBS Lett*. 1996 Nov 11;397(1):101–7.
15. Huang H, Ma L, Li J, Yu Y, Zhang D, Wei J, et al. NF- $\kappa$ B1 inhibits c-Myc protein degradation through suppression of FBW7 expression. *Oncotarget*. 2014 Jan 30;5(2):493–505.
16. Jeimy SB, Tasneem S, Cramer EM, Hayward CPM. Multimerin 1. Platelets. 2008 Jan;19(2):83–95.

17. Jones CL, Ferreira S, McKenzie RCT, Tosi I, Caesar JA, Bagot M, et al. Regulation of T-Plastin Expression by Promoter Hypomethylation in Primary Cutaneous T-Cell Lymphoma. *J. Invest. Dermatol.* 2012 Aug;132(8):2042–9.
18. Kujawski R, Przybyłowska-Sygut K, Mik M, Lewandowski M, Trzeciński R, Berut M, et al. Expression of the PLS3 Gene in Circulating Cells in Patients with Colorectal Cancer. *Pol. J. Surg.* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2022 Feb 5];87(2). Available from: <https://www.degruyter.com/view/j/pjs.2015.87.issue-2/pjs-2015-0020/pjs-2015-0020.xml>
19. Kurashige J, Yokobori T, Mima K, Sawada G, Takahashi Y, Ueo H, et al. Plastin3 is associated with epithelial-mesenchymal transition and poor prognosis in gastric cancer. *Oncol. Lett.* 2019 Feb;17(2):2393–9.
20. Kuriyama K, Yokobori T, Sohda M, Nakazawa N, Yajima T, Naruse I, et al. Plasma plastin-3: A tumor marker in patients with non-small-cell lung cancer treated with nivolumab. *Oncol. Lett.* 2021 Jan;21(1):11.
21. La Rosa FA, Pierce JW, Sonenshein GE. Differential regulation of the c-myc oncogene promoter by the NF-kappa B rel family of transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* 1994 Feb;14(2):1039–44.
22. Lanza DCF, Trindade DM, Assmann EM, Kobarg J. Over-expression of GFP-FEZ1 causes generation of multi-lobulated nuclei mediated by microtubules in HEK293 cells. *Exp. Cell Res.* 2008 Jun;314(10):2028–39.
23. Laszlo GS, Alonzo TA, Gudgeon CJ, Harrington KH, Gerbing RB, Wang Y-C, et al. Multimerin-1 ( *MMRN1* ) as Novel Adverse Marker in Pediatric Acute Myeloid Leukemia: A Report from the Children’s Oncology Group. *Clin. Cancer Res.* 2015 Jul 15;21(14):3187–95.
24. Li P, Zhang G, Li J, Yang R, Chen S, Wu S, et al. Long Noncoding RNA RGMB-AS1 Indicates a Poor Prognosis and Modulates Cell Proliferation, Migration and Invasion in Lung Adenocarcinoma. Roemer K, editor. *PLOS ONE*. 2016 Mar 7;11(3):e0150790.
25. Li Z, Herold T, He C, Valk PJM, Chen P, Jurinovic V, et al. Identification of a 24-Gene Prognostic Signature That Improves the European LeukemiaNet Risk Classification of Acute Myeloid Leukemia: An International Collaborative Study. *J. Clin. Oncol.* 2013 Mar 20;31(9):1172–81.
26. Lin CS, Aebersold RH, Kent SB, Varma M, Leavitt J. Molecular cloning and characterization of plastin, a human leukocyte protein expressed in transformed human fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 1988 Nov;8(11):4659–68.
27. Löwenberg B, Boogaerts MA, Daenen SM, Verhoef GE, Hagenbeek A, Vellenga E, et al. Value of different modalities of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor applied during or after induction therapy of acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 1997 Dec;15(12):3496–506.
28. Ma Y, Lai W, Zhao M, Yue C, Shi F, Li R, et al. Plastin 3 down-regulation augments the sensitivity of MDA-MB-231 cells to paclitaxel via the p38 MAPK signalling pathway. *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.* 2019 Dec 4;47(1):684–94.
29. Meads MB, Gatenby RA, Dalton WS. Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat. Rev. Cancer.* 2009 Sep;9(9):665–74.
30. Neugebauer J, Heilig J, Hosseinibarkooie S, Ross BC, Mendoza-Ferreira N, Nolte F, et al. Plastin 3 influences bone homeostasis through regulation of osteoclast activity. *Hum. Mol. Genet.* 2018 Dec 15;27(24):4249–62.

31. Ohanian M, Rozovski U, Kanagal-Shamanna R, Abruzzo LV, Loghavi S, Kadia T, et al. MYC protein expression is an important prognostic factor in acute myeloid leukemia. *Leuk. Lymphoma*. 2019 Jan 2;60(1):37–48.
32. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 1;29(9):45e–45.
33. Sasaki Y, Itoh F, Kobayashi T, Kikuchi T, Suzuki H, Toyota M, et al. Increased expression of T-fimbrin gene after DNA damage in CHO cells and inactivation of T-fimbrin by CpG methylation in human colorectal cancer cells. *Int. J. Cancer*. 2002 Jan 10;97(2):211–6.
34. Sheng N, Li Y, Qian R, Li Y. The clinical significance and biological function of lncRNA RGMB-AS1 in hepatocellular carcinoma. *Biomed. Pharmacother*. 2018 Feb;98:577–84.
35. Szkandera J, Winder T, Stotz M, Weissmueller M, Langsenlehner T, Pichler M, et al. A common gene variant in PLS3 predicts colon cancer recurrence in women. *Tumor Biol*. 2013 Aug;34(4):2183–8.
36. Tang N, Gibson H, Germeroth T, Porcu P, Lim HW, Wong HK. T-plastin ( *PLS3* ) gene expression differentiates Sézary syndrome from mycosis fungoides and inflammatory skin diseases and can serve as a biomarker to monitor disease progression: Correspondence. *Br. J. Dermatol*. 2010 Feb;162(2):463–6.
37. Toyooka S, Fukuyama Y, Wistuba II, Tockman MS, Minna JD, Gazdar AF. Differential expression of FEZ1/LZTS1 gene in lung cancers and their cell cultures. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res*. 2002 Jul;8(7):2292–7.
38. Ueo H, Sugimachi K, Gorges TM, Bartkowiak K, Yokobori T, Müller V, et al. Circulating tumour cell-derived plastin3 is a novel marker for predicting long-term prognosis in patients with breast cancer. *Br. J. Cancer*. 2015 Apr 28;112(9):1519– 26.
39. Vecchione A, Ishii H, Baldassarre G, Bassi P, Trapasso F, Alder H, et al. FEZ1/LZTS1 is down-regulated in high-grade bladder cancer, and its restoration suppresses tumorigenicity in transitional cell carcinoma cells. *Am. J. Pathol*. 2002 Apr;160(4):1345–52.
40. Velthaus A, Cornils K, Hennigs JK, Grüb S, Stamm H, Wicklein D, et al. The Actin Binding Protein Plastin-3 Is Involved in the Pathogenesis of Acute Myeloid Leukemia. *Cancers [Internet]*. 2019;11(11).
41. Verhaak RGW, Wouters BJ, Erpelinck CAJ, Abbas S, Beverloo HB, Lugthart S, et al. Prediction of molecular subtypes in acute myeloid leukemia based on gene expression profiling. *Haematologica*. 2009 Jan;94(1):131–4.
42. Wang H, Jia X-H, Chen J-R, Yi Y-J, Wang J-Y, Li Y-J, et al. HOXB4 knockdown reverses multidrug resistance of human myelogenous leukemia K562/ADM cells by downregulating P-gp, MRP1 and BCRP expression via PI3K/Akt signaling pathway. *Int. J. Oncol*. 2016 Dec;49(6):2529–37.
43. Wong HK, Gibson H, Hake T, Geyer S, Frederickson J, Marcucci G, et al. Promoter-Specific Hypomethylation Is Associated with Overexpression of PLS3 , GATA6 , and TWIST1 in the Sezary Syndrome. *J. Invest. Dermatol*. 2015 Aug;135(8):2084–92.
44. Xiong F, Wu G-H, Wang B, Chen Y-J. Plastin-3 is a diagnostic and prognostic marker for pancreatic adenocarcinoma and distinguishes from diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Cell Int*. 2021 Aug 4;21(1):411.

45. Xu Z, Xi K. LncRNA RGMB-AS1 promotes laryngeal squamous cell carcinoma cells progression via sponging miR-22/NLRP3 axis. *Biomed. Pharmacother.* 2019 Oct;118:109222.
46. Yokobori T, Iinuma H, Shimamura T, Imoto S, Sugimachi K, Ishii H, et al. Platin3 is a novel marker for circulating tumor cells undergoing the epithelial-mesenchymal transition and is associated with colorectal cancer prognosis. *Cancer Res.* 2013 Apr 1;73(7):2059–69.
47. Zhang X-B, Beard BC, Trobridge GD, Wood BL, Sale GE, Sud R, et al. High incidence of leukemia in large animals after stem cell gene therapy with a HOXB4-expressing retroviral vector. *J. Clin. Invest.* 2008 Apr;118(4):1502–10

### **3. Zusammenfassung**

#### 3.1 Englisch

PLS3 is upregulated in AML cells after co-culture with primary endothelial cells. PLS3 is also expressed in about half of our primary AML cells and in the Kasumi-1 AML cell line. PLS3 expression levels on the mRNA level has an effect on the functionality of Kasumi1 cells: Kasumi-1 cells with a PLS3 knockdown proliferate at lower rates than the control cells and PLS3 overexpressing Kasumi-1 cells proliferate at higher rates while this change is not statistically significant. Colony formation capacity on the other hand is affected significantly. PLS3 knockdown Kasumi-1 show significantly lower colony formation capacity while PLS3 overexpressing Kasumi-1 form significantly more colonies in semisolid medium than their respective controls.

Alteration of PLS3 expression changes the RNA expression of 10 genes and 2 non-coding RNAs. Some of which might play a role in the pathogenesis of leukemia.

NSG mice transplanted with PLS3 knockdown Kasumi-1 showed significantly prolonged survival compared to mice transplanted with control Kasumi-1 and some mice developed no leukemic symptoms at all and didn't show leukemic infiltration in peripheral blood, bone marrow, spleen or liver.

High PLS3 expression represents a negative prognostic marker in 2 independent AML patient cohorts as overall and disease free survival were significantly lower in high PLS3 expressors compared to patients with lower PLS3 expression levels.



## 3.2 Deutsch

PLS3 zeigt sich in AML-Zellen auf RNA-Ebene hochreguliert, nachdem diese in Co-Kultur mit primären Endothelzellen gebracht wurden. PLS3 wird außerdem in etwa der Hälfte der untersuchten primären AML-Zellen und in der Zelllinie Kasumi-1 exprimiert. Die PLS3-Expression auf RNA-Ebene hat zusätzlich funktionale Effekte auf Kasumi-1-Zellen. Nach Durchführung eines shRNA vermittelten PLS3-Knockdowns in Kasumi-1-Zellen zeigten diese eine geringere Proliferationsrate als die entsprechenden Kontrollzellen. Gleichzeitig bewirkte die durch Transduktion eines PLS3-GFP-Fusionsvektors erzielte Überexpression von PLS3 in Kasumi-1-Zellen eine höhere Proliferationsrate. Letzteres Ergebnis ist jedoch nicht statistisch signifikant. Die Analyse der Fähigkeit Kolonien zu bilden ergab statistisch signifikante Ergebnisse. PLS3-Überexpressions-Kasumi-1 zeigten eine höhere und PLS3-Knockdown-Kasumi-1 zeigten eine geringere Fähigkeit, in semisolidem Medium Kolonien zu bilden als die entsprechenden Kontrollzellen.

Des Weiteren bewirkte die Veränderung der PLS3-Expression auch eine Veränderung der RNA-Expression von 10 Genen und 2 nicht-kodierenden RNAs. Einige dieser Gene könnten auch mit der Pathogenese von AML in Verbindung stehen.

Um den Effekt einer veränderten PLS3-Expression in vivo zu überprüfen wurden NSG-Mäusen PLS3-Knockdown-Kasumi-1-Zellen transplantiert. Die Tiere zeigten ein signifikant längeres Überleben als die Mäuse, denen Kontrollzellen transplantiert worden waren und einige Mäuse zeigten sogar keinerlei leukämische Symptome oder leukämische Infiltration von peripherem Blut, Knochenmark, Leber oder Milz.

In 2 voneinander unabhängigen AML-Patientenkohorten konnten wir außerdem PLS3 als negativen prognostischen Marker identifizieren. Das Gesamt- und das ereignisfreie Überleben waren bei den Patienten mit hoher PLS3-Expression signifikant geringer als bei den Patienten mit niedriger PLS3-Expression.

## 4. Erklärung des Eigenanteils

Nachdem ich von Frau PD Dr. Jasmin Wellbrock in das von ihr und Prof. Dr. Walter Fiedler ausgearbeitete Projekt eingeführt wurde, bestanden meine Aufgaben zu einem großen Teil darin, die dafür notwendigen Experimente zu realisieren.

Zu meinen durchgeführten Tätigkeiten gehörten u.a. die Kultivierung der für die Experimente benötigten Zellen, die Gewinnung primärer AML-Zellproben und die Co-Kultur von AML- und Endothelzellen. Des Weiteren zählten Isolation von RNA und die Durchführung quantitativer Real Time PCRs, sowie die Isolation von Zellproteinen und deren Nachweis mittels Western Blot zu meinen Aufgaben. Außerdem gehörte es zu meinem Anteil der Publikation, die PLS3-Knockdown- und PLS3-Überexpressions-Zellen herzustellen, deren Ausprägung mittels PCR bzw. Durchflusszytometrie darzustellen und in der Folge den Einfluss der veränderten PLS3-Expression auf die Zellen zu analysieren. So war es meine Aufgabe, die Proliferations- und Kolonie-Formations-Assays durchzuführen. Die statistische Auswertung der durchgeführten

Experimente und deren graphische Darstellung zählten teilweise ebenso zu meinen Aufgaben.

In Rücksprache mit Frau Wellbrock wurde die Methodik einiger Experimente angepasst.

Die Durchführung der in vivo Experimente gehörte bzgl. der Arbeit mit den lebenden Tieren zu den Aufgaben von Frau Wellbrock, während es teils meine Aufgabe war, die in der Folge durchzuführenden Analysen der verschiedenen Gewebe hinsichtlich leukämischer Infiltration zu realisieren.

Die Analyse des prognostischen Einflusses von unterschiedlicher PLS3-Expression in den AML-Patientenkohorten und deren graphische Darstellung zählten zu den Aufgaben von Frau Wellbrock.

Die Darstellung der Co-Lokalisierung von PLS3 und F-Aktin wurde von Frau Prof. Dr. Sabine Windhorst und Frau Saskia Grüb durchgeführt. Die Auswertung der RNA-Sequenzierungsdaten mit Untersuchung der dysregulierten RNA Abschnitte wurde von Herrn Dr. Jan Hennings durchgeführt. Die Einordnung der dysregulierten RNA-Abschnitte hinsichtlich ihrer Zugehörigkeit zu bestimmten Signalkaskaden und der möglichen Bedeutung für die Pathogenese der AML oder anderen Erkrankungen wurde von Frau Wellbrock durchgeführt.

Das Manuskript wurde von Frau Wellbrock und Herrn Fiedler entworfen, während an der Kontrolle und Überarbeitung alle Co-Autoren beteiligt waren.

## **5. Danksagung**

Nun möchte ich die Gelegenheit nutzen, mich bei den Menschen zu bedanken, die mir die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglicht und mich tatkräftig dabei unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Walter Fiedler, der mir durch die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe erst die Möglichkeit eröffnet hat, diese Arbeit anzufertigen. Ich möchte mich für die freundliche und vertrauensvolle Zusammenarbeit bedanken und für die Unterstützung, auf die ich während der Promotion jederzeit zählen konnte.

Als nächstes möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Betreuerin Frau PD Dr. Jasmin Wellbrock bedanken, die mir auf dem gesamten Weg der Promotion stets mit Rat und Tat zur Seite stand und für alle meine Fragen ein offenes Ohr hatte. Durch ihre fachliche Kompetenz und ihr Engagement hat sie maßgeblich zu dieser Arbeit beigetragen und für die vertrauensvolle und unkomplizierte Zusammenarbeit bin ich ihr besonders dankbar.

Ebenfalls möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Sabine Windhorst und Herrn Dr. Jan Hennings bedanken, die durch ihre Kooperation mit besonderer Expertise, einen großen Teil zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Frau PD Dr. Kerstin Cornils, ohne deren Hilfe einige essentielle Experimente dieser Promotion vielleicht nie erfolgreich abgeschlossen worden wären.

Des Weiteren möchte ich allen Mitarbeitern des Labors herzlich dafür danken, dass sie mich jederzeit kompetent und hilfsbereit unterstützt haben. Die Zusammenarbeit hat die Promotion zu einem Teil meiner beruflichen Laufbahn gemacht, auf dem ich besonders viel gelernt habe. Besonders hervorheben möchte ich dabei Herrn Dr. Hauke Stamm und Frau Dipl.-Biochem. Emily-Marie Latuske, die mir insbesondere bei den praktischen Arbeiten immer mit freundschaftlicher Unterstützung zur Seite standen.

Zu guter Letzt gilt mein ganz herzlicher Dank meinen Eltern, die mir überhaupt erst ermöglicht haben, das Medizinstudium zu beginnen und die mich bei jedem Schritt nicht nur meiner beruflichen Laufbahn mit dem größten Vertrauen unterstützen, mich motivieren und mir den Rücken stärken. Auch meiner Schwester Janna möchte ich einen riesengroßen Dank aussprechen, da sie mir während der gesamten Promotion und darüber hinaus nicht nur ein großes Vorbild war, sondern durch ihr stetes Engagement auf ganz vielen Ebenen dafür gesorgt hat, dass ich diese Arbeit beginnen konnte und schließlich auch fertigstellen kann.

## 6. Lebenslauf

### Klinische Erfahrung

Assistenzarzt  
09/2019 - 08/2021

Innere Medizin und Geriatrie,  
Evangelisches Krankenhaus Alsterdorf, Hamburg  
Schwerpunkte:  
· Versorgung von Patienten mit akuten internistischen Erkrankungen sowie kritisch kranker (internistischer) Patienten auf der Intensivstation  
· Versorgung von Patienten in der geriatrischen Rehabilitation bspw. nach kardiologischen oder (unfall-) chirurgischen Eingriffen oder neurologischen Ereignissen; häufig mit multiplen Komorbiditäten

07/2022 - aktuell

Urologie  
Martini-Klinik am UKE GmbH, Hamburg  
Schwerpunkte:  
· Versorgung und operative Assistenz von Patienten mit Prostatakarzinom

Praktisches Jahr  
11/2017 - 03/2018

Innere Medizin, Marienkrankenhaus Hamburg  
Schwerpunkte: Onkologie, Kardiologie, Pneumologie

03/2018 - 05/2018

Chirurgie, Schön-Klinik Hamburg Eilbek  
Schwerpunkte: Viszeral- und Unfallchirurgie

05/2018 - 07/2018	Chirurgie, Ospedale Santa Maria di Loreto Mare (Neapel, Italien) Schwerpunkt: Viszeralchirurgie
07/2018 - 10/2018	Neurologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
<b>Famulaturen</b>	
01/2015	Chirurgie, Komfo Anokye Teaching Hospital (Kumasi, Ghana)
08/2015	Hämatookologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
08/2016	Allgemeinmedizin, Praxis Dr. Peter Jakob, Hamburg
01/2017	Radiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
<b>Approbation</b>	
15.01.2019	Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz, Freie und Hansestadt Hamburg
<b>Studium</b>	
10/2011 - 12/2018	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
09/2013	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (1,5)
10/2017	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (2,0)
12/2018	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (3,0) Ärztliche Prüfung (Gesamtnote: 2,16)
<b>Promotion</b>	
03/2015 - aktuell	Thema: The Actin Binding Protein Plastin-3 Is Involved in the Pathogenesis of Acute Myeloid Leukemia II. Medizinische Klinik und Poliklinik UKE Hamburg Betreuerin: PD Dr. Jasmin Wellbrock Doktorvater: Prof. Dr. Walter Fiedler
<b>Stipendien</b>	
02/2016 - 07/2016	Erasmus Auslandsstipendium Università di Bologna – Alma mater studiorum (Bologna, Italien)
<b>Sonstiges</b>	
Sprachkenntnisse	Deutsch - Muttersprache Englisch - verhandlungssicher Italienisch - fließend

## 7. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: ..... 