

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

II. Medizinische Klinik und Poliklinik für Onkologie und Hämatologie

Prof. Dr. med. Carsten Bokemeyer

Expressionsanalyse verschiedener Robo-Rezeptoren und dazugehöriger Liganden bei der akuten myeloischen Leukämie

Dissertation

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

vorgelegt von:

Thoren Adam Müller
aus Aachen

Hamburg 2012

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 01.08.2012**

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

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr.med W. Fiedler

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. M. Jücker

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD Dr.med. F. Ayuketang Ayuk

I ZUSAMMENFASSUNG	5
II EINLEITUNG	6
1 ANGIOGENESE	6
2 ZUSAMMENHÄNGE ZWISCHEN ANGIOGENESE UND HÄMATOPOESE	6
3 ANGIOGENESE BEI HÄMATOLOGISCHEN KREBSERKRANKUNGEN	7
4 LEUKÄMIE	8
5 AKUTE MYELOISCHE LEUKÄMIE	9
6 DAS REZEPTOR-LIGANDEN-SYSTEM ROBO	12
6.1 <i>Einleitung</i>	12
6.2 <i>Robo1</i>	13
6.3 <i>Robo4</i>	14
6.4 <i>Slit2</i>	15
6.5 <i>Gremlin1</i>	15
6.6 <i>WASP</i>	16
7 METHODEN.....	17
7.1 <i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	17
7.2 <i>Western-Blot-Verfahren</i>	17
III MATERIAL & METHODEN	19
1 MATERIAL	19
1.1 <i>Chemikalien & Medizinprodukte</i>	19
1.2 <i>Laborgeräte</i>	20
1.3 <i>Verwendete Antikörper</i>	21
1.4 <i>Verwendete Primer</i>	22
1.5 <i>Verwendete cDNA-Klone</i>	22
1.6 <i>Lösungen & Medien</i>	23
1.7 <i>Zelllinien & Patientenmaterial</i>	23
2 PLASMIDPRÄPARATION	25
2.1 <i>Tages- und Nachtkultivierung plasmidtragender E.coli-Bakterien</i>	25
2.2 <i>Plasmid-Maxi-Präparation nach Qiagen</i>	25
3 RNA-ISOLIERUNG	26
4 cDNA-SYNTHESE	26
5 POLYMERASE-KETTENREAKTION.....	26
5.1 <i>Qualitative Polymerase-Kettenreaktion</i>	26
5.2 <i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	27
5.3 <i>Realtime-Polymerase-Kettenreaktion</i>	27
6 WESTERN BLOT.....	28
6.1 <i>Extraktion des löslichen Gesamtproteins</i>	28
6.2 <i>Proteinbestimmung (Bradford-Methode)</i>	28
6.3 <i>Polyacrylamid-Elektrophorese und Immunoblot</i>	29
IV ERGEBNISSE	30
1 ERGEBNISSE DER QUALITATIVEN POLYMERASE-KETTENREAKTION	30
1.1 <i>Qualitative PCR an HUVEC-Zellen</i>	30
1.2 <i>Qualitative PCR der Robo1- und Robo4-Rezeptoren an AML-Patientenproben</i>	31
1.3 <i>Qualitative PCR der Robo-Rezeptoren und Liganden an AML-Zelllinien</i>	32
2 ERGEBNISSE DER QUANTITATIVEN POLYMERASE-KETTENREAKTION	35
2.1 <i>Quantitative PCR der Rezeptoren und Liganden der Robo-Familie an AML- Zelllinien</i>	35
3 ERGEBNISSE DER WESTERN-BLOT-ANALYSEN	38
3.1 <i>Western-Blot-Analyse der Robo-Rezeptoren und Liganden in AML-Zelllinien</i>	38
4 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	42
V DISKUSSION	43
VI ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	51
VII TABELLENVERZEICHNIS	52
VIII ABBILDUNGSVERZEICHNIS	53
IX LITERATURVERZEICHNIS	55

X DANKSAGUNG	66
XI LEBENSLAUF	67
XII EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	68

I Zusammenfassung

Angiogenese ist Teil eines komplexen Netzwerks zur Bildung und Anbindung neuer Gefäße an ein bereits bestehendes Gefäßsystem (Folkman *et al.*, 1992; Rumpold *et al.*, 2004). Die Gefäßanbindung dient dem menschlichen Körper zur Bereitstellung von Sauerstoff und wichtigen Nährstoffen und ist unter anderem essentieller Bestandteil der Wundheilung (Folkman *et al.*, 1992). Dieses Prinzip haben sich vor allem solide Tumoren zu Nutze gemacht, um ihr Wachstum aufrecht erhalten zu können. Da Tumorzellen angiogene Faktoren ausschütten, werden umliegende Endothelzellen zur Ausbildung von Gefäßen angeregt. Die neu entstandenen Gefäße führen zur Anbindung des Tumors an das bestehende Gefäßsystem und zur Bereitstellung von Sauerstoff und Nährstoffen.

Im Laufe der letzten Jahre konnte gezeigt werden, dass angiogene und angiostatische Faktoren wie z.B. der Vascular Endothelial Growth Factor (Ferrara *et al.*, 1989), der Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) oder die Angiostatine (Folkman *et al.*, 1995) diese wichtige Rolle in der Physiologie der Angiogenese übernehmen. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten beweisen, dass die gleichen Faktoren Angiogenese innerhalb bestimmter hämatologischer Erkrankungen, unter anderem innerhalb der idiopathischen Myelofibrose und der akuten myeloischen Leukämie (AML), beeinflussen (Martyre *et al.*, 1997; Fiedler *et al.*, 1997). Aufgrund dieser Beobachtungen wurden Analysen an maligne veränderten Zellen der AML durchgeführt, die zeigten, dass einige der oben genannten angiogenen Faktoren in unreifen Vorläuferzellen, den AML-Blasten, vermehrt exprimiert werden (Albitar *et al.*, 2001). Darüber hinaus imponierte eine deutlich höhere Mikrogefäßdichte in Knochenmarksbiopsien von AML-Patienten (Padro *et al.*, 2000).

Wir konnten zeigen, dass ein weiteres, in seiner molekularen Struktur und Wirkungsweise bisher nicht eindeutig verstandenes Rezeptor-Liganden-System an den komplexen Vorgängen der Gefäßneubildung innerhalb der AML beteiligt ist. Es besteht aus den Rezeptoren Robo1 und Robo4 sowie dem Liganden Slit2. Diese werden vor allem von Endothelzellen und neuronalen Zellen gebildet. Aufgrund des gemeinsamen Ursprungs von hämatopoetischer Zelle und Endothelzelle (beide entspringen dem sogenannten Hämangioblasten), untersuchten wir die Expression des Rezeptor- und Ligandensystems in AML-Zellen. Im Mittelpunkt dieser Arbeit standen die Robo-Rezeptoren 1 und 4 sowie seine Liganden Slit2 und Gremlin1 sowie das WAS-Protein, welches eine wichtige Rolle in der intrazellulären Signaltransduktion von Robo zu spielen scheint.

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Robo1 in der Mehrzahl der getesteten AML-Zelllinien exprimiert wird. Ferner konnte bewiesen werden, dass Slit2, natürlicher Ligand des Robo1-Rezeptors, sowohl in humanen umbilikalen venösen Endothelzellen (HUVECs) als auch in AML-Vorläuferzellen synthetisiert wird. Die Expression des endothelspezifischen Rezeptors Robo4 in akuten myeloischen Leukämiezellen konnte jedoch nicht eindeutig dargestellt werden. Lediglich in der qualitativen PCR zeigte sich eine geringe Robo4-Expression. Die Ergebnisse der quantitativen PCR und der Western-Blot-Analyse zeigten eine hohe Diskrepanz, die auch durch Umgestaltung des experimentellen Vorgehens nicht eliminiert werden konnten. In weiteren Experimenten wurde das intrazellulär gelegene Protein WASP und seine aktivierte Form Phospho-WASP in den dargestellten AML-Zelllinien detektiert.

II Einleitung

1 Angiogenese

Das Prinzip der Blutgefäßbildung basiert auf zwei grundsätzlich verschiedenen Vorgängen.

Die Neubildung von Blutgefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen des Knochenmarks wird als Vaskulogenese bezeichnet (Carmeliet *et al.*, 2003). Hiervon zu unterscheiden ist die Angiogenese, bei der Blutgefäße durch Sprouting, sogenanntes Aussprossen und Vermehrung aus bereits vorhandenen Gefäßen hervorgehen.

Angiogenese stellt eine Gefäßneubildung dar, die bei vielen pathologischen Prozessen eine wichtige Rolle spielt. Physiologische Angiogenese im adulten Organismus ist hingegen nur noch während des weiblichen Menstruationszyklus zu beobachten (Rumpold *et al.*, 2004).

2 Zusammenhänge zwischen Angiogenese und Hämatopoese

Aus gemeinsamen Blutinseln des Dottersacks während der Embryogenese entwickeln sich sowohl endotheliale Vorläuferzelle als auch hämatopoetische Stammzelle (His, 1901).

Untersuchungen durch Sabin *et al.* zeigten, dass aus mesodermalen Zellen hervorgegangene Angioblasten die Fähigkeit besitzen, rote Blutkörperchen zu produzieren, also im Sinne einer hämatopoetischen Zelle zu agieren (Sabin *et al.*, 1917).

Ein weiterer Hinweis, dass Angioblast und hämatopoetische Stammzelle eine gemeinsame Vorläuferzelle besitzen, ist die Expression gleicher Antigen determinanten an ihrer

Oberfläche. So exprimieren sie unter anderem CD31 und CD34 (Young *et al.*, 1995; Rumpold *et al.*, 2004). Darüber hinaus gibt es Faktoren wie flk-1, die sowohl Vaskulogenese als auch Hämatopoese beeinflussen (Shalaby *et al.*, 1997). Angio- und Vaskulogenese werden durch angiogene Faktoren wie dem Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), dem Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Angiopoetin-1, dem Insulin-like Growth Factor (IGF-1), dem Epidermal Growth Factor, dem Tumornekrosefaktor TNF-alpha und Interleukin 8 (IL-8) maßgeblich gesteuert (Folkman *et al.*, 1992; Schott *et al.*, 1993).

Endotheliale und hämatopoetische Zelle gehen eine auto- und parakrine Interaktion ein, die vorrangig durch angiogene Faktoren getriggert wird. Darüber hinaus weisen Endothelzelle und zirkulierende Blutzellen viele strukturelle Gemeinsamkeiten auf (Lin *et al.*, 2000), die zeigen, dass beide Zellentitäten am ehesten aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle entstehen.

3 Angiogenese bei hämatologischen Krebserkrankungen

Neben entzündlichen Erkrankungen ist ein erhöhter Umsatz der Angiogenese vor allem in der Pathophysiologie solider Tumoren zu finden. Angiogenese dient in diesem Zusammenhang der Bereitstellung wichtiger Nährstoffe und Wachstumsfaktoren, da Tumoren ab einer Größe von 1-2 mm³ nicht mehr nur über Diffusion ernährt werden können (Folkman *et al.*, 1990; Carmeliet *et al.*, 2000). Benötigt ein solider Tumor Anschluss an ein bestehendes Gefäßsystem zur Versorgung mit Nährstoffen oder zur Expansion in das umliegende Gewebe, schütten Tumorzellen vermehrt angiogene Faktoren aus, die an Endothelzellen gebunden werden. Es folgt die Ausbildung von Gefäßen. Wichtige angiogene Faktoren in diesem Zusammenhang sind die Mitglieder der VEGF-, bFGF- und Transforming Growth Factor-Beta-Familie (Folkman *et al.*, 1995; Josko *et al.*, 2000). Einen angiostatischen Faktor stellt unter anderem Endostatin dar (O'Reilly *et al.*, 1994). Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass diese Faktoren auch eine wesentliche Rolle in der Pathophysiologie bestimmter hämatologischer Erkrankungen spielen. So wurde beobachtet, dass bFGF in Zellen von Patienten mit Myelofibrose (Martyre *et al.*, 1997), Interleukin-8 in lymphoiden Leukämien (Tobler *et al.*, 1993) und VEGF in Blutzellen von AML-Patienten (Albitar *et al.*, 2001) vermehrt exprimiert werden. Folge der erhöhten Expression von VEGF, VEGFR-1 und VEGFR-2 in Blutzellen von Patienten mit manifester AML ist eine vermehrte Vaskularisierung des leukämisch veränderten Knochenmarks (Padro *et al.*, 2000). Wird VEGF durch AML-Blasten vermehrt ausgeschüttet, nehmen Endothelzellen des umliegenden Knochenmarks diesen Faktor auf und werden stimuliert. Dieser Vorgang hat zur Folge, dass

Endothelzellen hämatopoetische Wachstumsfaktoren ausschütten, die daraufhin AML-Zellen zur Proliferation und Migration anregen (Fiedler *et al.*, 1997; Dias S. *et al.*, 2000). In klinischen Studien konnte darüber hinaus ein Zusammenhang zwischen der Expression bestimmter angiogener Faktoren und der Prognose des Patienten bewiesen werden. So zeigten an AML-erkrankte Patienten mit erhöhten Konzentrationen von Angiopoetin-2 eine deutlich schlechtere Prognose als ihre Kontrollgruppe ohne Expression des Angiopoetin-2-Gens (Hou *et al.*, 2008). Sprach der Patient auf die Polychemotherapie an, ging dies in vielen Fällen mit einer Reduzierung der Mikrogefäßdichte im Knochenmark einher (Padro T. *et al.*, 2000; Padro T. *et al.*, 2002). Antiangiogen wirkende Medikamente wie Thalidomid, das bereits im klinischen Alltag von großem Nutzen ist, verdeutlichen, wie wichtig es ist, weitere endothelspezifische Liganden und Rezeptoren, die Einfluss auf die Tumorangio-genese der AML nehmen, zu untersuchen und zu verstehen, um gegebenenfalls neue therapeutische Ansätze formulieren zu können.

4 Leukämie

Leukämie steht für eine Gruppe maligner Erkrankungen des blutbildenden Systems, die erstmals durch den Berliner Arzt und Pathologen Rudolph Virchow Mitte des 19. Jahrhunderts beschrieben wurde. Gemeinsames Merkmal aller Leukämien ist die Transformation einer hämatopoetischen Stammzelle. Je nach Zellart der sich ungehindert proliferierenden Vorläuferzelle differenziert man zwischen lymphatischen und myeloiden Leukämien. Darüber hinaus werden je nach Krankheitsverlauf eine akute und chronische Form voneinander unterschieden.

Ursachen der einzelnen Leukämieformen sind vielfältig und nicht immer eindeutig zuzuordnen. Ionisierende Strahlung, genetische Erkrankungen, Chemikalien und Lebensgewohnheiten scheinen eine wichtige Rolle zu spielen (Begemann *et al.*, 1999).

Aussagen zu Inzidenz und Prävalenz einzelner Leukämieformen für die Bundesrepublik Deutschland sind nur schwer zu erheben, da es vor allem für Erwachsene kein überregionales Krebsregister gibt. Anhand der Publikation „Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends“ des Robert-Koch-Instituts lässt sich für das Krankheitsbild der Leukämie etwa 9300 Neuerkrankungen im Jahre 2006 feststellen. Insgesamt sind Männer häufiger betroffen als Frauen, wobei diese Geschlechtsverteilung bei der CML und CLL am ausgeprägtesten ist. Die einzelnen Leukämietypen weisen eine altersspezifische Verteilung auf. So bildet die ALL die häufigste Leukämieform bei Kindern, wohingegen die CLL im Kindesalter äußerst selten

vorkommt. Mit einer Inzidenz von 4,3 neu diagnostizierten Fällen pro 100.000 Einwohner pro Jahr in den USA bei kontinuierlichem Anstieg im höheren Alter stellt die AML nach der CLL die zweithäufigste Leukämieform dar (Hellenbrecht *et al.*, 2003).

Häufige klinische Symptome sind Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust sowie Abgeschlagenheit, Blässe und Infektanfälligkeit (Herold *et al.*, 2008).

Aufbauend auf Anamnese, körperlicher Untersuchung und Anfertigung eines Blutbildes wird der Verdacht auf eine hämatologische Erkrankung im Sinne einer Leukämie gestellt. Im Vordergrund stehen die quantitativen Veränderungen der drei Zellreihen der Hämatopoese. Im weiteren Verlauf dient das Differentialblutbild dem Erkennen von morphologischen Veränderungen der wenig- bis undifferenzierten Vorläuferzellen im peripheren Blut. Darüber hinaus wird der Anteil blastärer, unreifer Zellen im Serum bestimmt, um so auch eine Unterscheidung zwischen akuter und chronischer Form treffen zu können. Entscheidend zur Sicherung der Diagnose ist die Knochenmarksbiopsie nach Jamshidi (Jamshidi *et al.*, 1971). Das gewonnene Biopsat wird nach morphologischen, zytogenetischen und molekularchemischen Gesichtspunkten untersucht und dem entsprechenden Subtyp zugeordnet.

5 Akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie basiert auf genetischen Mutationen hämatopoetischer Vorläuferzellen (Ehninger *et al.*, 2008). Folge ist die Expansion myeloischer Vorläuferzellen im peripheren Blut und Knochenmark, die zur Verdrängung der physiologischen Blutbildung führt (Ehninger *et al.*, 2008).

Die Ätiologie der AML ist vielfältig. Die zur Transformation der Zelle benötigte genetische Aberration wird entweder im Laufe des Lebens erworben oder präsentiert sich bereits als kongenitale Erkrankung im Sinne einer Prädisposition zur Entwicklung einer AML. In diesem Zusammenhang ist vor allem das Down-Syndrom zu nennen, das bei Kindern mit einer Häufigkeit von 1:100 zur Megakaryoblasten-Leukämie, einer Unterform der AML, führen kann (Hasle, 2000; Cavani *et al.*, 1998).

Basiert die Erkrankung auf Veränderungen der Hämatopoese aufgrund eines myelodysplastischen Syndroms (MDS), so spricht man von einer sekundären AML. Die MDS-Erkrankung fasst eine Gruppe heterogener, erworbener Stammzellerkrankungen zusammen, die mit Knochenmarksdysplasien, erhöhtem Blastenanteil und einer Reduzierung blutbildender Zellen im Knochenmark einhergeht (Aul *et al.*, 1994). Eine AML, die aufgrund

einer Bestrahlungs- oder Chemotherapie entstanden ist, gehört ebenfalls zur Gruppe der sekundären Leukämien (Lawler *et al.*, 1997).

Liegt der AML keine ursächliche Erkrankung zugrunde, wird der Begriff primäre AML verwendet. Auslösende Faktoren einer primären AML können ionisierende Strahlen (Mitchel *et al.*, 1999), der Kohlenwasserstoff Benzol (Hutt *et al.*, 1996), organische Lebensmittel oder Infektionen mit Retroviren sein, die vor allem bei Mäusen als Auslöser einer AML nachgewiesen werden konnten (Largaespada *et al.*, 2000).

Wie die meisten Krebserkrankungen basiert auch die AML auf genetischen Veränderungen und Translokationen gesunder Zellen. Mutieren Gene, die für die Regulierung von Zellwachstum, Zellausreifung und Apoptose verantwortlich sind, verliert die gesunde Zelle ihre ursprünglichen Eigenschaften. Differenzierungsblock und unkontrolliertes Wachstum sind Folgen dieser Veränderungen. Von den Mutationen betroffen sind vor allem Transkriptionsfaktoren, sogenannte Proto-Onkogene, die die hämatopoetische Differenzierung der Zelle steuern.

Die verschiedenen AML-Formen benötigen eine Vielzahl an hämatopoetischen Wachstumsfaktoren, die durch autokrine Mechanismen zur Verfügung gestellt werden (Young *et al.*, 1986).

Die Inzidenz der AML liegt bei 4,3 Neuerkrankungen pro 100.000 Personen pro Jahr mit einem leichten Übergewicht an Männern (Hellenbrecht *et al.*, 2003). Patienten mit AML weisen meist unspezifische Symptome auf, die entweder schleichend oder akut auftreten können (Dietel *et al.*, 2005). Aufgrund der hämatopoetischen Insuffizienz als Folge der Knochenmarksinfiltration durch maligne Blasten ist das Krankheitsbild durch die folgende Symptomatik charakterisiert: Durch Verdrängung einer funktionsfähigen Granulopoese entwickelt der an AML-erkrankte Patient eine gesteigerte Infektanfälligkeit für bakterielle Mikroorganismen und Mykosen. Müdigkeit, Blässe und Dyspnoe sind Folgen der Anämie. Die beginnende Thrombozytopenie zeichnet sich durch Verbrauchskoagulopathien und petechiale Blutungen aus (Herold *et al.*, 2008). Ein Drittel der Patienten entwickeln im Verlauf eine Lymphadenopathie.

Die im klinischen Alltag immer seltener eingesetzte French-American-British-Klassifikation (FAB) dient der Einteilung der verschiedenen AML-Entitäten. Unter Berücksichtigung der Morphologie und Zytochemie der Blastenpopulation und dem Anteil reifer, myeloischer Zellen werden die akuten, myeloischen Leukämien in M0 bis M7 eingeteilt (Bennett *et al.*, 1976). Darüber hinaus werden immunologische und elektronenmikroskopische Eigenschaften zur Klassifizierung herangezogen. Eine weitere Möglichkeit zur Einteilung der AML stellt die

WHO-Klassifikation dar. Sie berücksichtigt vor allem die genetische Determinante der akuten myeloischen Leukämie, die erheblichen Einfluss auf Verlauf und Prognose der AML-Erkrankung nimmt (Jaffe *et al.*, 2001).

Beweisend für die Diagnose einer AML ist der Nachweis eines Blastenanteils von über 20 % nach WHO im Knochenmark und eine Zuordnung der Blasten zur myeloischen Reihe durch Nachweis der Myeloperoxidase (Gökbuget *et al.*, 2005; Ehninger *et al.*, 2008). Allein die unreifen Blasten im Blut und Knochenmark des Patienten dienen der Diagnosesicherung. Die reine Leukozytenzahl im peripheren Blut trägt nicht zur Diagnose bei, da sie sowohl erhöht, normal oder erniedrigt sein kann. Immerhin verlaufen 40 % aller akuten Leukämien aleukämisch (Dietel *et al.*, 2005). Eine erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit, vermehrte Harnsäure und eine gesteigerte Laktatdehydrogenase zeigen lediglich einen von der Norm abweichenden Zellumsatz im Organismus an. Sie sind nicht spezifisch für die akute myeloische Leukämie und bilden lediglich die Grundlage für eine weiterführende, hämatologische Diagnostik.

Basis einer jeden AML-Therapie ist die Polychemotherapie. Im Vordergrund steht hier die risikoadaptierte Therapie nach Protokollen, z.B. nach der Deutschen AML Cooperative Group (AMLCG). Ziel der Polychemotherapie ist das Erreichen einer kompletten Remission. Die komplette Remission ist gekennzeichnet durch eine Normalisierung von Blutbild und Knochenmark und Verschwinden eventueller extramedullärer Manifestationen. Nach den Kriterien der internationalen Konsensuskonferenz bedeutet dies im Speziellen: Keine Blasten im peripheren Blut, Regeneration der Hämatopoese mit Thrombozyten $> 100.000/\mu\text{l}$ und Neutrophilen $> 1.000/\mu\text{l}$, Blastenanteil im Knochenmark $< 5\%$, keine extramedulläre Manifestation nachweisbar und keine transfusionsbedürftige Anämie (Gökbuget *et al.*, 2005). Nach Eintritt einer kompletten Remission durch die Induktionstherapie folgt ein weiterer Zyklus einer Polychemotherapie sowie eine intensiverte Konsolidationstherapie, die entweder als allogene bzw. autologe Stammzelltransplantation oder als Polychemotherapie durchgeführt wird, um ein Rezidiv der Erkrankung dauerhaft zu vermeiden (Schaich *et al.*, 2008).

Trotz der Möglichkeit verschiedener Therapieschemata ist die Prognose der akuten myeloischen Leukämie sehr ernst. Die Langzeitüberlebensrate von Patienten über 60 Jahre liegt nicht einmal bei 20 %. Ist der Patient unter sechzig Jahre alt, beläuft sie sich gerade einmal auf 40 %. Bei etwa 15 % aller an AML erkrankten Erwachsenen bis 60 Jahre stellt sich nach Induktionstherapie eine refraktäre AML ein, die mit einer sehr schlechten Prognose einhergeht (Schlenk *et al.*, 2003).

Neben der Anwendung konventioneller Chemotherapeutika hat sich deshalb eine Gruppe von Substanzen etabliert, die bei bestimmten Subtypen der AML zum Einsatz kommen.

Ein Target stellt die Gefäßversorgung des leukämisch veränderten Knochenmarks dar. Antiangiogen wirkende Substanzen stellen infolgedessen eine wichtige Gruppe von Arzneimitteln dar, die zur Unterdrückung einer vermehrten Vaskularisierung beitragen können. Ein Beispiel unter vielen ist SU5416, ein unspezifischer Inhibitor des Rezeptor-Tyrosin-Kinase c-kit, FLT-3 sowie VEGFR-1 und VEGFR-2. In einer Phase-II-Studie mit SU5416 an 43 Patienten mit fortgeschrittener AML wurde eine komplette sowie sieben partielle Remissionen beobachtet, die zum Teil auf die Inhibierung des VEGFR-2 zurückzuführen waren (Fiedler *et al.*, 2003). Ähnliche Erfolge konnten mit dem in vielen Kliniken bereits umfangreich eingesetzten Thalidomid erzielt werden. Untersuchungen im Mausmodell zeigten einen antiangiogenen Effekt im tumorös veränderten Gefäßsystem (D'Amato *et al.*, 1994). In einer Phase-I/II Studie mit Thalidomid an zwanzig Patienten mit refraktärer oder nicht intensiv behandelter AML beobachteten Steins *et al.* 2002 vier Patienten mit partieller Remission und einen mit Blutbildverbesserung. Die Gefäßdichte im Knochenmark bei diesen Patienten zeigte sich deutlich rückläufig. Infolgedessen ist es von großer Bedeutung, weitere Rezeptor-Liganden-Systeme, die Einfluss auf die Angiogenese nehmen, zu erforschen. Hierzu gehört vor allem das im folgenden Abschnitt beschriebene Rezeptor-Liganden-System Robo.

6 Das Rezeptor-Liganden-System Robo

6.1 Einleitung

Laut Legg und Kollegen konnten in Untersuchungen an neuronalen Strukturen vier Gruppen von Molekülen identifiziert werden, die Ephrin/Eph-Rezeptoren, die Delta/Notch-Rezeptoren, die Netrin/Unc- Rezeptoren sowie die Slit-Liganden und Robo-Rezeptoren, aus denen jeweils mindestens ein Mitglied im Laufe der Jahre in endothelialen Zellen gefunden wurde (Legg *et al.*, 2008). Faktoren des Slit/Robo-Signalweges spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung und Regulierung pathologischer Gefäßneubildungen während der Entwicklung und Transformation solider Tumoren.

Im Folgenden werden die wichtigsten Rezeptoren und Liganden der Roundabout-Familie näher beschrieben. Zunächst stehen Struktur und molekulare Wirkungsweise der Robo-

Mitglieder im Vordergrund. Im weiteren Verlauf wird der Fokus auf das Verhalten der Faktoren bei pathologischen Prozessen, insbesondere der Tumorangiogenese gelegt.

6.2 Robo1

Bis heute sind vier Robo-Rezeptor-Proteine bekannt, Robo1-4, die einer kleinen Gruppe der Immunglobulin-Superfamilie angehören. Robo1 ist ein großer, transmembranegebundener Oberflächenrezeptor, der durch fünf Ig-ähnliche Domänen, drei Fibronectin-TypIII-Segmente und ein Robo-spezifisches Cytoplasma-Motiv charakterisiert ist (Kidd *et al.*, 1998).

Robo1 wurde erstmals aus longitudinalen Axonen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* extrahiert (Kidd *et al.*, 1998). Während der Neurogenese ist der Robo1-Rezeptor entscheidend beteiligt an der abstoßenden Wirkung auf Faszikulation und Mittellinienkreuzung von Axonen im zentralen Nervensystem (Kidd *et al.*, 1998; Rajagopalan *et al.*, 2000; Simpson *et al.*, 2000). Sabatier *et al.* beschrieben 2004 die Expression eines ähnlich strukturierten Robo-Rezeptors in Axonen des Gehirns von Säugetieren (Sabatier *et al.*, 2004). Natürlicher Ligand des Rezeptors und verantwortlich für die hemmende Wirkung auf axonale Strukturen ist das Protein Slit2, auf das später näher eingegangen wird. Neben den Ig-Domänen und dem Fibronectin-TypIII-Segment setzt sich der Robo-1-Rezeptor aus vier Cytoplasmamotiven, CC0, CC1, CC2 und CC3 zusammen (Kidd *et al.*, 1998). Es gibt zwei Möglichkeiten des Splicings, variiert wird jeweils am N-Terminus der Aminosäuresequenz (Übersichtsarbeit Legg *et al.*, 2008). Die Ig-Domänen des Robo-Rezeptors dienen der Bindung von Slit (Liu Z *et al.*, 2004; Hohenester *et al.*, 2006).

Jüngste Untersuchungen haben gezeigt, dass Robo1 neben seiner regulierenden Wirkung auf neuronale Strukturen eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie solider Tumoren spielt. So wurde eine Inaktivierung des Rezeptors in frühen Stadien des invasiven Zervixkarzinoms gefunden (Narayan *et al.*, 2006). Der dieser Inaktivierung zugrundeliegende Mechanismus der Hypermethylierung wurde auch in Tumorzellen des Mamma- und Nierenzellkarzinoms beobachtet (Dallol *et al.*, 2002). Realtime-PCR-Untersuchungen von Tumorzellen aus 48 Prostatakarzinomen zeigten ebenfalls ein vermindertes Expressionsmuster (Latil *et al.*, 2003). Studien der Arbeitsgruppe Gröne *et al.* bewiesen, dass Robo1 in Tumorzellen des kolorektalen Karzinoms überexprimiert wird. So ergaben Untersuchungen an Patienten mit fortgeschrittenem Darmkrebs einen signifikanten Anstieg der Robo1-Konzentrationen in Tumorzellen bei 50 % der Probanden (Gröne *et al.*, 2006).

Wang *et al.* bewiesen, dass Robo1 in Zellen des Gefäßsystems von malignen Melanomen, nicht aber in Endothelzellen des umliegenden gesunden Gewebes vorkommt, womit ein

Zusammenhang zwischen Angio- und Tumorgenese veranschaulicht werden konnte. Die Arbeitsgruppe um Wang *et al.* zeigte, dass das von Tumorzellen des malignen Melanoms produzierte Slit2 mit dem auf Tumorendothelzellen lokalisierten Robo1-Rezeptor kommuniziert, um die Tumorangio-genese anzuregen (Wang *et al.*, 2003).

Obwohl verschiedene Arbeitsgruppen das Vorhandensein von Robo1 in Endothelzellen bewiesen haben (Wang *et al.*, 2003; Sheldon *et al.*, 2009), scheint die Funktion des Robo1-Rezeptors in Endothelzellen der Tumorangio-genese nicht eindeutig geklärt zu sein.

6.3 Robo4

Robo4 wurde bei der Suche nach gewebespezifischen Genen entdeckt (Huminiecki *et al.*, 2002). In seiner molekularen Struktur zeigt der auch als Magic Roundabout bezeichnete Rezeptor deutliche Unterschiede zu seinen Geschwistern. Die extrazelluläre Domäne besteht lediglich aus je zwei Immunglobulin-Domänen (Morlot *et al.*, 2007). Die anderen Robo-Rezeptoren verfügen hingegen über fünf Ig- und drei Fn-Domänen. Die intrazelluläre Domäne des Robo4-Rezeptors hat im Gegensatz zu Robo1 das CC1- und CC3-Motiv verloren und setzt sich stattdessen aus einem CC0- und dem CC2-Motiv zusammen, wie Legg und Kollegen in einer Übersichtsarbeit zusammenfassen (Legg *et al.*, 2008).

Unabhängig voneinander postulierten Huminiecki *et al.* 2002 sowie Park *et al.* 2003, dass Robo4 ausschließlich in Zellen des Endothels exprimiert wird. Innerhalb der embryonalen Entwicklung trägt Robo4 zur Vaskularisierung des Gefäßsystems bei (Park *et al.*, 2003). Während der Anteil an Robo4 im embryonalen Gefäßsystem erhöht ist, zeigt sich ein stetiger Abfall der Konzentrationen im adulten Organismus. In weiteren Untersuchungen stellte sich heraus, dass Robo4 in Endothelzellen von Tumoren des Gehirns, der Brust, der Nieren und der Blase vorhanden ist, nicht jedoch in Gefäßzellen des gesunden Gewebes (Seth *et al.*, 2005). In kolorektalen Karzinomen wurden erhöhte mRNA-Spiegel von Robo4 gefunden. Immunhistochemisch wurde der Rezeptor im Endothel des Kolonkarzinoms detektiert (Gröne *et al.*, 2006).

Die Wirkung von Robo4 auf die Angio-genese wird jedoch kontrovers diskutiert. Es ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt, ob der Rezeptor die Entwicklung des Gefäßsystems in Säugetieren fördert oder hemmt. Ebenfalls ist unklar, wie sich Robo4 während der Tumorgenese verhält. Hier scheint jedoch vorrangig die Meinung zu bestehen, dass Robo4, im Gegensatz zu Robo1, primär inhibitorisch auf ein bestehendes Tumorgefäßsystem wirkt. So demonstrierten Park *et al.*, dass Robo4 nach Bindung von Slit2 die Migration und Proliferation von HEK-Zellen und Tumorendothelzellen *in vitro* unterdrückt (Park *et al.*,

2003). Andere Studien zeigten, dass Robo4 *in vitro* auch inhibitorisch auf Zellen des Endothels wirken kann (Suchting *et al.*, 2005).

6.4 Slit2

Mitglieder der Slit-Protein-Familie wurden unter anderem durch Rothberg *et al.* beschrieben, die mittels Blotting-Verfahren cDNA aus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* extrahierten (Rothberg *et al.*, 1988). Bei Vertebraten sind drei Slit-Proteine bekannt, Slit1-3. Es handelt sich um große Glykoproteine mit einer Leucin-reichen Region (LRR). Diese Region bindet an die Immunglobulin-Region der Roundabout-Rezeptoren 1-3 (Battye *et al.*, 2001; Hohenester *et al.*, 2006). Natürlicher Ligand des Robo1-Rezeptors ist Slit2 (Brose *et al.*, 1999). Neben der Organisation neuronaler Strukturen spielt die Interaktion zwischen Slit2 und Robo1 eine wichtige Rolle in der Inhibierung von Chemokin-induzierter Leukozyten-Chemotaxis (Wu *et al.*, 2001).

Untersuchungen der letzten Jahre ergaben, dass die Interaktion von Slit2 und Robo1 ebenfalls Einfluss auf Wachstum, Organisation und Metastasierung solider Tumoren ausüben kann (Schmid *et al.*, 2007). Wang *et al.* stellten fest, dass Robo1 in Tumorendothelzellen, Slit2 hingegen ausschließlich in umliegenden Tumorzellen exprimiert wurde.

In Versuchen an Mäusen beobachtete die Arbeitsgruppe um Wang, dass eine Inhibierung von Slit2 zur Reduzierung von Tumormasse und Gefäßdichte führt (Wang *et al.*, 2003).

Dallol *et al.* konnten zeigen, dass Slit2 die Funktion eines Tumorsuppressorgens übernimmt und in Tumoren der Lunge, der Brust und des Kolorektums vermehrt inaktiviert vorliegt (Dallol *et al.*, 2002).

6.5 Gremlin1

Das auch unter dem Namen Drm (Down-regulated by v-mos) bekannte Gremlin gehört zur Familie der Dan-Proteine (Pearce JJ *et al.*, 1999). Gremlin1 übt eine antagonistische Wirkung auf Mitglieder der Bone-Morphogenetic-Protein-Familie (BMPs) aus. Signalproteine der BMP-Gruppe gehören zur Superfamilie der TGF- β -Wachstumsfaktoren. Sie sind neben dem Knochenwachstum auch für die embryonale Hämatopoese verantwortlich (Huber *et al.*, 1998).

Gremlin1 ist in der Lage, BMP2, BMP4 und BMP7 aktiv zu binden, um so die Interaktion mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche zu inhibieren (Hsu *et al.*, 1998). Dieser Mechanismus spielt eine wichtige Rolle in der Embryogenese und Entwicklung bestimmter Krankheitsbilder (Lappin *et al.*, 2002). Neben der Bindung von Faktoren der Bone Morphogenetic Protein-

Familie scheint Gremlin1 durch einen von BMP unabhängigen, intrazellulären Mechanismus eine positive Wirkung auf die Migration und das Wachstum endothelialer Zellen unter bestimmten experimentellen Bedingungen zu entfalten (Stabile *et al.*, 2007).

Der Signalweg wird durch Bindung an YWHAH, dem Tyrosine-3-Monooxygenase/tryptophan-5-Monooxygenase-Activation-Protein, eingeleitet. Intrazellulär wird das p21-Protein überexprimiert, p42/44-Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) hingegen herunterreguliert (Namkoong *et al.*, 2006).

Neben der Interaktion mit BMP und YWHAH besitzt Gremlin1 die Fähigkeit, mit Slit1 und Slit2 zu interagieren (Chen *et al.*, 2004).

Weitere Analysen zeigten, dass Drm/Gremlin1 in Endothelzellen humaner Lungentumoren überexprimiert wird (Namkoong *et al.*, 2006). Darüber hinaus findet sich das Protein vermehrt in Karzinomen der Zervix, der Niere, der Brust und des Kolons. Dies lässt auf seine Bedeutung in der Genese solider Tumoren schließen und bildet mit den Faktoren der Bone-Morphogenetic-Proteine ein wichtiges therapeutisches Target.

6.6 WASP

Invasion und Metastasierung solider Tumoren beruhen im Wesentlichen auf dem Prinzip der Zellmigration. Primärer Mechanismus der Migration ist die Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts innerhalb einer Zelle. Rho, Rac und Cdc42 stellen intrazelluläre GTPasen aus der Familie der Rho-Proteine dar, die aktiv am Umbau des Cytoskeletts beteiligt sind.

Das intrazellulär gelegene Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (WASP) spielt in diesem Zusammenhang eine Schlüsselrolle in der Weitergabe extrazellulärer Stimuli und Rho-abhängiger Signale an Strukturen des Aktin-Cytoskeletts (Takenawa *et al.*, 2001).

Bis heute sind fünf Mitglieder der WASP-Familie bekannt: N-WASP (neuronales WASP), WASP und Wave 1, 2 und 3. Während NWASP und Wave ubiquitär vorkommen, ist WASP ausschließlich in hämatopoetischen Zellen anzutreffen. Analysen durch Sheldon *et al.* haben gezeigt, dass WASP in geringen Konzentrationen auch in HUVECs exprimiert wird und eine Bindung mit der intrazellulären Domäne des Robo4-Rezeptors eingeht. Über den WASP-Signalweg scheint Robo4 regulatorisch auf das Aktin-Cytoskelett der Zelle einwirken zu können (Sheldon *et al.*, 2009). Die aktivierte Form des WAS-Proteins stellt das phosphorylierte WASP dar (Phospho-WASP).

7 Methoden

7.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung von Nukleinsäuren und stellt heute eine der wichtigsten Instrumente zur qualitativen und quantitativen Analyse von DNA und RNA dar. Sie beruht auf dem Prinzip der Denaturierung, Hybridisierung und Elongation von Nukleinsäurefragmenten (Mullis *et al.*, 1985).

Zu Beginn jeder PCR wird der DNA-Doppelstrang durch Aufschmelzen (Denaturieren) bei einer Temperatur von 95 °C in zwei Einzelstränge zerlegt. Die Einzelstränge dienen als Vorlage für die Vervielfältigung einer ausgewählten Nukleotidsequenzabfolge. Durch Primerpaare, die sich aus Desoxyribonukleotiden zusammensetzen, wird die Spezifität des Amplifikats gesichert. Diese lagern sich bei einer Temperatur von 60 °C komplementär an ihre Zielsequenz. Nach erfolgter Bindung kann die Taq-Polymerase, eine außerordentlich hitzebeständige Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus*, bei einer Temperatur von 72 °C an die Startsequenz des Primers binden und mit der Amplifikation (Vervielfältigung) beginnen. Eine Wiederholung dieses Zyklus führt zur exponentiellen Zunahme des Amplifikats.

Die Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) dient der Vervielfältigung von Nukleinsäuren und der Quantifizierung gewonnener DNA. Die Methode beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen, qualitativen Polymerase-Kettenreaktion, aber zusätzlich findet eine Mengenbestimmung der amplifizierten DNA statt. Mithilfe der RT-PCR können aus einem Pool von Nukleinsäuren spezifische Sequenzabfolgen von geringer Konzentration selektiv amplifiziert werden. Diese Quantifizierung wird innerhalb der Reaktion mittels Fluoreszenz durchgeführt und ist das herausragende Merkmal der quantitativen PCR. Während eines Zyklus nimmt die Fluoreszenz proportional zur Menge des PCR-Produkts zu. Die unterschiedliche Adsorption des fluoreszierenden Lichtes ist im Folgenden messbar. Die Quantifizierung erfolgt dann jeweils am Ende eines Laufes (in der sog. exponentiellen Phase), der sich in der Regel aus 40 Zyklen zusammensetzt. Ein parallel zur Probe eingesetzter Standard mit bekannter Sequenz dient der Kontrolle und Quantifizierung der zu untersuchenden Proben

7.2 Western-Blot-Verfahren

Die SDS-Gelelektrophorese dient dazu, das Gesamtprotein einer Zelle oder einzelne Fragmente des Proteins nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Das anionische

Detergenz Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) bindet dabei an das Polypeptidgerüst der Proteine und erzeugt so eine negative Ladung im Protein. Das Anlegen einer elektrischen Spannung führt daraufhin zur Wanderung der negativ-geladenen Proteine zur Anode. Je nach Molekulargewicht legen die Proteine eine unterschiedliche Wegstrecke zurück. Auf diese Weise können die Proteine aufgetrennt werden. Zum Abschluss erfolgt die Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran. Sie dient der Konservierung des Produkts. Die Immundetektierung findet mittels Antikörper statt.

III Material & Methoden

1 Material

1.1 Chemikalien & Medizinprodukte

Tab.1 Chemikalien und Medizinprodukte

Bezugsquelle	Chemikalie/ Medizinprodukt
AppliChem, Darmstadt	Ethidiumbromid
BIORAD, Hercules (USA)	DyeReagenz
Fermentas, Martinsried	5x Loading Buffer
	Generuler (DNA ladder)
	Pageruler (Protein ladder)
GE Healthcare, Chalfont (GB)	Amersham Hyperfilm ECLplus
	ECLplus
	Ready-To-Go™ You-Prime First-Strand Beads
GIBCO BRL, Paisley (GB)	1kb ladder (DNA ladder)
Invitrogen, Karlsruhe	NuPage 4-12% Bis-Tris Gel
	MES-Puffer
	MOPS-Puffer
Merck, Darmstadt	EDTA
QIAGEN GmbH, Hilden	QIAfilter Plasmid Maxi Kit
	RNeasy Mini Kit
Roche, Mannheim	LightCycler® DNA Master SYBR Green I
Roth, Karlsruhe	Aceton
	Bovines Serum Albumin (BSA)
	Glycin
	Milchpulver
	Propandiol
Sigma-Aldrich, St.Louis (USA)	Ampicillin-Stammlösung
	β-Mercaptoethanol

	DTT
	REDTaq™ ReadyMix™ PCR Reaction Mix
	RIPA Puffer
	Tris
	Tween20
Thermo-Scientific, Waltham (USA)	Stripping Puffer

1.2 Laborgeräte

Tab.2 Verwendete Laborgeräte

Bezugsquelle	Produkt
Amersham Pharma, Freiburg	Entwickler Hyperprocessor
Beckmann, München	Centrifuge IL-HS
Biometra, Martinsried	Thermocycler
BIO-RAD, Hercules (USA)	Gelkammer DNA Subcell
	Spannungsgerät Model 100/500
	Transferzelle Mini Protean II
B.Braun Biotech, Melsungen	Certomat IS
Consort NN, Tornout (Belgien)	Spannungsgerät E443
Edmund Bühler, Hechingen	Schüttler KM-2
Eppendorf, Hamburg	Centrifuge 5804 R
	Centrifuge 5415 D
	Biophotometer
Hirschmann Laborgeräte, Heilbronn	Pipettus-Akku Pipettierhilfe
Invitrogen, Karlsruhe	Elektrophoresekammer Novex Minicell
Roche, Mannheim	Lightcycler
Schott Geräte, Ludwigshafen	pH-Meter CG811
Stratagene, La Jolla (USA)	Fotokammer Eagle Eye II

1.3 Verwendete Antikörper

Tab.3 Primäre Antikörper

Humanes Antigen	Markierung	Isotyp	Klon	Anwendung	Bezugsquelle
Robo1	-	Goat IgG	-	Immunoblot	Santa Cruz Biotechnology, S. Cruz (USA)
Robo4	-	Rabbit IgG	-	Immunoblot	Abcam Inc., Cambridge (USA)
Slit2	-	Goat IgG	-	Immunoblot	Santa Cruz Biotechnology, S.Cruz (USA)
Gremlin	-	Rabbit IgG	RB2060	Immunoblot	Abgent, San Diego (USA)
WASP	-	Rabbit igG	-	Immunoblot	BETHYL Inc., Montgomery (USA)

Tab.4 Sekundäre Antikörper

Antigen	Markierung	Isotyp	Klon	Anwendung	Bezugsquelle
Anti-Rabbit Ak	-	-	-	Immunoblot	DAKO,Glostrup (Dänemark)
Anti-Goat Ak	-	-	-	Immunoblot	DAKO,Glostrup (Dänemark)
Anti-Mouse Ak	-	-	-	Immunoblot	DAKO,Glostrup (Dänemark)

1.4 Verwendete Primer

Tab.5 Verwendete Primer

Primer	Sequenz	Bezugsquelle
hRobo1	5` - GGT GTC TGG GCA ATG AAA CT- 3` 3` - CCA CAG ACC CGT TAC TTT GA- 5`	Eurofins MWG, Ebersberg
hRobo4	5` - TTT TTA TGG CTC CCT CAT CG- 3` 3` - AAA AAT ACC GAG GGA GTA GC- 5`	Eurofins MWG, Ebersberg
hGremlin1	5` - ACT CTC GGT CCC GCT GAC - 3` 3` - TGA GAG CCA GGG CGA CTG - 5`	Eurofins MWG, Ebersberg
hSlit2	5` - TGT GCG TTT GCT TTC TTT GT - 3` 3` - ACA CGC AAA CGA AAG AAA CA - 5`	Eurofins MWG, Ebersberg

1.5 Verwendete cDNA-Klone

Tab.6 Verwendete cDNA-Klone

Name	Vektor	Spezies	Bezugsquelle
Robo1	pCR-XL-TOPO	Human	Biocat, Heidelberg
Robo4	pCMV-SPORT6	Human	Biocat, Heidelberg
Slit2	-	Human	Open Biosystems, Huntsville (USA)
Gremlin1	pCR4-TOPO	Human	Open Biosystems, Huntsville (USA)

1.6 Lösungen & Medien

Lösungen, Medien

Agarosegellösung: 1,5 % Agarose in 1x TAE-Puffer

Elektrophoreselösung: 35 ml MOPS-Puffer; 665 ml Aqua dest

LB-Medium: 10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; pH 7; 50 µg/ml Ampicillin

Magermilchlösung: 5% Magermilchpulver in TBS-T

Primäre Antikörperlösung: 5µl Polyklonaler Antikörper in TBS-T

Proteintransferlösung: 1,00 M Tris (12,14g/l); 1,93 M Glycin (14,5g/l)

Sekundäre Antikörperlösung: 5µl Sekundärer Antikörper in 5-%iger Magermilch

TAE-Puffer: 40 mM Trisacetat; 5 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA; pH 7,4

TBS-T (Tris Buffered Salin-Tween): 200 mM Tris; 1,37 mM; pH 7,6 HCL; 1 ml Tween 20

1.7 Zelllinien & Patientenmaterial

AML-Zelllinien

HL-60

etabliert aus peripherem Blut einer 35-jährigen Frau mit AML (FAB M2), 1976.

Referenzen: Collins *et al.*,1977: Nature 270: 347-349; Dalton *et al.*,1988: Blood 71: 242-247.

KG-1

etabliert aus dem Knochenmark eines 59-jährigen Mannes mit Erythroleukämie, die in eine AML übergegangen ist, 1977.

Referenzen: Koeffler & Golde, 1987: Science 200: 1153-1154; idem, 1980: Blood 56: 344-350.

MV4-11

etabliert aus dem peripheren Blut eines 10-jährigen Jungens mit AML (FAB M5)

Referenzen: Lange *et al.*, 1987: Blood 70: 192-199; Santoli *et al.*,1987: J Immunol 139: 3348-3354.

OCI-M1

etabliert aus erythroleukämischen Blasten eines 62-jährigen Patienten (AML M6).

Referenzen: Papayannopoulou *et al.*: Blood 72: 1029-1038; Tweeddale *et al.*, 1989: Blood 74: 572-578; Hirata *et al.*, 1990: Leukemia 4: 365-372.

SKM-1

etabliert aus peripherem Blut eines 76-jährigen Japaners mit akuter monoblastischer Leukämie (AML M5) auf Basis eines Myelodysplastischen Syndroms (MDS).

Referenzen: Nakagawa *et al.*, 1991: Br J Haematol 77: 250-252; Nakagawa *et al.*, 1993: Br J Haematol 85: 469-476.

TF-1

etabliert aus Knochenmark eines 35-jährigen Mannes mit Erythroleukämie (AML M6), 1987.

Referenzen: Kitamura *et al.*, 1989: Blood 73: 375-380; Cell Physiol. 140: 323-334.

THP-1

etabliert aus peripherem Blut eines einjährigen Jungens mit akuter myeloischer Leukämie bei Rückfall, 1978.

Referenzen: Tsuchiya *et al.*, 1980: Int J Cancer 26: 171-176; Tsuchiya *et al.*, 1982: Cancer Res 42:1530-1536. Review: Drexler *et al.*, 2004: Leukemia 18: 227-232.

U-937

etabliert aus einem Pleuraerguss eines 37-jährigen Mannes mit histiozytärem Lymphom, 1974. Referenzen: Sundström *et al.*, 1976: Int J. Cancer 17: 565-577.

UKE-1

etabliert aus peripherem Blut eines Patienten mit manifester Thrombozytose, die in eine akute myeloische Leukämie übergegangen ist.

Referenzen: Fiedler *et al.*, 1999: Cancer 88:344–51.

Patientenmaterial

Bei den AML-Proben handelt es sich um mononukleäre Zellen, die aus dem Blut von Patienten mit einer AML-Erstdiagnose isoliert wurden. Alle Patienten haben ihr Einverständnis gegeben.

Bis auf UKE-1, welche am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf etabliert wurde, stammen alle Zelllinien aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) oder der American Type Culture Collection (ATCC).

2 Plasmidpräparation

Das Verfahren der Plasmidpräparation dient dazu, extrachromosomale DNA ohne Anteile von RNA oder chromosomaler DNA aus kompetenten, plasmidtragenden Bakterien zu isolieren. Das gewonnene Plasmid wurde im weiteren Verlauf als PCR-Standard verwendet.

2.1 Tages- und Nachtkultivierung plasmidtragender E.coli-Bakterien

Die vorliegenden Glycerolstocks mit den entsprechenden Inserts wurden von der Firma Biocat käuflich erworben und das Kit mit Hilfe des beiliegenden Protokolls gestartet. Die Inserts beinhalten die Informationen, die im späteren Verlauf zur Sequenzierung und PCR-Analyse genutzt werden können. Durch die Kultivierung der Bakterienstämme kann die Isolierung der Plasmide in großer Menge erfolgen. Die Kultivierung fand in Ampicillinangereichertem LB-Medium über Nacht statt.

2.2 Plasmid-Maxi-Präparation nach Qiagen

Die Plasmidpurifikation wurde mit Hilfe des QIAfilter-Plasmid-Maxi-Kits der Firma Qiagen durchgeführt. Die Methode basiert auf dem Prinzip der Aufreinigung über Silikamembranen. Für die Aufreinigung werden die Zellen zunächst resuspendiert, um anschließend unter stark alkalischen Bedingungen lysiert und neutralisiert zu werden (Birnboim *et al.*, 1975). Abschließend dient die Filtration durch QIAfilter Cartridges der Gewinnung des klaren Überstandes. Das Filtrat enthält reine Plasmid-DNA.

Die genaue Durchführung der Plasmidpurifikation unter Einhaltung der vorgegebenen Inkubations- und Waschzeiten wurde gemäß der Angaben im Protokoll des QIAfilter-Plasmid-Maxi-Kits durchgeführt. Unter Anwesenheit von RNase (Puffer P1) wurde das gewonnene Zellpellet in einem SDS-haltigen, alkalischen Puffer P2 resuspendiert. Das alkalisch-wirkende NaOH diente der Denaturierung der Plasmid-DNA und der Proteine im E.coli-Bakterium. Die RNase zerstörte die vorhandene RNA. Durch Zugabe eines salzhaltigen Puffers P3 präzipitierten das SDS und die denaturierten Proteine, die Plasmid-DNA jedoch blieb in Lösung. Nach Zentrifugation und Aufreinigung über einer voräquibrierten Säule (die Plasmid-DNA bleibt an der Säule hängen) wurde die eluierte

DNA mit Isopropanol gefällt, um anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen zu werden. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde nach Abschluss der Purifikation in ein geeignetes Medium (TE-Puffer, pH 8.0) überführt und bei -80° C gelagert.

3 RNA-Isolierung

Das Grundprinzip der RNA-Isolierung sieht vor, vorhandene Zellen zu lysieren, RNase zu deaktivieren und RNA zu isolieren. Die Gewinnung isolierter RNA aus THP1-, UKE1-, TF1, MV4-11-, U987-, HL60-, OCIM-, SKM-1- und KG1-Zellen sowie aus HUVECs erfolgte mit Hilfe des RNeasy-Mini-Kits von Qiagen. Die Präparation wurde nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

4 cDNA-Synthese

Die Gewinnung komplementärer DNA (cDNA) wurde mit Hilfe des Ready-To-Go™ You-Prime First-Strand Beads-Kit von GE Healthcare durchgeführt. Unter Anleitung des vorliegenden Protokolls konnte aus der zuvor isolierten RNA cDNA gewonnen werden. Die cDNA wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit in der qualitativen und quantitativen PCR genutzt.

5 Polymerase-Kettenreaktion

5.1 Qualitative Polymerase-Kettenreaktion

Die konventionelle Polymerase-Kettenreaktion erlaubt eine qualitative Beurteilung des Untersuchungsmaterials. Sie wurde mit Hilfe des REDTaq™-ReadyMix™-PCR-Reaction Mix der Firma Sigma durchgeführt. Im Thermocycler der Firma Biometra wurden die Schritte Denaturierung, Hybridisierung und Elongation vollzogen. Pro Ansatz (25 µl) wurden für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) benötigt:

4,25 µl	H ₂ O
6,25 µl	Primer
12,5 µl	Red-Taq
2,0 µl	Probe, 1:5 verdünnt

Tab.7 Pipettierschema für das REDTaq™-ReadyMix™-PCR-Reaction-Mix

5.2 Agarose-Gelelektrophorese

20 µl der jeweiligen PCR-Produkte wurden anschließend auf ein 1,5%iges Agarosegel (versetzt mit 10 µl in 100 ml Ethidiumbromid in TAE-Puffer) aufgetragen. Die Gelelektrophorese lief für eine Stunde bei 120 Volt. Die Entwicklung des Gels fand in der Fotokammer Eagle Eye II statt. Durch das vorhandene UV-Licht (254 nm) wurden die Banden auf dem Gel sichtbar gemacht und fotografiert. Ein aufgetragener 100 bp Marker diente der Orientierung und Quantifizierung des PCR-Produktes.

5.3 Realtime-Polymerase-Kettenreaktion

Das unter Tab. 9 angegebene Reaktionsschema veranschaulicht den Ablauf der RT-PCR. Sie wurde am Lightcycler© der Firma Roche durchgeführt. Pro Ansatz (20 µl) wurden für die Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) benötigt:

Tab.8 Pipettierschema für das LightCycler® DNA Master SYBR Green I

10,4 µl	H ₂ O
4,0 µl	Primer
2,0 µl	SYBR
1,6 µl	Mg ²⁺
2,0 µl	Probe, 1:5 verdünnt

Tab.9 Ablauf der RT-PCR-Reaktion

Zyklus	Temperatur in ° C	Zyklus-Dauer
Denaturierung am Anfang	94° C	4 min.
Denaturierung	94° C	30 sec.
Annealing	62° C	1 min.
Elongation	72° C	2 min.
Terminale Elongation	72° C	10 min.

6 Western Blot

6.1 Extraktion des löslichen Gesamtproteins

Für die Proteinisolierung wurden die Zellpellets mit kaltem PBS-Puffer gewaschen und für fünf Minuten bei 2400 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die gewaschenen Zellpellets mit 100 µl RIPA-Puffer, 20 µl/ml Protease-Inhibitor und 10 µl/ml Natrium Orthovanadate (SoV) lysiert. Nach mehrmaligem Vortexen der Lysate während einer dreißig-minütigen Inkubationszeit auf Eis wurden die Proben für zehn Minuten bei 12000 rounds per minute bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf- Röhrchen überführt.

6.2 Proteinbestimmung (Bradford-Methode)

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe der Bradford-Methode ermittelt. Dieses Verfahren dient dazu, gleiche Mengen Protein einer jeden Probe auftragen zu können.

Der Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 (CBBG) bildet in saurer Lösung sowohl mit den kationischen als auch den nichtpolaren, hydrophoben Seitenketten der Proteine Komplexe. Durch die Komplexbildung mit Proteinen wird der Farbstoff in seiner blauen, unprotonierten, anionischen Sulfonatform stabilisiert. Vorteil dieses Verfahrens ist die Verschiebung des Adsorptionsmaximums des Farbstoffs von 495 nm zu 595 nm, sobald er die oben genannten Bindungen eingeht.

Von jeder Probe, der Standardreihe und einem Leerwert wurden 5 µl 1:10 mit Wasser verdünnt und mit 2,5 ml eines 1:5 verdünnten DyeReagenz für fünf Minuten inkubiert. Die Proteinbestimmung erfolgte am Photometer bei 595 nm.

6.3 Polyacrylamid-Elektrophorese und Immunoblot

Um die Proteine der AML-Zelllinien und HUVECs elektrophoretisch auftrennen zu können, wurde die denaturierende Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE©) nach Laemmli (Laemmli, 1970) angewendet.

Die Proben wurden nach Bestimmung der Proteinkonzentration für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert. Zur Auftrennung wurde ein NuPage 4-12 % Bis-Tris-Gel verwendet. Als Referenz diente ein Marker (Fermentas PageRuler Plus©), der ein definiertes Proteinspektrum von 10 kDa bis 200 kDa anzeigt. Die Gelelektrophorese wurde bei 200 V durchgeführt. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine im Nass-Verfahren in einer Trans-Blot-SD-Kammer bei 0,35 A/ Gel für eine Stunde auf eine Nitrozellulosemembran übertragen.

Die Membran wurde kühl und feucht gelagert. Im Anschluss wurde die Membran, um unspezifische Banden zu blockieren, für eine Stunde in 5 %-iger Magermilchlösung inkubiert. Die Behandlung mit dem jeweiligen Erstantikörper in 10 %-igem TBST-Puffer erfolgte bei Raumtemperatur für eine Stunde. Anschließend wurde die Membran mit dem zugehörigem sekundären Antikörper und 5 %-iger Magermilchlösung für eine weitere Stunde inkubiert, nachdem sie dreimal für zehn Minuten in TBST-Puffer gewaschen wurde. Es folgte ein erneuter Waschschrift mit TBST für zweimal 5 Minuten und zweimal 10 Minuten. Die Detektion der Proteine wurde mit dem ECL-Plus-Reagenz durchgeführt. Das Reagenz wurde für zwei Minuten auf der jeweiligen Membran belassen. Die Belichtungszeit betrug ein bis fünf Minuten. Abschließend erfolgte die Entwicklung der Filme im Hyperprocessor-Fotoentwickler.

Untenstehend sind die Verdünnungen der primären Antikörper mit ihrem jeweiligen sekundären Antikörpern tabellarisch aufgelistet.

Tab.10 Western-Blot-Antikörper

<i>Primärer Antikörper</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Sekundärer Antikörper</i>	<i>Verdünnung</i>
Robo4	1:1000	Anti-rabbit-IgG	1:10000
Robo1	1:200	Anti-goat-IgG	1:100000
Slit2	1:500	Anti-goat-IgG	1:100000
Gremlin1	1:500	Anti-rabbit-IgG	1:10000
WASP	1:1000	Anti-rabbit-IgG	1:10000
Phospho-WASP	1:1000	Anti-rabbit-IgG	1:10000

IV Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, die Expression von Faktoren des Rezeptor-Liganden-Systems Robo in Tumorzellen von AML-Zelllinien nachzuweisen. Zunächst sollte untersucht werden, ob Robo-Rezeptoren und ihre Liganden in HUVECs exprimiert werden. Daraufhin wurden ausgesuchte Patientenproben mit manifester, zum Zeitpunkt der Analyse bisher nicht therapierter AML auf Robo1 und Robo4 getestet, um das Expressionsverhalten der Faktoren in AML-Tumorzellen beurteilen zu können. Eine qualitative Analyse durch die RT-PCR und die Analyse der Proteinsynthese durch das Western-Blot-Verfahren an neun AML-Zelllinien bildeten den Abschluss dieser Arbeit.

1 Ergebnisse der qualitativen Polymerase-Kettenreaktion

1.1 Qualitative PCR an HUVEC-Zellen

Die qualitative Analyse an HUVECs wurde mit Hilfe des Sigma-Red-Taq-Polymerase-Kits durchgeführt. Es wurden 2 µl einer 1:5 verdünnten HUVEC-cDNA verwendet. Es sollte untersucht werden, ob Rezeptoren und Liganden des Rezeptor-Liganden-Systems Robo in endothelialen Zellen exprimiert werden. Abbildung 1 fasst das Ergebnis der qualitativen PCR zusammen.

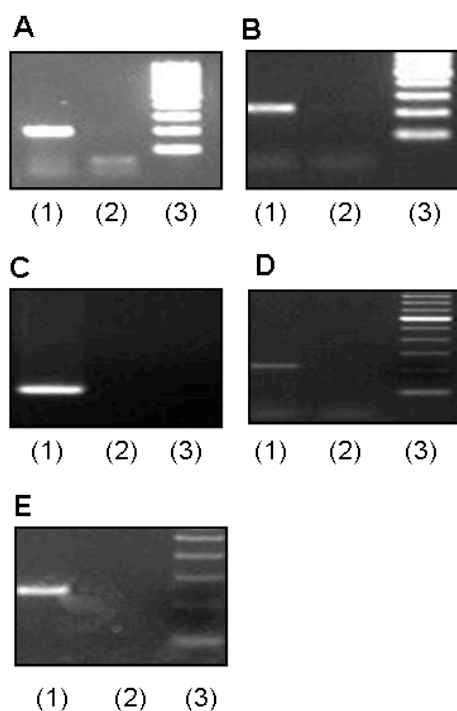


Abb.1: Qualitative PCR zur Bestimmung des cDNA-Gehalts der Robo-Rezeptoren und Liganden in HUVECs. Die Robo1-Expression in HUVECs (1) und Wasser (2) ist in Bild (A) dargestellt, Abb. (B) zeigt die Robo4-Expression in HUVECs (1) und Wasser (2), in Abb. (C) ist die Slit2-Expression abgebildet, Abb. (D) beschreibt die Gremlin1-Expression in HUVECs (1) und Wasser (2), Abb. (E) stellt das Gapdh-Kontrollbild dar.

1.2 Qualitative PCR der Robo1- und Robo4-Rezeptoren an AML-Patientenproben

Die qualitative Untersuchung an ausgesuchten AML-Patientenproben wurde mit Hilfe des Sigma-Red-Taq-Polymerase-Kits durchgeführt. Es wurden 2 µl der 1:5 verdünnten Patientenproben verwendet. Es sollte untersucht werden, ob AML-Blasten verschiedener Patientenproben Liganden und Rezeptoren des Rezeptor-Liganden-Systems Robo exprimieren. Zur Analyse an Patientenproben wurden die Rezeptoren Robo1 und Robo4 verwendet. Zur Kontrolle wurden wiederum HUVECs eingesetzt. Die Abbildungen 2 und 3 zeigen die Expression von Robo1 und Robo4.

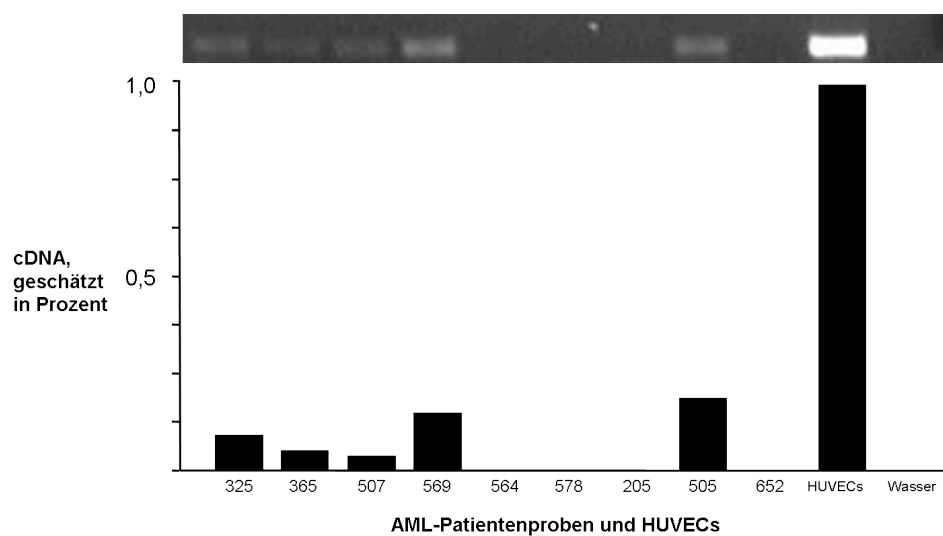


Abb.2: cDNA-Expression von Robo1 in AML-Patientenproben und HUVECs, ermittelt durch die qualitative PCR.

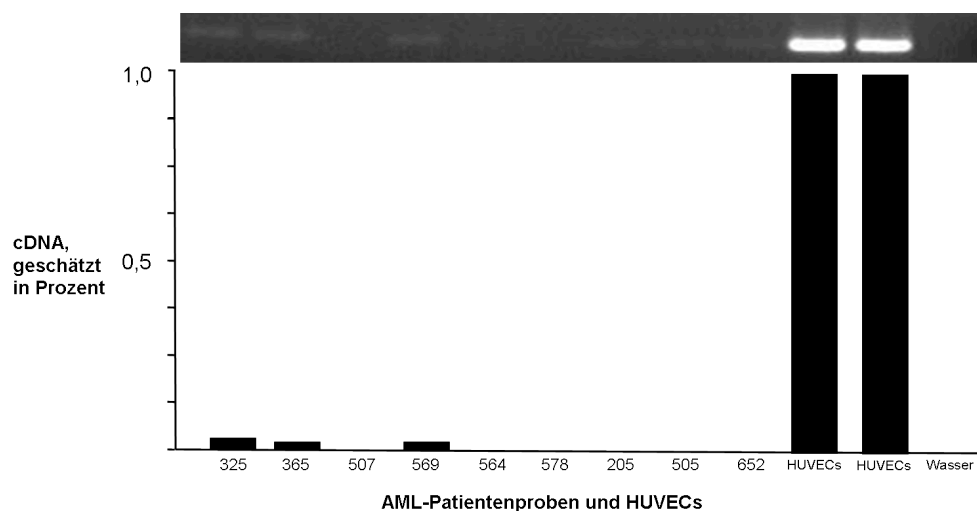


Abb.3: cDNA-Expression von Robo4 in AML-Patientenproben und HUVECs, ermittelt durch die qualitative PCR.

1.3 Qualitative PCR der Robo-Rezeptoren und Liganden an AML-Zelllinien

Nun sollte geklärt werden, ob die Rezeptoren Robo1 und Robo4 sowie die Liganden Slit2 und Gremlin1 in Leukämie-Zelllinien exprimiert werden. HUVECs dienten erneut als Positivkontrolle. Die folgenden Abbildungen zeigen die Expressionsmuster der Rezeptoren und Liganden des Rezeptor-Liganden-Systems Robo in AML-Zelllinien.

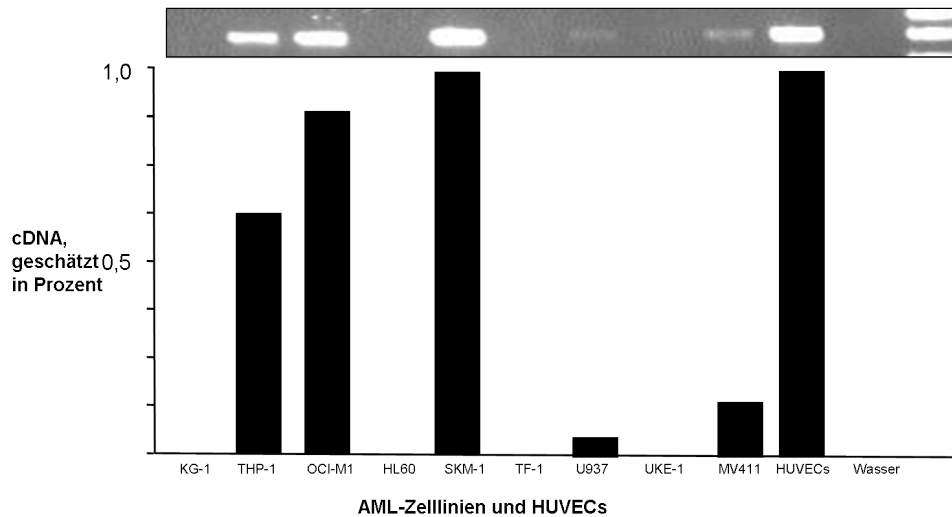


Abb. 4: cDNA-Expression des Robo1-Rezeptors in AML-Zelllinien und HUVECs, ermittelt durch die qualitative PCR.

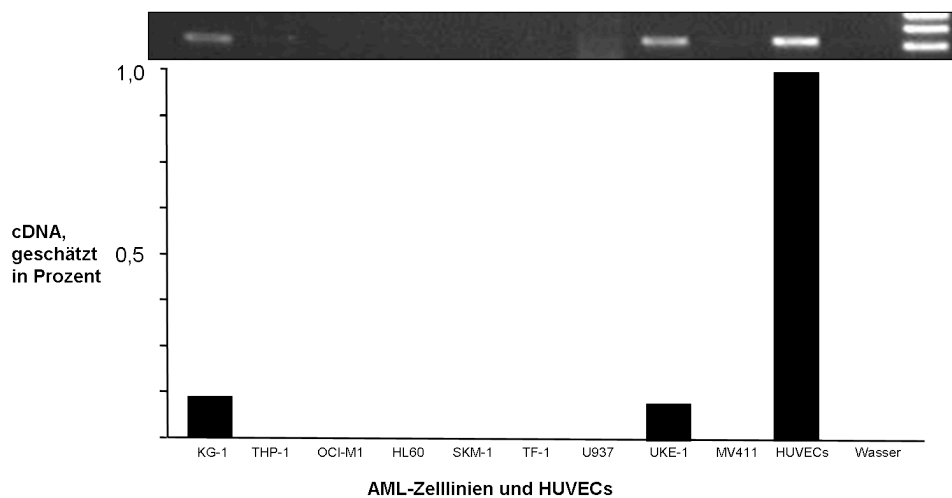


Abb. 5: cDNA-Expression des Robo4-Rezeptors in AML-Zelllinien und HUVECs, ermittelt durch die qualitative PCR.

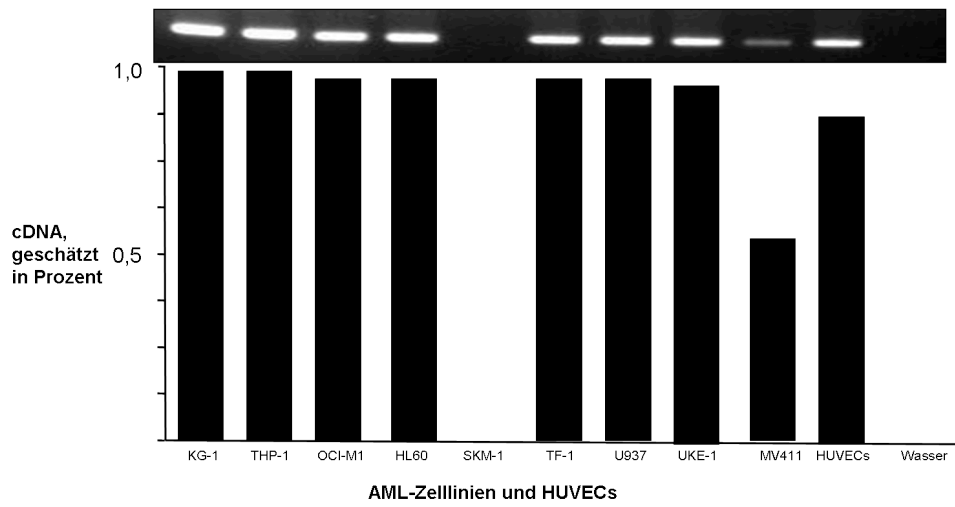


Abb. 6: cDNA-Expression des Slit2-Liganden in AML-Zelllinien und HUVECs, ermittelt durch die qualitative PCR.

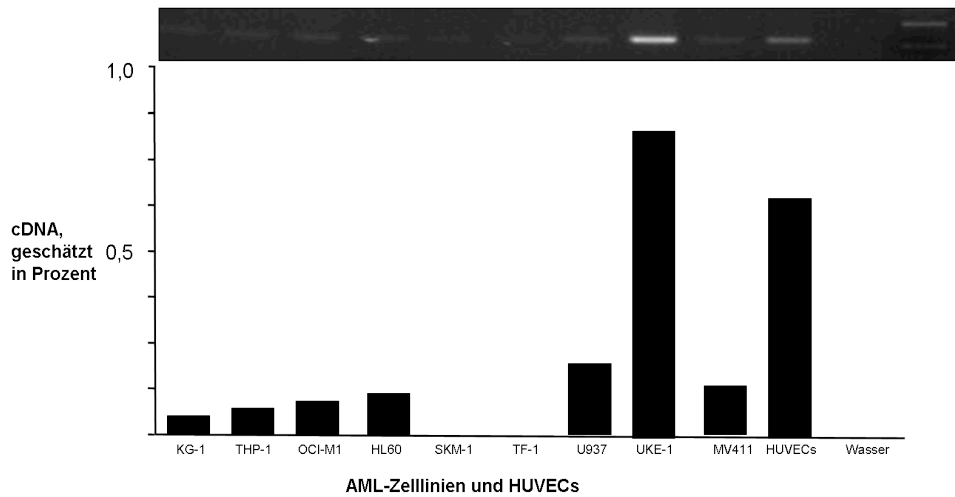


Abb. 7: cDNA-Expression des Gremlin1-Liganden in AML-Zelllinien und HUVECs, ermittelt durch die qualitative PCR.

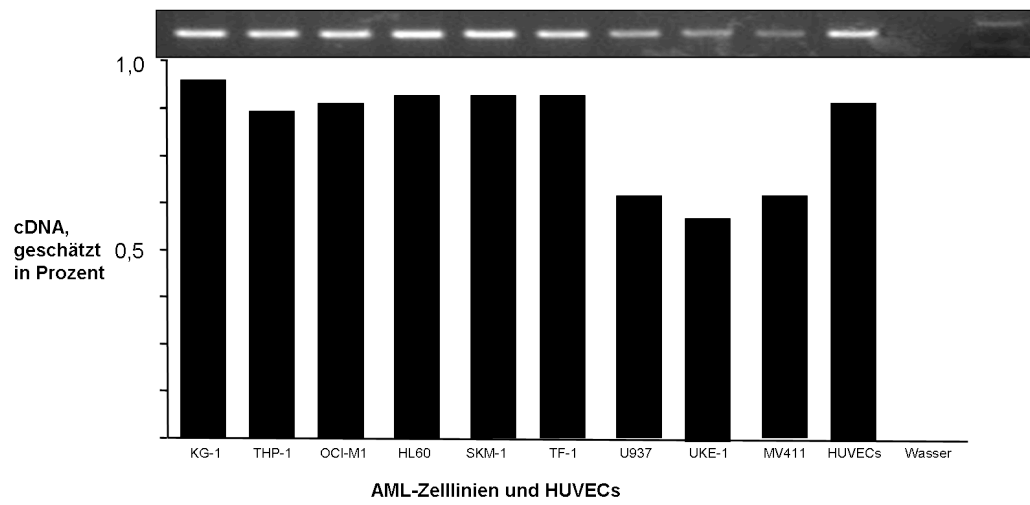


Abb. 8: cDNA-Expression von Gapdh in AML-Zelllinien und HUVECs, ermittelt durch die qualitative PCR.

2 Ergebnisse der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion

2.1 Quantitative PCR der Rezeptoren und Liganden der Robo-Familie an AML-Zelllinien

Mit Hilfe der Realtime-Polymerase-Kettenreaktion wurden die AML-Zelllinien einer quantitativen Analyse unterzogen. Durch Einbringen einer Standardkurve erlaubt sie eine Quantifizierung der Expressionsrate der untersuchten cDNA. HUVEC-Zellen dienten in allen Versuchsanordnungen als Positivkontrollen. Die Ergebnisse der quantitativen PCR von Robo1, Robo4, Slit2 und Gremlin1 wurden gegen Gapdh normalisiert.

THP-1, OCI-M1, U937, MV4-11 und HUVECs zeigten in der quantitativen PCR eine positive Robo1-Expression (Abb.9). Das Expressionsverhalten des Robo1-Rezeptors in der qualitativen PCR stimmte mit den Ergebnissen, die durch die qualitative PCR gewonnen wurden, überein. Die Expression des Robo4-Rezeptors konnte lediglich in HUVECs festgestellt werden. Keine der neun AML-Zelllinien exprimierte Robo4 (Abb.10), wohingegen in vorangegangenen Analysen mittels qualitativer PCR die AML-Zelllinien KG-1 und UKE-1 Robo4 exprimierten. Die Banden von KG-1 und UKE-1 zeigten in der qualitativen PCR-Analyse jedoch keine außerordentlich starke Ausprägung. Dies deutet darauf hin, dass die beiden AML-Zelllinien KG-1 und UKE-1 Robo4-cDNA, wenn überhaupt, nur in sehr geringer Konzentration exprimieren. Es ist möglich, dass die geringe Expression des Robo4-Rezeptors nicht mehr durch das Analyseverfahren der quantitativen PCR erfasst wurde. Technische Probleme konnten jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Slit2 zeigte in vier von neun AML-Zelllinien eine positive Expression. Die Expression in OCI-M1 und HL60 fällt im Vergleich zu SKM-1 und TF-1 geringer aus. Die HUVEC-Probe war ebenfalls positiv. Sie zeigte cDNA-Konzentrationen unter denen von SKM-1 und TF-1, die jedoch noch deutlich über OCI-M1 und HL60 lagen (Abb.11).

Keine der AML-Zelllinien zeigte eine positive Expression für den Liganden Gremlin1. Die Expression in HUVECs fiel positiv aus. Dieses Ergebnis war gut mit den Ergebnissen der qualitativen PCR zu vereinbaren. Die in der qualitativen PCR detektierte cDNA in UKE-1 trat in weiteren Wiederholungsversuchen auf.

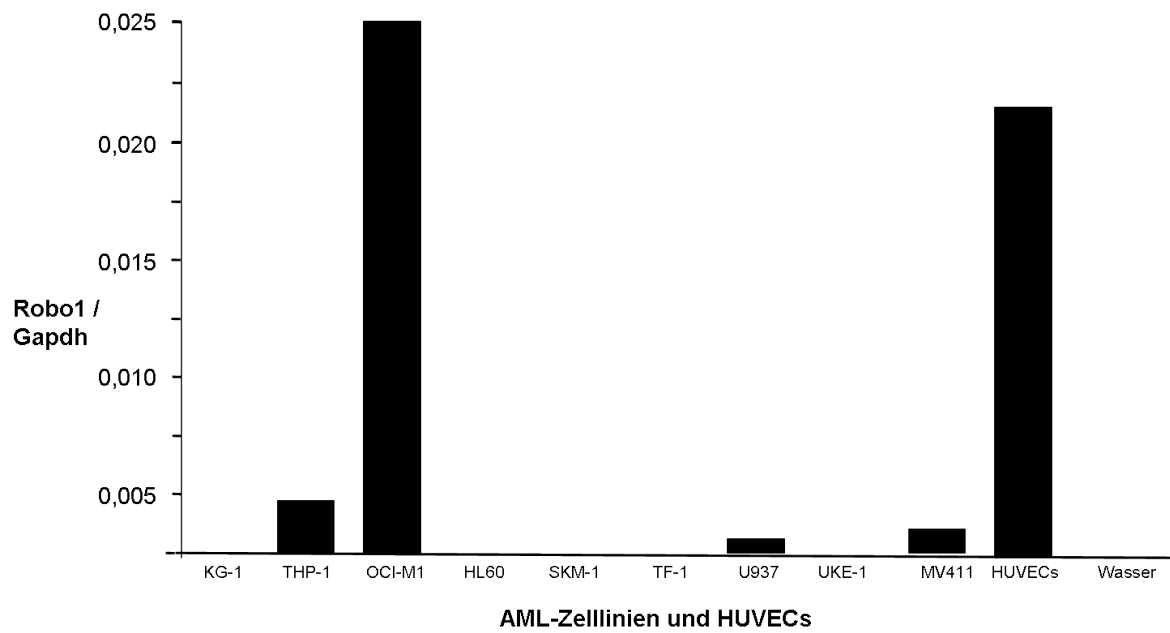


Abb.9: Quantitative PCR des Robo1-Rezeptors in AML-Zelllinien und HUVECs.

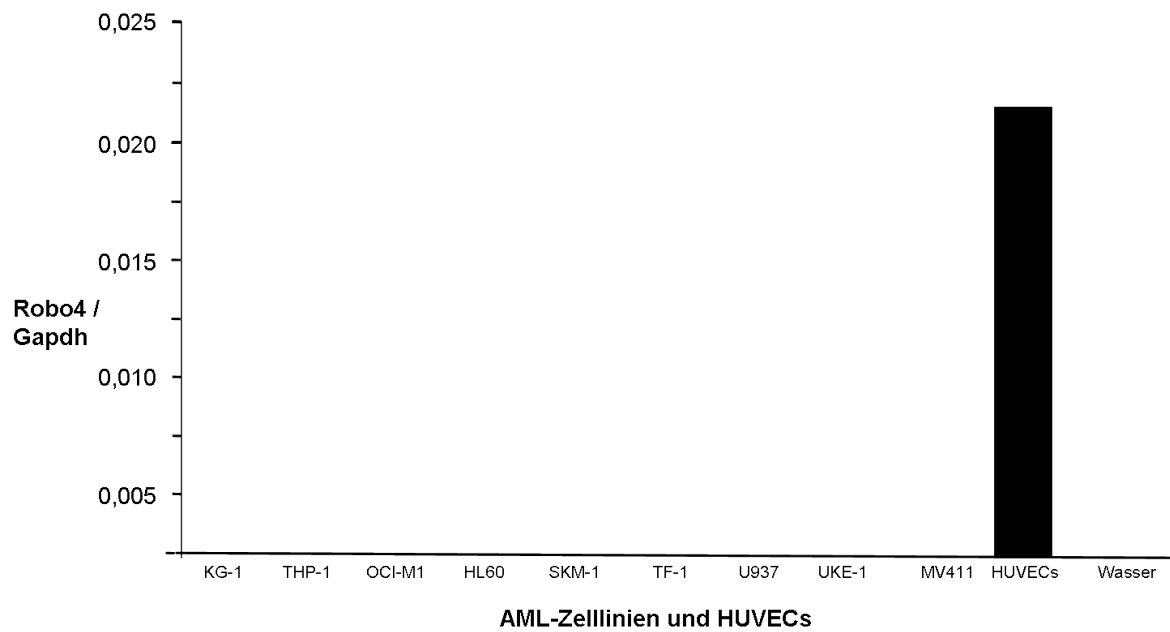


Abb.10: Quantitative PCR des Robo4-Rezeptors in AML-Zelllinien und HUVECs.

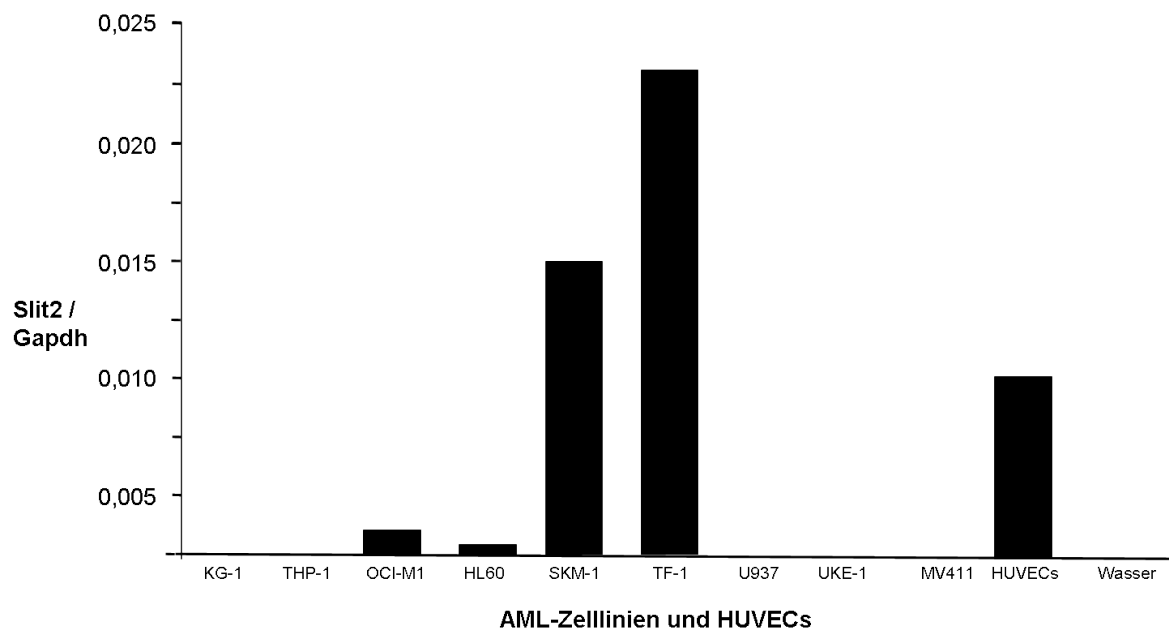


Abb.11: Quantitative PCR des Liganden Slit2 in AML-Zelllinien und HUVECs.

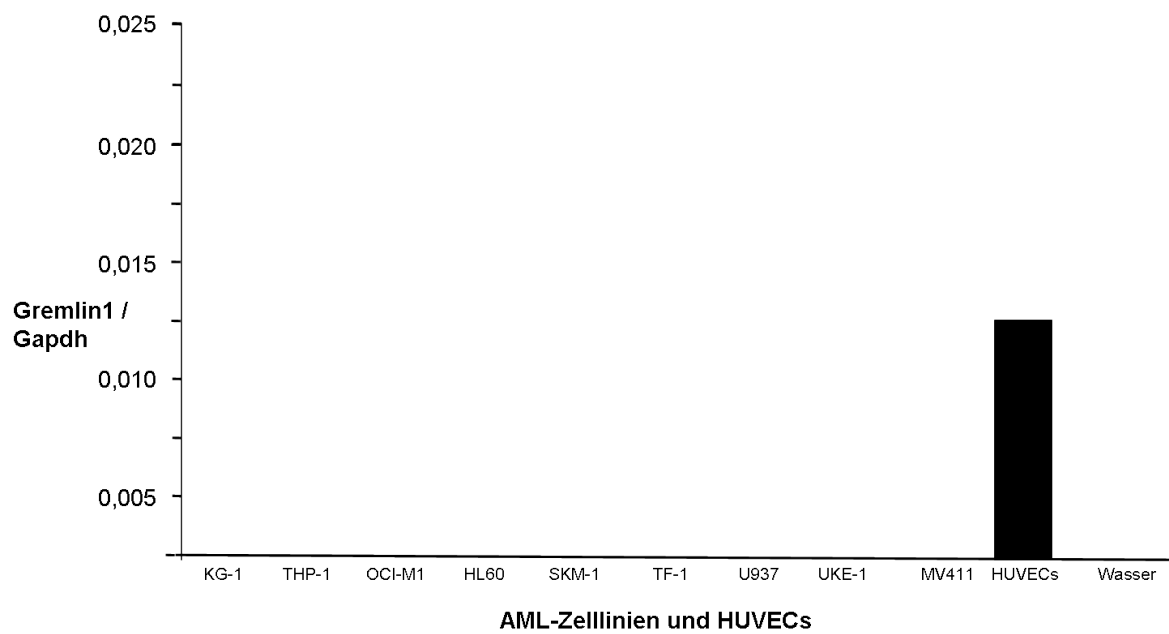


Abb.12: Quantitative PCR des Liganden Gremlin1 in AML-Zelllinien und HUVECs.

3 Ergebnisse der Western-Blot-Analysen

Die Immunoblot-Analyse sollte klären, ob Tumorzellen der AML-Zelllinien Proteine des Robo-Rezeptor-Liganden-Systems synthetisieren. Als Positiv-Kontrollen für die Rezeptoren Robo4 und Robo1 wurden HUVEC-Zellen verwendet. Für WASP und Phospho-WASP wurden leukozytäre Zellen als Kontrolle eingesetzt. Zur Normierung der Ergebnisse wurde β -Aktin verwendet.

Die Proteinanalyse von Gremlin1 und Slit2 wird im Folgenden nicht behandelt, da das Ergebnis der Western-Blot-Versuche zu keinem eindeutigen Ergebnis geführt hat. Sowohl die AML-Zelllinien als auch die im Verlauf dieser Arbeit verwendeten Kontroll-Zellen zeigten keine Expression für Slit2 und Gremlin1. Aufgrund der fehlenden Positiv-Kontrollen konnte nicht endgültig geklärt werden, ob es ein technisches Problem mit den Antikörpern gab oder tatsächlich keine Expression vorlag.

3.1 Western-Blot-Analyse der Robo-Rezeptoren und Liganden in AML-Zelllinien

Als Kontrollgruppe wurden erneut HUVECs eingesetzt. Des Weiteren wurden mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (white blood cells, WBCs) als Positivkontrollen für WASP und Phospho-WASP herangezogen. Untersucht wurde die Proteinexpression der Robo1- und Robo4-Rezeptoren. Darüber hinaus sollte beobachtet werden, wie hoch die Proteinexpression des pWAS- und WAS-Proteins in verschiedenen Western-Blot-Analysen ausfällt. Slit2 und Gremlin1 konnten im weiteren Verlauf vernachlässigt werden, da sich sowohl in den vorangegangenen Analysen als auch in der Western-Blot-Analyse mit HUVECs kein zufriedenstellendes Ergebnis einstellte. Die Expression sowohl von Robo1- als auch von Robo4-Protein konnte hingegen ausreichend in HUVECs festgestellt werden. Die Proteinsynthese von WASP in HUVECs und WBCs fiel deutlich geringer aus als in den AML-Zelllinien. Die Expression von phosphoryliertem, aktivem WASP fiel im Gegensatz zum unphosphoryliertem, inaktivem WASP in HUVECs und WBCs deutlich höher aus.

Lediglich bei HUVECs und den AML-Zelllinien U937 und HL-60 war eine Robo4-Proteinexpression eindeutig nachweisbar. Bei den übrigen AML-Zelllinien war keine deutliche Bande erkennbar sondern ein diffuser Schmier. Ob es sich hierbei tatsächlich um ein spezifisches Signal für Robo4 oder um unspezifische Hintergrundfärbung handelte, ließ sich nicht eindeutig feststellen. Da das Signal bei OCI-M1 relativ stark ausgeprägt war, während gleichzeitig die β -Aktin-Bande schwächer war als bei den anderen Proben, wurde diese Zelllinie ebenfalls als positiv für Robo4 betrachtet. Bei der densitometrischen Quantifizierung

des Western-Blots ergaben sich jedoch für alle AML-Zelllinien positive Werte, was auf die unspezifische Hintergrundfärbung des Blots zurückzuführen war, die sich im Bereich der AML-Proben deutlich vom eigentlichen Hintergrund abhoben. Aus diesem Grund sollte die Quantifizierung der Robo4-Proteinexpression nicht mit in die Auswertung hineinbezogen werden, weshalb lediglich HUVECs sowie die AML-Zelllinien U937, HL60 und OCI-M1 als positiv gewertet wurden.

WASP und Phospho-WASP konnten ebenfalls in AML-Zelllinien detektiert werden. WASP wurde hierbei am stärksten in TF-1, U937 und UKE-1 exprimiert, Phospho-WASP hingegen am stärksten in KG1, UKE-1 und MV4-11 (Abb.15, Abb.16). In den Zelllinien KG1, THP-1, HL60, SKM-1, MV411 und den Kontrollgruppen HUVECs und WBCs konnte mehr pWASP als WASP nachgewiesen werden, was möglicherweise auf eine Aktivierung der einzelnen Zelllinien durch das Rezeptor-Liganden-System Robo hindeutet (Abb. 17).

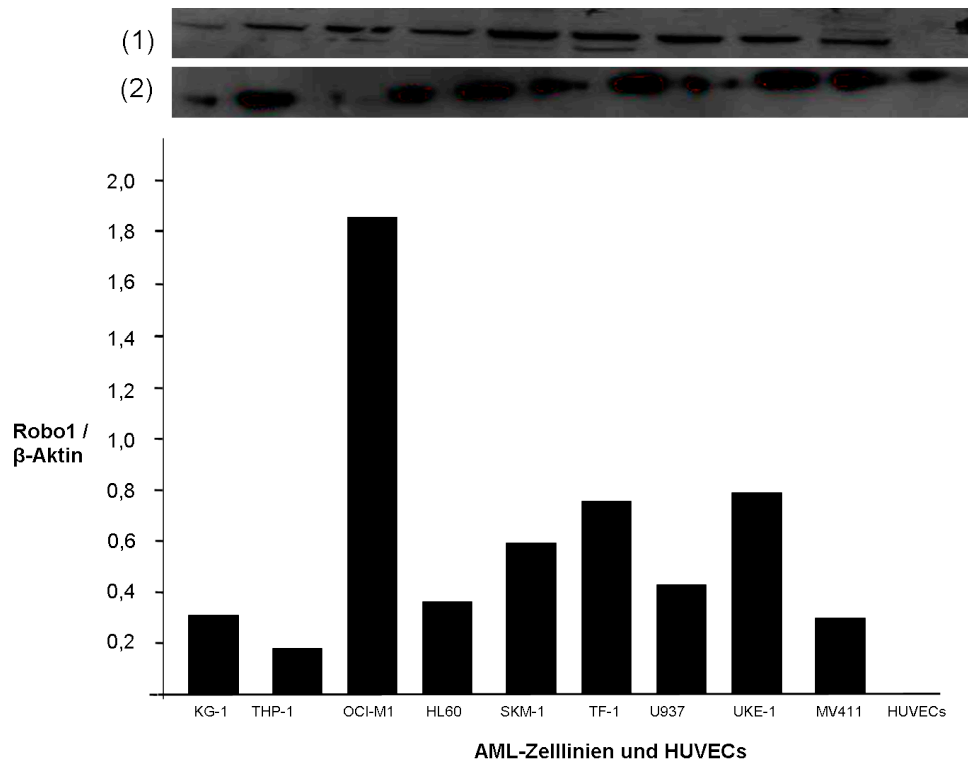


Abb.13: Ergebnis der Western-Blot-Analyse von Robo1 in AML-Zelllinien und HUVECs. (1) stellt Robo1 dar, (2) ist β -Aktin.

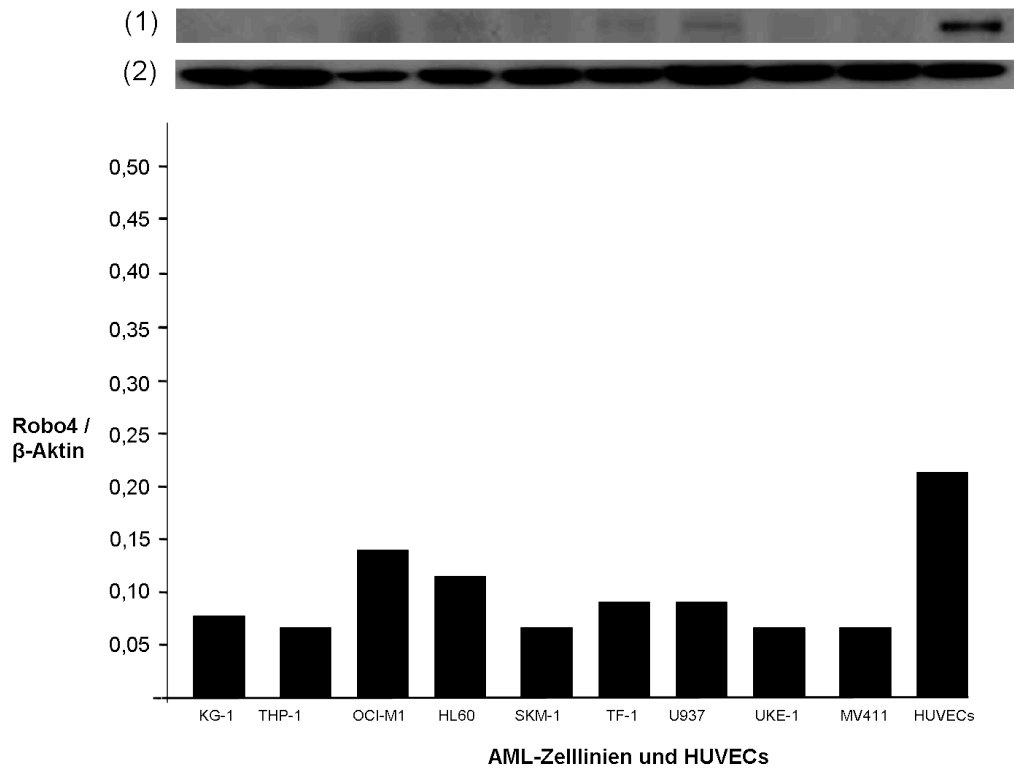


Abb.14: Ergebnis der Western-Blot-Analyse von Robo4 in AML-Zelllinien und HUVECs.(1) stellt Robo4 dar, (2) ist β -Aktin.

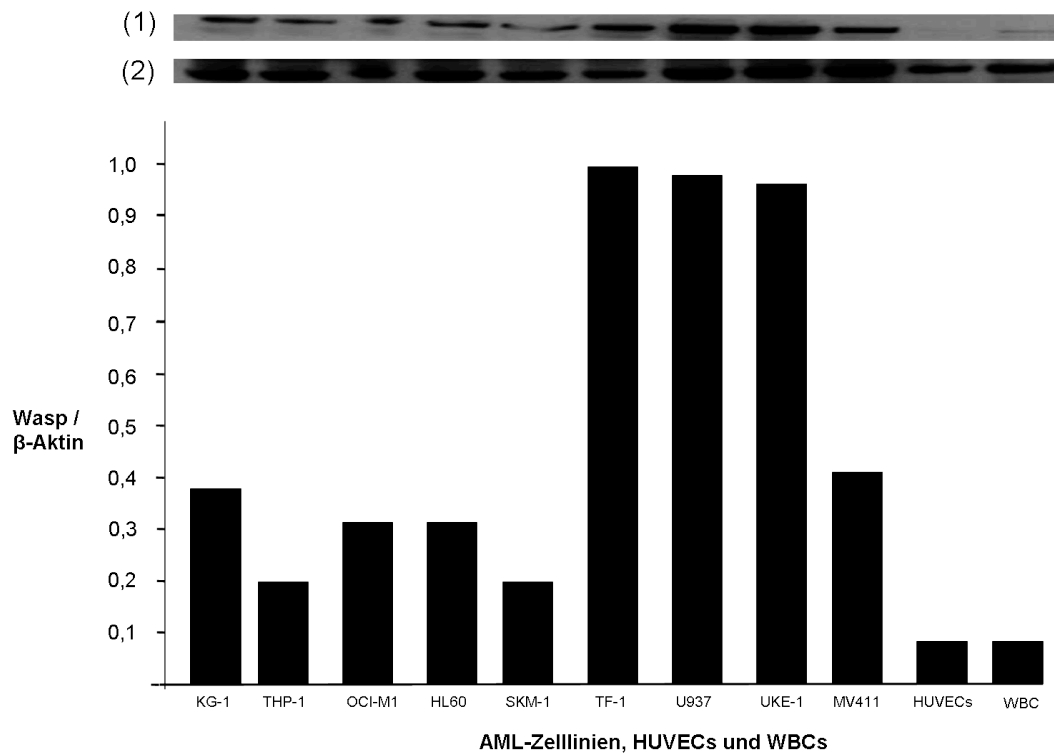


Abb.15: Western-Blot-Analyse des Was-Proteins in AML-Zelllinien und WBCs. (1) stellt WASP dar, (2) ist β -Aktin.

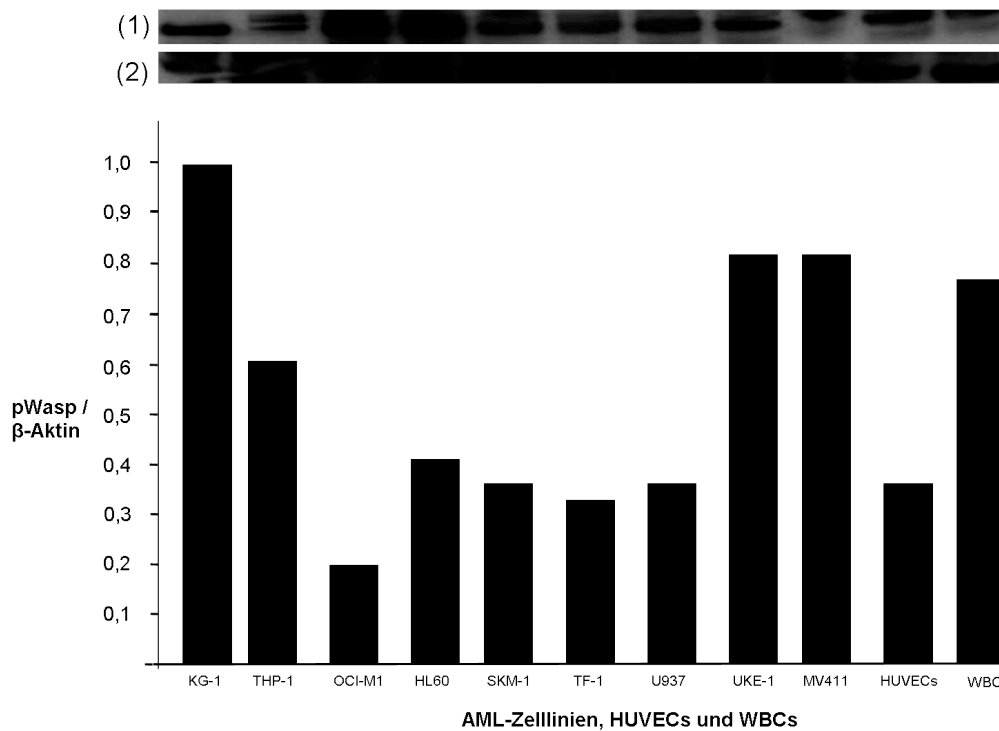


Abb.16: Western-Blot-Analyse des Phospho-Was-Proteins in AML-Zelllinien und WBCs. (1) stellt pWASP dar, (2) ist β -Aktin.

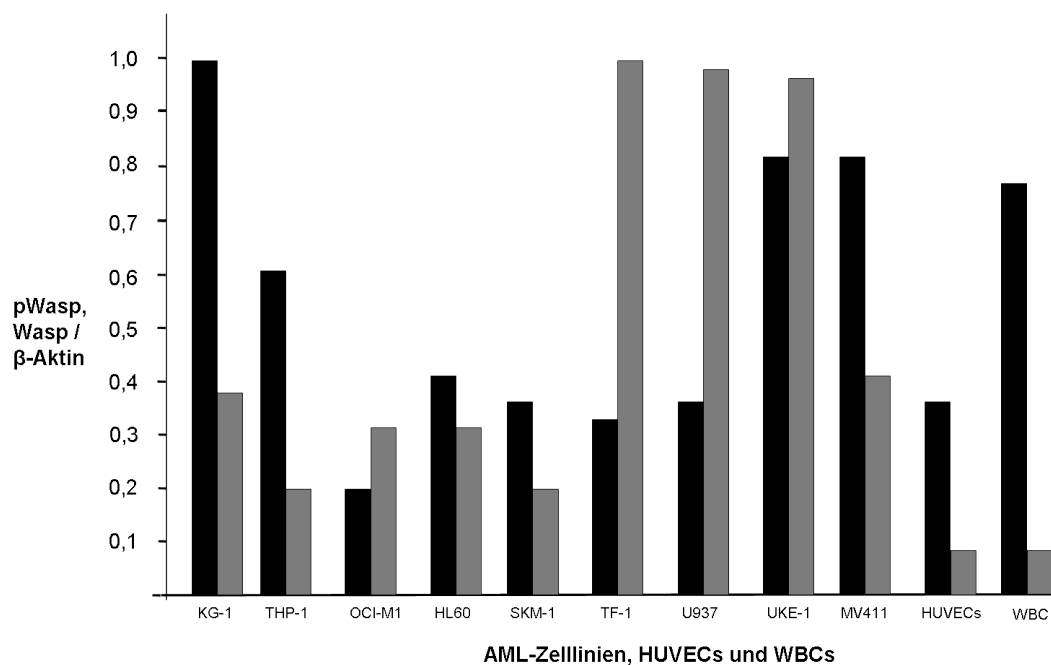


Abb.17: Western-Blot-Analyse von pWASP und WASP in AML-Zelllinien und WBCs. Wasp und Phospho-Wasp wurden in einem Säulendiagramm gegenübergestellt, um einen direkten Vergleich zwischen inaktiviertem (unphosphoryliertem) WASP und aktivem (phosphoryliertem) WASP darzustellen. pWASP= schwarz; WASP= grau.

4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Ergebnisse, die in der konventionellen PCR, der qualitativen RT-PCR und der Western-Blot-Analyse erzielt wurden. So können gezielt AML-Zelllinien ausgewählt werden, die in allen drei Analyseverfahren eine positive Expression für einen der Rezeptoren oder Liganden des Rezeptor-Liganden-Systems Robo aufweisen. Die folgende Tabelle macht jedoch keine Aussage über die Höhe der Expression. Diese ist in den jeweiligen Diagrammen zur Darstellung gekommen.

Tab. 11: Zusammenfassung der Ergebnisse der qualitativen PCR-, der quantitativen PCR- und der Western-Blot-Analysen

	Robo1	Robo4	Slit2 ¹	Gremlin1 ¹	WASP ²	PhosphoWASP ²
KG1	■	■	■		■	■
THP-1	■ ■ ■		■		■	■
OCI-M1	■ ■ ■	■	■ ■		■	■
HL60	■	■	■ ■		■	■
SKM-1	■ ■		■		■	■
TF-1	■ ■		■ ■		■	■
U937	■ ■ ■	■	■		■	■
UKE-1	■	■	■	■ ■	■	■
MV4-11	■ ■ ■		■		■	■
HUVEC	■ ■	■ ■ ■	■ ■	■	■	■

■ = qual. PCR-positiv, ■ = quant. PCR-positiv, ■ = Western-Blot-positiv

¹ Für Slit2 und Gremlin1 wurden keine Western-Blot-Analysen durchgeführt.

² Die Expressionsmuster von WASP und Phospho-WASP wurden nur mit Hilfe des Western-Blot-Verfahrens ermittelt.

V Diskussion

Die akute myeloische Leukämie zeichnet sich in der Regel durch einen rasch progredienten Verlauf und eine hohe Rezidivrate aus. Zwar ist es möglich, durch verschiedene Therapieansätze eine komplette Remission der Erkrankung zu induzieren, jedoch erleidet die überwiegende Mehrzahl der Patienten in den folgenden zwölf Monaten ein Rezidiv (Craddock *et al.*, 2005; Jackson *et al.*, 2004). Da in den letzten Jahren bewiesen werden konnte, dass Angiogenese nicht nur in soliden Tumoren, sondern auch in Leukämien eine wichtige Rolle spielt, konnte sich die antianigenetische Therapie neben der Chemotherapie und Knochenmarkstransplantation im allgemeinen Therapieschema der AML etablieren. Im weiteren Verlauf dieser Diskussion soll daher geklärt werden, inwiefern das Rezeptor-Liganden-System Robo, das bereits in endothelialen Zellen solider Tumoren nachgewiesen werden konnte, Einfluss auf die Angiogenese innerhalb der AML nimmt.

Es konnte gezeigt werden, dass humane umbilikale venöse Endothelzellen DNA und zum Teil Proteine des Rezeptor-Liganden-Systems Robo exprimieren. Wie zu erwarten, zeigten diese HUVEC-Zellen in unseren qualitativen und quantitativen PCR-Analysen eine positive Expression für Robo4. Die Expression von Robo1 in HUVECs, die 2003 bereits durch Wang *et al.* beschrieben wurde, konnte durch unsere PCR-Analysen bestätigt werden, jedoch blieb die Proteinexpression der Robo1-Rezeptoren im Western-Blot-Verfahren ohne Ergebnis. In einer vor kurzem veröffentlichten Arbeit durch Sheldon *et al.* aus dem Jahr 2009 zeigten HUVECs eine positive Proteinexpression für Robo1 im Western-Blot-Verfahren. Trotz Verwendung des gleichen primären Antikörpers und unter Beachtung der dort angeführten Versuchsanordnung wurde das Robo1-Protein in unseren Analysen nicht detektiert. Im Gegensatz zu Sheldon *et al.* behauptet die Arbeitsgruppe um Park *et al.*, dass sowohl Robo1 als auch Robo2 und Robo3 erst gar nicht in Zellen der Vaskulo- bzw. Angiogenese exprimiert werden – so also die fehlende Proteinexpression in unseren Untersuchungen mit den Ergebnissen aus den Untersuchungen durch Park *et al.* übereinstimmen (Park *et al.*, 2003).

Die Expression von Slit2 in HUVECs wurde sowohl in der qualitativen als auch quantitativen PCR nachgewiesen. Eine Expression von Slit2-Protein in HUVECs konnte im Western Blot jedoch nicht beobachtet werden. Versuchsaufbau und -ablauf der Western-Blot-Analyse wurden mehrfach hinsichtlich der Konzentrationen der primären und sekundären Antikörper, der Inkubationszeiten und der Waschzeiten verändert. Es stellte sich jedoch kein zufriedenstellendes Ergebnis ein. Es konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt werden, ob der Versuch auf Grund des käuflich erworbenen Antikörpers nicht funktioniert hat oder

tatsächlich kein Slit2-Protein in HUVECs exprimiert wird. Die Arbeitsgruppe um Wu *et al.* konnte 2001 zeigen, dass Slit2-cDNA in endothelialen Strukturen, vorrangig in Epithelzellen von Nierenglomeruli und Endothelzellen von Arteriolen und Venolen der Niere, exprimiert wird. Untersuchungen durch Wang *et al.* kamen jedoch zu dem Ergebnis, dass Slit2 ausschließlich in Tumorzellen exprimiert wird und, im Gegensatz zu Robo4 nicht in Endothelzellen des Tumors nachweisbar ist (Wang *et al.*, 2003). Weitere Untersuchungen müssen daher zeigen, welche Rolle die durch unsere PCR-Analysen detektierte Expression von Slit2 in humanen umbilikalen venösen Endothelzellen spielt.

Die Expression von Gremlin1 in HUVEC-Zellen ließ sich lediglich in der qualitativen PCR nachweisen. Im Gegensatz zu anderen Rezeptoren und Liganden der Robo-Familie fiel die Expression von Gremlin1 in Endothelzellen deutlich geringer aus (Abb.1). Dies bestätigte sich auch in weiteren Untersuchungen durch die quantitative PCR- und Western-Blot-Analyse, in denen Gremlin1 in HUVECs nicht mehr nachzuweisen war. Hier stellt sich erneut die Frage, ob dies durch technische Probleme im Versuchsaufbau hervorgerufen wurde oder die Expression von Gremlin1 in Endothelzellen tatsächlich nicht beziehungsweise so gering ausfällt, dass nur anhand der qualitativen PCR eine dementsprechend geringe cDNA-Expression festzustellen war.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Blasten von AML-Zelllinien Mitglieder des Rezeptor-Liganden-Systems Robo exprimieren. Die in der qualitativen PCR-Analyse festgestellte Expression von Robo4-cDNA in den AML-Zelllinien KG-1 und UKE-1 konnte jedoch nicht durch die quantitative RT-PCR-Analyse bestätigt werden.

In der Western-Blot-Analyse zeigten lediglich drei von neun AML-Zelllinien eine geringgradig positive Expression für das Robo4-Protein. Im Vergleich zur Robo4-Proteinsynthese der HUVEC-Zellen war die Proteinmenge in den drei als positiv bezeichneten Zelllinien deutlich geringer.

Es ist anzunehmen, dass trotz enger Verwandtschaft von Endothel- und hämatopoetischer Vorläuferzelle Blasten der AML-Zelllinien den Robo4-Rezeptor nicht beziehungsweise so gering exprimieren, dass das Verfahren der quantitativen PCR die Expressionsrate nicht mehr erfassen kann. Im Western-Blot-Verfahren ließ sich bei einigen Zellreihen Robo4-Protein nachweisen, obwohl Robo4 auf mRNA-Ebene nicht nachweisbar war. Für diese Beobachtung kann es mehrere Erklärungsmöglichkeiten geben. Erstens kann die Halbwertszeit des Proteins auf der Zelloberfläche sehr lang sein (z.B. durch eine Verringerung der zum Abbau führenden Ubiquinierung), so dass es zu einer Akkumulierung des Proteins kommt, während die RNA

relativ schnell degradiert wird (Tan *et al.*, 2000). Weiterhin könnte es zu einer posttranskriptionellen Veränderung der m-RNA z.B. durch Splicing kommen, so dass die auftretenden RNA Moleküle nicht mehr von den PCR-Primern erkannt werden (Skotheim *et al.*, 2007; Laloo *et al.*, 2009). Ein Konzept zur Verbesserung der Ergebnisse wäre zum Beispiel die Hochregulierung des Rezeptors durch Stimulierung mit einem passenden Liganden. Dies könnte in ausgewählten AML-Zelllinien, in denen unter anderem cDNA mit Hilfe der qualitativen PCR nachgewiesen wurde, eine Möglichkeit darstellen, Struktur und Funktionsweise des Robo4-Rezeptors in AML-Blasten genauer zu untersuchen und zu verstehen. Jedoch ist ein natürlicher Ligand für Robo4 bisher nicht bekannt. So scheint Slit2 keine Bindung mit Robo4 einzugehen. Zum einen weist der Rezeptor in seiner molekularen Struktur deutliche Unterschiede zu Robo1 auf, die es ihm nicht erlauben, Slit2 zu binden (Morlot *et al.*, 2007). Zum anderen haben in-vitro-Analysen durch Sheldon *et al.* gezeigt, dass die Zugabe eines Robo4-Antikörpers keinerlei Wirkung auf Slit2 zeigt, eine Bindung zwischen Slit2 und Robo4 also nicht stattfindet (Sheldon *et al.*, 2009).

Blasten aus AML-Patientenproben und AML-Zelllinien wiesen eine erhöhte Expression für den Robo1-Rezeptor auf, zeigten jedoch in den unterschiedlichen Untersuchungsverfahren signifikante Divergenzen. Unter anderem konnte beobachtet werden, dass sich die cDNA-Expression durch die qualitative PCR in SKM-1 durch das Auftreten mehrerer Banden auszeichnete, wohingegen die quantitative PCR an der gleichen Zelllinie trotz hoher Sensitivität dann überraschenderweise überhaupt keine DNA mehr nachweisen konnte. Dies ist möglicherweise auf verschiedene Einflüsse zurückzuführen: Zum Einen sind unterschiedliche Enzyme, Puffer und Temperaturen zum Einsatz gekommen, zum Anderen beeinflussen Geometrie und Volumen im PCR-Röhrchen die effektive Bindungskapazität des Primers, der daraufhin je nach Stärke der Bindung die Ausprägung der Bande beeinflussen kann. Auch könnte es bei einer zu niedrigen Annealing Temperatur bei der konventionellen PCR zum Auftreten von unspezifischen PCR Produkten gekommen sein, deren Bildung mit der qPCR vermieden werden konnte.

Die Expressionsrate des Robo1-Rezeptors in der RT-PCR fiel in Blasten der AML-Zelllinien geringer aus als in HUVEC-Zellen. Die Proteinsyntheserate von Robo1 in AML-Zelllinien war hingegen deutlich höher als in HUVECs. Das Vorhandensein des Robo1-Rezeptors in AML-Blasten ist vor allem im Zusammenhang mit der Expression seines natürlichen Liganden Slit2 zu betrachten. Acht von neun AML-Zelllinien und HUVECs zeigten in der Realtime- und konventionellen PCR eine positive Expression für Slit2. Laut Wang *et al.* schütten Tumorzellen vermehrt Slit2 aus. Der Ligand bindet an Robo1, das sich an

Oberflächen von Tumorendothelzellen befindet. Resultat der Interaktion ist die Förderung der Tumorangio-genese. Untersucht wurden A375-Zellen eines malignen Melanoms (Wang *et al.*, 2003). Fiedler *et al.* konnten einen vergleichbaren Mechanismus in der Pathogenese der AML beschreiben. VEGF, eine vaskulärer Wachstumsfaktor, wird von AML-Blasten sezerniert. Er bindet an den VEGF-Rezeptor-1, der vermehrt in umliegenden Endothel- und AML-Zellen exprimiert wird. Diese Interaktion führt dazu, dass Tumorendothelzellen Wachstumsfaktoren ausschütten, die benachbarte AML-Zellen zur Proliferation und Migration anregen (Fiedler *et al.*, 1997). Die in unseren Analysen beobachtete Expression von Robo1 und Slit2 in AML-Blasten und HUVECs lässt vermuten, dass innerhalb der Rezeptoren und Liganden der Robo-Familie vergleichbare Mechanismen ablaufen. Diese gilt es zu erforschen. Zunächst ist es jedoch von großer Bedeutung, die Interaktion zwischen Slit2 und Robo1 zu verstehen.

Während der embryonalen Neurogenese werden Axone, die vermehrt Robo1 exprimieren, daran gehindert, die Mittellinie im Gehirn zu überkreuzen. Ihr Wachstum beschränkt sich auf Strukturen lateral dieser Zone. Dies geschieht unter dem Einfluss von Slit2. Slit2 bindet an den Robo1-Rezeptor, es kommt zur Unterdrückung der migratorischen Fähigkeit der Zelle. Kommissurale Axone besitzen weniger oder gar kein Robo1 und sind daher imstande, die Mittellinie zu überwinden. Sie zeigen, vereinfacht gesagt, einen stärkeren Wachstums- und Migrationstrieb (Kidd *et al.*, 1998). Intrazellulär bindet Robo1 dabei an Rho-Gap-, Vils- und GAP42-Proteine, drei von vielen intrazellulären Mediatoren zwischen Zelloberfläche und Zytoskelett. Sie dienen dazu, extrazelluläre Signale an den Zellkern oder das Stützskelett der Zelle weiterzugeben. Die Bindung eines dieser Proteine an die intrazelluläre Domäne von Robo1 führt zur Inaktivierung und Downregulierung anderer, intrazellulär gelegener Signale wie Rac und Cdc42. Der ständige Umbau des Zytoskeletts wird durch die Deaktivierung des Cdc42-Signals gehemmt, Bewegung und Wachstum der Zelle daraufhin eingestellt (Hu *et al.*, 2005).

Exprimieren nun Tumorendothelzellen vermehrt Robo1-Rezeptoren, die eine Bindung mit dem Slit2-Liganden eingehen, führt dies vor allem zum Anstieg der Proliferation und Migration des umliegenden Gefäßsystems (Wang *et al.*, 2003). Abhängig vom Ort der Expression und der Gegenwart anderer Liganden und Rezeptoren, die Einfluss auf die Interaktion zwischen Robo1 und Slit2 nehmen, zeigt Robo1 also zwei grundsätzlich verschiedene Effekte. Basis dieses unterschiedlichen Verhaltens ist die Fähigkeit des Robo-Rezeptors zu heterodimerisieren. Wie bereits erwähnt, sind einige Axone während der Neurogenese in der Lage, die Mittellinie im Gehirn zu überkreuzen. Dies geschieht auch durch die Bindung von Robo3 an Robo1. Robo1 und Robo3 heterodimerisieren, dies führt zur

Blockierung des Robo1-Rezeptors, woraufhin das Slit-Protein nicht mehr im Stande ist, an den Rezeptor anzudocken. Das inhibierende Potenzial des Slit2-Liganden wird damit unterdrückt, die Deaktivierung bestimmter intrazellulärer Signale wird verhindert und die Zelle kann sich frei bewegen (Sabatier *et al.*, 2004). Laut Sheldon *et al.* dimerisieren Robo4 und Robo1 in Endothelzellen auf ähnliche Weise. Die Komplexbildung führt dazu, dass Robo1 nach Bindung von Slit2 anstelle eines hemmenden ein promigratorisches Signal an umliegende Endothelzellen weitergibt. Diese Interaktion zwischen Robo1 und Robo4 wird mit der von Tie1 und Tie2 verglichen, zwei ebenfalls am Prozess der Angiogenese beteiligter Faktoren. Tie2 ist Rezeptor des Angiopoetin-1-Liganden, für Tie1 ist bis zum jetzigen Zeitpunkt kein natürlicher Ligand bekannt. Vielmehr geht man davon aus, dass die Aktivität des Tie1-Rezeptors durch sequentielle, kontrollierte Proteolyse gesteuert wird. Proteolyse des Tie1-Rezeptors führt zur Aktivierung des extrazellulären Anteils von Tie1. Tie1 ist daraufhin in der Lage, durch Komplexbildung mit Tie-2 die Bindung des Angiopoetin-1-Liganden an Tie2 zu steuern (Marron *et al.*, 2007). Laut Sheldon *et al.* befindet sich Robo4, ähnlich wie Tie1, in intrazellulären Vesikeln. Proteolyse, Verlagerung an die Zelloberfläche und anschließende Heterodimerisierung mit Robo1 führen dazu, dass Robo4 das Verhalten des Robo1-Rezeptors während der Bindung des Slit2-Liganden verändert. Die Signalweitergabe führt nicht mehr zur Inhibierung sämtlicher promigratorischer Signale, sondern zur Aktivierung des Zytoskeletts und zur Migration der Zelle. Cdc42, ein wichtiger Mediator zwischen extrazellulärem Signal und intrazellulärem Zytoskelett, zeigt während der Bindung von Slit2 an Robo1 in Endothelzellen eine deutlich erhöhte Konzentration auf. Er unterstreicht auf intrazellulärer Ebene die promigratorische Wirkung des Robo1/Slit2 Signalweges. Cdc42 ist, wie bereits erwähnt, ein intrazellulärer Aktivator des Cytoskelett-Umbaus und damit der Migration. Inwiefern dieses Modell auf die Signalkaskade zwischen Robo1 und Slit2 in Blasten und Tumorendothelzellen der AML übertragbar ist, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Hinweise darauf, dass die gleichen Mechanismen im AML-Blasten ablaufen, gibt die Expression des Proteins WASP und seine aktivierte Form PhosphoWASP. WASP, ein weiteres intrazelluläres Protein, das eine Schlüsselrolle in der Weitergabe extrazellulärer Signale durch Robo4 an das Aktin-Cytoskelett spielt (Sheldon *et al.*, 2009), wird in unseren Western-Blot-Analysen in HUVEC- und AML-Zelllinien vermehrt exprimiert.

Laut Derry findet sich die Expression von WASP vor allem auf hämatopoetischen Zellen wieder (Derry *et al.*, 1994). Untersuchungen durch unsere Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass alle AML-Zelllinien und HUVECs vor allem die aktivierte Form des WAS-Proteins, das

phosphorylierte WASP exprimieren. Im Vergleich zu unserer Kontrolle, die sich aus Leukozyten aus Buffy-Coats zusammensetzt, zeigen die AML-Zelllinien sowie die HUVEC-Zellen jedoch eine geringere Proteinexpression für das aktivierte WASP. Der Proteingehalt von WASP in HUVECs liegt deutlich unter dem der AML-Zelllinien.

Die Expression von WAS-Protein in HUVEC-Zellen wurde bereits durch Sheldon *et al.* beschrieben. GST-Pulldown-Experimente durch diese Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass WASP die intrazelluläre Domäne des Robo4-Rezeptors bindet. Da die Expression des Robo4-Rezeptors in unseren untersuchten AML-Zelllinien durch die vorliegenden RT-PCR-Analyse nicht bestätigt werden konnte und die Western-Blot-Analyse lediglich in wenigen AML-Zelllinien eine geringe Proteinexpression zeigte, bleibt die Frage vorerst unbeantwortet, ob es zu einer vergleichbaren Interaktion zwischen Robo4 und WASP innerhalb der AML-Blasten und Endothelzellen kommt. Durch die Diskrepanz zwischen Western-Blot- und RT-PCR-Ergebnissen kann keine Aussage über eine Aktivierung von WAS gemacht werden.

Es ist möglich, dass der andere der beiden Robo-Rezeptoren, Robo1, nicht nur Einfluss auf die bereits bekannten intrazellulären Signalproteine wie Cdc42, sondern auch auf das WAS-Protein nimmt. In weiteren Untersuchungen sollte daher geklärt werden, ob und gegebenenfalls wie Robo1 an der Expression des WAS-Proteins innerhalb der AML beteiligt ist. Es gilt zu erforschen, welche Bedeutung die Expression von Robo1, Slit2 und WASP in Tumorzellen der akuten myeloischen Leukämie hat und wie sich Rezeptor, Ligand und intrazelluläres Protein beeinflussen. Wird die intrazelluläre Konzentration von cdc42 und WASP durch Bindung von Slit2 an Robo1 erhöht? Spielen eventuell andere intrazelluläre Signale eine wichtige Rolle, unter anderem cGMP und cAMP, die bereits in Axonen entdeckt wurden, in denen auch erhöhte Konzentrationen von Slit und Robo beobachtet wurden (Song *et al.*, 1997), oder die PI-3-Kinase, die während der Endothelmigration durch die Anwesenheit von Slit2 gesteuert wird (Wang *et al.*, 2003)? Ist der Robo4-Rezeptor, auch wenn seine Expression in unseren Analysen nur unzureichend festgestellt wurde, ebenfalls entscheidend beteiligt an der Bindung von Slit2 und Robo1? Bildet die Heterodimerisierung von Robo1 und Robo4 in AML-Vorläuferzellen die Grundlage dafür, dass nach Bindung von Slit2 an Robo1 AML-Blasten untereinander und AML-Blast und Tumorendothelzelle Faktoren ausschütten, die Proliferation und Migration fördern? Um diese Fragen beantworten zu können, ist es zunächst sinnvoll, AML-Patientenproben und ausgesuchte AML-Zelllinien, in denen Robo1 exprimiert wird, in einem geeigneten in-vitro-Experiment mit Slit2 zu stimulieren. Assays, in denen die Blasten hinsichtlich Migration und Proliferation untersucht werden, sollten folgen. Verwendet werden sollten vor allem AML-Zelllinien, die sowohl in

der qualitativen PCR, der quantitativen PCR und im Western-Blot-Verfahren eine positive Expression für Robo1 zeigen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Rahmen dieser Arbeit die Expression von Faktoren des Rezeptor-Liganden-Systems Robo in AML-Blasten festgestellt wurde. Es konnte gezeigt werden, dass Robo1 in der Mehrzahl der getesteten AML-Zelllinien exprimiert wird. Ferner konnte bewiesen werden, dass Slit2, natürlicher Ligand des Robo1-Rezeptors, sowohl in HUVECs als auch in AML-Zelllinien synthetisiert wird. Die Expression des endothelspezifischen Rezeptors Robo4 in akuten myeloischen Leukämiezellen konnte jedoch nicht eindeutig dargestellt werden. Lediglich in der qualitativen PCR zeigte sich eine geringe Robo4-Expression in zwei von neun AML-Zelllinien. In weiteren Experimenten wurde das intrazellulär gelegene Protein WASP und seine aktivierte Form Phospho-WASP in allen AML-Zelllinien detektiert. Es spiegelt die in der Zelle ablaufende Signaltransduktion wieder und könnte darauf hinweisen, dass Rezeptoren des Robo-Signalweges Migration und Proliferation des AML-Blasten via WASP-Signalweg beeinflussen (Sheldon *et al.*, 2009). Das Problem ist jedoch, dass AML-Zellen in ihrer Grundstruktur nichts anderes darstellen als Leukozyten und möglicherweise aus anderen, uns bisher unbekanntem Gründen WASP und Phospho-WASP exprimieren.

Untersuchungen der letzten Jahre haben dazu beigetragen, die molekulare Biologie des Rezeptor-Liganden-Systems Robo in neuronalen und endothelialen Zellen besser zu verstehen. Der genaue Mechanismus der Signaltransduktion, die Anzahl der Faktoren, die eine Rolle bei der Weitergabe des Signals spielen und die Umsetzung der eintreffenden Information durch die Zelle bleiben jedoch weitestgehend ungeklärt. Dennoch bieten der in vielen soliden Tumoren entdeckte Robo-Slit-Signalweg und die Endothelspezifität des Robo4-Rezeptors herausragende Möglichkeiten, neue therapeutische Ziele zu formulieren. In Zukunft muss daher geklärt werden, welche Rolle die in unseren Analysen entdeckte Expression von Robo1 und Slit2 in Zellen der akuten myeloischen Leukämie spielt. Im Fokus der Untersuchungen sollte die gegenseitige Beeinflussung der Faktoren des Rezeptor-Liganden-Systems innerhalb der AML sowie die Interaktion der Faktoren in Bezug auf Migration, Proliferation und Tumorigenese stehen.

In Zukunft sollen auch die Wechselwirkungen zwischen Mitgliedern der VEGF-Familie und Faktoren des Robo-Slit Signalweges innerhalb der akuten myeloischen Leukämie untersucht werden. Laut Wang *et al.* induziert der Robo-Slit-Signalweg Tumorigenese unabhängig von VEGF (Wang *et al.*, 2008). Untersucht wurden Zellen eines Plattenepithelkarzinoms. Ein Signalweg der Tumorigenese innerhalb der akuten myeloischen Leukämie, der

unabhängig von VEGF abläuft, wäre in vielerlei Hinsicht interessant. Zum einen könnte die vor allem bei Bevacizumab, einem VEGF-Antagonisten beobachtete Medikamentenresistenz durch neue Substanzen, die das Rezeptor-Liganden-System Robo angreifen, verringert beziehungsweise verhindert werden (Casanovas *et al.*, 2005). Zum anderen könnte die Expression von Slit2 oder Robo1 in AML-Blasten als ein von VEGF-unabhängiger Marker der Tumorprogression dienen, insofern das Expressionsverhalten dieser Faktoren mit dem Wachstumsverhalten des Tumors korreliert.

VI Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BMP	Bone morphogenetic protein
cDNA	Complementary deoxyribonucleid acid
DNA	Deoxyribonucleid acid
Drm	Down-regulated by v-mos
FAB	French-American-British
FLT-3	FMS-like tyrosine kinase-3
HUVECs	Human umbilical venous endothelial cells
HEK	Human Embryonic Kidney
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
NWASP	Neuronales Wiskott-Aldrich-Syndrom Protein
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
WASP	Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein
WBC	White blood cell
WHO	World health organisation
Robo1	Roundabout1
Robo4	Roundabout4
RT-PCR	Realtime-Polymerase-Kettenreaktion
SoV	Natriumorthovanadat
TGF- β	Transforming Growth Factor Beta
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor Alpha
VEGF	Vascular endothelial growth factor

VII Tabellenverzeichnis

1. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Chemikalien/ Medizinprodukte
Tabelle 2	Verwendete Laborgeräte
Tabelle 3	Primäre Antikörper
Tabelle 4	Sekundäre Antikörper
Tabelle 5	Verwendete Primer
Tabelle 6	Verwendete cDNA-Klone
Tabelle 7	Pipettierschema für das REDTaq™ ReadyMix™ PCR Reaction Mix
Tabelle 8	Pipettierschema für das LightCycler® DNA Master SYBR Green I
Tabelle 9	Ablauf der RT-PCR-Reaktion
Tabelle 10	Western-Blot Antikörper
Tabelle 11	Zusammenfassung der Ergebnisse der PCR- und Western-Blot-Analysen

VIII Abbildungsverzeichnis

2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Qualitative PCR zur Bestimmung des cDNA-Gehalts der Robo-Rezeptoren und Liganden in HUVECs.
Abbildung 2	cDNA-Expression von Robo1 in AML-Patientenproben und HUVECs, ermittelt durch die qualitative PCR
Abbildung 3	cDNA-Expression von Robo4 in AML-Patientenproben und HUVECs, ermittelt durch die qualitative PCR.
Abbildung 4	cDNA-Expression des Robo1-Rezeptors in AML-Zelllinien und HUVEC, ermittelt durch die qualitative PCR.
Abbildung 5	cDNA-Expression des Robo4-Rezeptors in AML-Zelllinien und HUVEC, ermittelt durch die qualitative PCR.
Abbildung 6	cDNA-Expression des Slit2-Liganden in AML-Zelllinien und HUVEC, ermittelt durch die qualitative PCR.
Abbildung 7	cDNA-Expression des Gremlin1-Liganden in AML-Zelllinien und HUVEC, ermittelt durch die qualitative PCR.
Abbildung 8	cDNA-Expression von Gapdh in AML-Zelllinien und HUVEC, ermittelt durch die qualitative PCR.
Abbildung 9	Quantitative PCR des Robo1-Rezeptors in AML-Zelllinien und HUVECs.

Abbildung 10	Quantitative PCR des Robo4-Rezeptors in AML-Zelllinien und HUVECs.
Abbildung 11	Quantitative PCR des Liganden Slit2 in AML-Zelllinien und HUVECs
Abbildung 12	Quantitative PCR des Liganden Slit2 in AML-Zelllinien und HUVECs
Abbildung 13	Ergebnis der Western-Blot-Analyse von Robo1 in AML-Zelllinien und HUVECs.
Abbildung 14	Ergebnis der Western-Blot-Analyse von Robo4 in AML-Zelllinien und HUVECs.
Abbildung 15	Ergebnis der Western-Blot-Analyse von Was-Protein in AML-Zelllinien und HUVECs.
Abbildung 16	Ergebnis der Western-Blot-Analyse von pWas-Protein in AML-Zelllinien und HUVECs.
Abbildung 17	Western-Blot-Analyse von pWASP und WASP in AML-Zelllinien und WBCs.

IX Literaturverzeichnis

Albitar M (2001): Angiogenesis in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome. *Acta Haematologica* 106:170-176.

Aul C (1994): Myelodysplastische Syndrome – Präleukämien. Hippokrates. Medizinische Schriftenreihe. Band 27, 196 Seiten, Hamburg, Deutschland.

Battye R, Stevens A, Perry RL et al (2001): Repellent signalling by Slit requires the leucine-rich region repeats. *J Neuroscience* 21:4290-4298.

Bedell VM, Yeo SY, Park KW et al (2005): Roundabout4 is essential for angiogenesis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:6373-6378.

Begemann M (1999): *Praktische Hämatologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart. S.171.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. (1976): Proposals for the classification of the acute leukaemias. French – American – British (FAB) cooperative group. *Br J Haematol* 33: 451 – 458.

Bicknell R, Harris AL (2004): Novel angiogenic signalling pathways and vascular guidance. *Exp Cell Res* 312:668-675.

Brose K, Bland KS, Wang KH, Arnott D, Henzel W, Goodman CS, Tessier-Lavigne M, Kidd T (1999): Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* 96: 795-806.

Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407: 249-257.

Carmeliet P. (2003): Angiogenesis in health and disease. *Nature Med.* 9,6, 653-660.

Casanovas O, Hicklin DJ, Berqers G, Hanahan D. (2005): Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* 8: 299–309.

Cavani S, Perfumo C, Argusti A, Pierluigi M, Perroni L, Schmiegelow K, Petersen MB, Cotter FE, Strigini P, Dagna – Bricarelli F, Nizetic D.(1998): Cytogenetic and molecular study of 32 Down syndrome families: potential leukaemia predisposing role of the most proximal segment of chromosome 21q. *Br J Haematol* 103: 213 – 216.

Chen B, Blair DG, Plisov S, Vasiliev G, Perantoni AO, Chen Q, Athanasiou M, Wu JY, Oppenheim JJ, Yang D. (2004): Cutting edge: bone morphogenetic protein antagonists Drm/Gremlin and Dan interact with Slits and act as negative regulators of monocyte chemotaxis. *J Immunol.* 15;173(10):5914-7.

Craddock C et al. (2005): Biology and management of relapsed acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*;129:18-34.

Dallol A, Forgacs E, Martinez A *et al* (2002): Tumour specific promoter region methylation of the human homologue of the Drosophila Roundabout gene DUTT1 (ROBO1) in human cancers. *Oncogene* 21:3020–3028.

Dallol A, Morton D, Maher ER, Latif F. (2003): SLIT2 axon guidance molecule is frequently inactivated in colorectal cancer and suppresses growth of colorectal carcinoma cells. *Cancer Res.*1;63(5):1054-8.

D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. (1994): Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*26;91(9):4082–4085.

Derry, J. M, Ochs, H. D., and Francke, U. (1994): Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell* 78,635–644.

Dias S, Choy M, Alitalo K, Rafii S (2002): Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C signaling through FLT-4 (VEGFR-3) mediates leukemic cell proliferation, survival, and resistance to chemotherapy. *Blood* 99(6):2179-84.

Dietel M, Suttorp N, Zeitz M (Hrsg.) (2005): *Harrisons Innere Medizin*. 16.Auflage. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag, S.678-683.

Dunwell TL, Dickinson RE, Stankovic T, Dallol A, Weston V, Austen B, Catchpole D, Maher ER, Latif F. (2009): Frequent epigenetic inactivation of the SLIT2 gene in chronic and acute lymphocytic leukemia. *Epigenetics* (4):265-9.

Ehninger G, Link H, Berdel W.E. (2008): *Akute myeloische Leukämie*. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln.

Ferrara N und Henzel W.J. (1989): Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res. Commun.* Jun 15;161(2):851-8.

Fiedler W., Graeven, U., Ergun S., Verago, S., Kilic, N., Stockschlader, M., Hossfeld, D. K. (1997): Vascular endothelial growth factor, a possible paracrine growth factor in human acute myeloid leukemia. *Blood* 89(6):1870-5.

Fiedler W, Mesters R, Tinnefeld H, Loges S, Staib P, Duhrsen U, Flasshove M, Ottmann OG, Jung W, Cavalli F, Kuse R, Thomalla J, Serve H, O'Farrell AM, Jacobs M, Brega NM, Scigalla P, Hossfeld DK, Berdel WE (2003): A phase 2 clinical study of SU5416 in patients with refractory acute myeloid leukemia. *Blood* 102(8):2763-7.

Folkman J (1990): What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst.* 82(1): 4-6.

Folkman J, Shing Y. (1992): Angiogenesis. *J Biol Chem.* 1992 Jun 5;267(16):10931-4.

Folkman, J (1995): Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1(1):27-31.

Gollard RP, Robbins BA, Piro L, Saven A (1996): Acute myelogenous leukemia presenting with bulky lymphadenopathy. Case report and literature review. *Acta Haematol.* 95: 129-134.

Gökbuget N, Ganser und R.F. Schlenk (2005): Akute Leukämien.

<http://www.dgho.de/informationen/leitlinien/leukaemien/Akute%20Leukosen.pdf>.

Gröne J, Doeblner O, Loddenkemper C et al (2006): Robo1/Robo4: differential expression of angiogenic markers in colorectal cancer. *Oncol Rep.* 15:1437-1443.

Hasle, H., Clemmensen, I.H. & Mikkelsen, M. (2000): Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. *Lancet*, 355, 165-169.

Hellenbrecht A, Messerer D, Gökbuget N (2003): Häufigkeiten von Leukämien bei Erwachsenen in Deutschland. <http://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/aerzte/epidemiologie/leukaemiehaeufigkeit/>.

Herold G (2008): Innere Medizin. Herold Verlag, Köln: Eigenverlag, S.81-96.

Herold G (2010): Innere Medizin. Herold Verlag, Köln: Eigenverlag, S.89.

His W (1901): Lecithoblast und Angioblast der Wirbeltiere. *Abhandlung KS Ges. Wiss. Math Phys.* 22: 171.

Hohenester E, Hussain S, Howitt JA (2006): Interaction of the guidance molecule Slit with cellular receptors. *Biochem Soc Trans* 34:418–421.

Hohenester E. (2008): Structural insight into Slit-Robo signalling. *Biochem Soc Trans.* April 36(Pt 2):251-6.

Hou HA, Chou WC, Lin LI, Tang JL, Tseng MH, Huang CF, Yao M, Chen CY, Tsay W, Tien HF (2008): Expression of angiopoietins and vascular endothelial growth factors and their clinical significance in acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* 32(6):904-12.

Hsu, D. R., Economides, A. N., Wang, X., Eimon, P. M., and Hartland, R. M. (1998): The *Xenopus* dorsalizing factor gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. *Mol. Cell* 1, 673–683.

Hu H, Li M, Labrador JP et al (2005): Cross GTPase-activating protein (CrossGAP)/Vilse links the Roundabout receptor to Rac to regulate midline repulsion. *Proc Natl Acad Sci*

102:4613–4618.

Huber TL, Zhou Y, Mead PE, Zon LI. (1998): Cooperative effects of growth factors involved in the induction of hematopoietic mesoderm. *Blood.*;92(11):4128-37.

Huminięcki L, Gorn M, Suchting S et al (2002): Magic roundabout is a new member of the roundabout receptor family that is endothelial specific and expressed at sites of active angiogenesis. *Genomics* 79:547–552.

Hutt AM, Kalf GF (1996): Inhibition of human DNA topoisomerase II by hydroquinone and p – benzoquinone, reactive metabolites of benzene. *Environ Health Perspect* 104:1265 – 1269.

Informationsdienst Wissenschaft RKI (2006): Krebs in Deutschland. Häufigkeit und Trends. Krebsregister. ISBN 978-3-89606-207-9.

Jackson GH. (2004): Use of fludarabine in the treatment of acute myeloid leukemia. *Hematol J*;5(Suppl 1):62-67.

Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. (2001): World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press.

Jamshidi K, Swaim WR (1971): Bone marrow biopsy with unaltered architecture: a new biopsy device. *J Lab Clin Med.* 77(2):335–342.

Josko, J., Gwozdz, B., Jedrzejowska-Szypulka, H., Hendryk, S. (2000): Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis. *Med Sci Monit* . 6(5):1047-52.

Kidd T, Brose K, Mitchell KJ et al (1998): Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell* 92:205–215.

Kuchenbauer F, Kern W, Schoch C et al. (2005): Detailed analysis of FLT3 expression

levels in acute myeloid leukemia. *Haematologica*; 90: 1617-25.

Laloo Benoit, Delphine Simon, Veronique Veillat, Dorine Lauzel, Veronique Guyonnet-Duperat, Francois Moreau-Gaudry, Francis Sagliocco, Christophe Grosset (2009): Analysis of Post-transcriptional Regulations by a Functional, Integrated, and Quantitative Method. *MCP Papers in Press* DOI 10.1074/ mcp.M800503-MCP200.

Largaespada DA (2000): Genetic heterogeneity in acute myeloid leukemia: maximizing information flow from MuLV mutagenesis studies. *Leukemia*, 14: 1174-1184

Lappin DW, McMahon R, Murphy M, Brady HR (2002): Gremlin: an example of the re-emergence of developmental programmes in diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*, 17 Suppl 9:65-7.

Latil A, Che`ne L, Cochant-Priollet B et al. (2003): Quantification of expression of netrins, Slits and their receptors in human prostate tumours. *Int J Cancer*, 103:306–315.

Lawler M. (1997): Leukaemogenesis, gene interplay, and the role of the haemopoietic environment. *Radiat. Oncol. Investig*, 5: 154 – 157.

Legg A.J., Herbert J, Clissold P, Bicknell R (2008): Slits and Roundabouts in cancer, tumour angiogenesis and endothelial cell migration. *Angiogenesis*, 11:13-21.

Linn Y., Weisdorf D.j., Solovey, A. Hebbel, R. P. (2000): Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J.Clin. Invest.*, 105, 71-77.

Liu Z, Patel K, Schmidt H, Andrews W, Pini A, Sundaresan V., 2004: Extracellular Ig domains 1 and 2 of Robo are important for ligand (Slit) binding. *Mol Cell Neurosci.*;26:232–240

Marron MB, Singh H, Tahir TA et al. (2007): Regulated proteolytic processing of Tie1 modulates ligand responsiveness of the receptor tyrosine kinase Tie2. *J Biol Chem* 282:30509–30517.

Martyré MC, Le Bousse-Kerdiles MC, Romquin N, Chevillard S, Praloran V, Demory JL, Dupriez B. (1997): Elevated levels of basic fibroblast growth factor in megakaryocytes and platelets from patients with idiopathic myelofibrosis. *Br J Haematol*;97(2):441-8.

Mitchel RE, Jackson JS, McCann RA, Boreham DR. (1999): The adaptive response modifies latency for radiation – induced myeloid leukemia in CBA / H mice. *Radiat Res* 152:273 – 279.

Morlot C, Thielens NM, Ravelli RB et al (2007): Structural insights into the Slit–Robo complex. *Proc Natl Acad Sci USA*.104:14923–14928.

Namkoong H, Shin SM, Kim HK, Ha SA, Cho GW, Hur SY, Kim TE, Kim JW (2006): The bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is overexpressed in human cancers and interacts with YWHAH protein. *BMC Cancer*.:18;6:74.

Narayan G, Goparaju C, Arias-Pulido H et al (2006): Promoter hypermethylation-mediated inactivation of multiple Slit–Robo genes in cervical cancer progression. *Mol. Cancer* 5:16.

National Cancer Institute, Cancer Statistics Review (1975-2006), www.seer.cancer.gov.

O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S. et al. (1997): Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*. 1997 88(2):277-85.

Padró T, Ruiz S, Bieker R, Bürger H, Steins M, Kienast J, Büchner T, Berdel WE, Mesters RM (2000): Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Blood*.15;95(8):2637-44.

Padró T, Bieker R, Ruiz S, Steins M, Retzlaff S, Bürger H, Büchner T, Kessler T, Herrera F, Kienast J, Müller-Tidow C, Serve H, Berdel WE, Mesters RM (2002): Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its cellular receptor KDR (VEGFR-2) in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2002 Jul; 16(7):1302-10.

Park KW, Morrison CM, Sorensen LK et al (2003): Robo4 is a vascular-specific receptor that inhibits endothelial cell migration. *Dev Biol* 261:251–267.

Pearce JJ, Penny G, Rossant J. (1999): A mouse cerberus/Dan-related gene family. *Dev Biol.* 1;209(1):98-110.

Rajagopalan S, Nicolas E, Vivancos V, Berger J, Dickson BJ. (2000): Crossing the midline: roles and regulation of Robo receptors. *Neuron.*;28(3):767-77.

Rothberg JM, Hartley DA, Walther Z, Artavanis-Tsakonas S. (1988): slit: an EGF-homologous locus of *D. melanogaster* involved in the development of the embryonic central nervous system. *Cell.* 1988 Dec 23;55(6):1047-59.

Rumpold, H., Wolf, D., Koeck, R., Gunsilius, E. (2004): Endothelial progenitor cells: a source for therapeutic vasculogenesis? *J Cell Mol Med.* 8(4):509-18.

Sabatier C, Plump AS, Le Ma et al. (2004): The divergent Robo family protein Rig-1/Robo3 is a negative regulator of Slit responsiveness required for midline crossing by commissural axons. *Cell* 117:157–169.

Sabin, F. R. (1917): Preliminary note on the differentiation of angioblasts and the method by which they produce blood-vessel, blood-plasma and red blood cells as seen in the living chick. *Anat Rec.* 13: 199-204.

Schaich M., Ehninger G. (2008): Chemotherapie der akuten myeloischen Leukämie. http://www.onkodin.de/e2/e51675/e53188/e53189/index_ger.html.

Schlenk RF, Benner A, Hartmann F, del Valle F, Weber C, Pralle H, Fischer JT, Gunzer U, Pezzutto A, Weber W, Grimminger W, Preiss J, Hensel M, Fröhling S, Döhner K, Haas R, Döhner H (2003): Risk-adapted postremission therapy in acute myeloid leukemia: results of the German multicenter AML HD93 treatment trial. *Leukemia*;17(8):1521-8.

Schmid BC, Reznicek GA, Fabjani G et al (2007): The neuronal guidance cue Slit2 induces targeted migration and may play a role in brain metastasis of breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 106:333–342.

- Schott RJ, Morrow LA. (1993): Growth factors and angiogenesis. *Cardiovasc Res.*;27(7):1155-61.
- Seth P, Lin Y, Hanai JI et al (2005): Magic roundabout, a tumor endothelial marker: expression and signaling. *Biochem Biophys. Res Commun* 332:533–541.
- Shalaby F, Ho J, Stanford WL, Fischer KD, Schuh AC, Schwartz L, Bernstein A, Rossant J. (1997): A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell.* Jun 13;89(6):981-90.
- Sheldon H, Andre M, Legg JA, Heal P, Herbert JM, Sainson R, Sharma AS, Kitajewski JK, Heath VL, Bicknell R. (2009): Active involvement of Robo1 and Robo4 in filopodia formation and endothelial cell motility mediated via WASP and other actin nucleation-promoting factors. *FASEB J.*;23(2):513-22.
- Simpson JH, Kidd T, Bland KS, Goodman CS. (2000): Short-range and long-range guidance by slit and its Robo receptors. Robo and Robo2 play distinct roles in midline guidance. *Neuron.*;28(3):753-66.
- Skotheim Rolf I., Matthias Nees (2007) : Alternative splicing in cancer: Noise, functional, or systematic? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (2007) 1432–1449.
- Song, H-j., Ming, G-l., and Poo, M-m. (1997): cAMP-induced switching in turning direction of nerve growth cones. *Nature* 388, 275-279.
- Stabile H, Mitola S, Moroni E, Belleri M, Nicoli S, Coltrini D, Peri F, Pessi A, Orsatti L, Talamo F, Castronovo V, Waltregny D, Cotelli F, Ribatti D, Presta M. (2007): Bone morphogenic protein antagonist Drg/gremlin is a novel proangiogenic factor. *Blood.*;109(5):1834-40.
- Stockerl-Goldstein KE BK (2004): Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Adult Patients with Acute Myeloid Leukemia.
- Suchting S, Heal P, Tahtis K et al (2005): Soluble Robo4 receptor inhibits in vivo angiogenesis and endothelial cell migration. *FASEB J* 19:121–123.

Suchting S, Bicknell R, Eichmann A (2006): Neuronal clues to vascular guidance. *Exp Cell Res* 312:668–675.

Suchting S, Bicknell R, Eichmann A (2006): Neuronal clues to vascular guidance. *Exp Cell Res* 312:668–675.

Takenawa T, Miki H. (2001): WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J Cell Sci.*;114(Pt 10):1801-9. Review.

Tan Z, W Qu², W Tu¹, W Liu⁴, M Baudry⁴ and Schreiber (2000): p53 accumulation due to down-regulation of ubiquitin: relevance for neuronal apoptosis. *Cell Death and Differentiation* (2000) 7, 675 ± 681

Tobler A, Moser B, Dewald B, Geiser T, Studer H, Baggiolini M, Fey MF. (1993): Constitutive expression of interleukin-8 and its receptor in human myeloid and lymphoid leukemia. *Blood.*;82(8):2517-25.

Valk PJ, Verhaak RG, Beijen MA, Erpelinck CA, Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Boer JM, Beverloo HB, Moorhouse MJ, van der Spek PJ, Löwenberg B, Delwel R. (2004): Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.*;350(16):1617-28.

Wang B, Xiao Y, Ding BB et al (2003): Induction of tumour angiogenesis by Slit–Robo signalling and inhibition of cancer growth by blocking Robo activity. *Cancer Cell* 4:19–29.

Wu JY, Feng L, Park HT et al (2001): The neurorepellent Slit inhibits leukocyte chemotaxis induced by chemotactic factors. *Nature* 410:948–952.

Young DC, Griffin JD (1986): Autocrine secretion of GM-CSF in acute myelogenous leukemia. *Blood*, 68: 1178-1181

Young PE, Baumhueter S, Lasky LA. (1995): The sialomucin CD34 is expressed on hematopoietic cells and blood vessels during murine development. *Blood*. Jan1;85(1):96-105.

X Danksagung

Ich danke meiner Betreuerin Frau Dipl.-biol. Jasmin Otten, die mir in den letzten zwei Jahren zu jeder Tages- und Nachtzeit bereitwillig mit Rat und Tat zur Seite stand. Ich bedanke mich für die Geduld, die motivierenden Gespräche und die Hilfestellungen, die Sie mir in dieser Zeit entgegenbrachte.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. W. Fiedler, meinem Doktorvater, der es mir ermöglichte, zwei spannende Forschungsjahre auf dem Gebiet der Hämato-Onkologie erleben zu dürfen. Durch wertvolle Ratschläge haben Sie maßgeblich zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen.

Ich bedanke mich bei unserer gesamten Arbeitsgruppe und allen Mitarbeitern des Campus Forschung für die Zusammenarbeit. Durch die nette Atmosphäre konnte auch der ein oder andere Tiefschlag überwunden werden.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich besonders für die tröstenden und motivierenden Gespräche, aus denen ich immer wieder neue Kraft schöpfen konnte.

Für jede Menge Geduld, Enthusiasmus und Hilfe bei kleinen und großen Krisen danke ich meiner Freundin Fanny.

XI Lebenslauf

Persönliche Daten :

Name	Thoren Adam Müller
Geburtsdatum	30.11.1983
Geburtsort	Aachen
Anschrift	Bremer Reihe 20, 20099 Hamburg
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Schullaufbahn :

08/1990 - 07/1994	Grundschule Laurensberg
08/1994 - 06/2003	Kaiser-Karl-Gymnasium
Abschluss:	1,9, Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst :

08/2003 - 06/2004	Reha-Klinik Schwertbad Bad Aachen
-------------------	--------------------------------------

Akademische Ausbildung

10/2004 – 10/2010	Humanmedizin am Universitätskrankenhaus Eppendorf der Freien Universität Hamburg
10/2010	2. Staatsexamen Examensnote: 1,66 (<i>gut</i>)
09/2006	1. Staatsexamen (Physikum) Examensnote: 2,0 (<i>gut</i>)

Praktische Tätigkeiten:

07/2004	Pflegepraktikum St. Augustinus-Krankenhaus Düren
05/2005 – 06/2005	Pflegepraktikum Elim-Krankenhaus Hamburg-Eimsbüttel
08/2007	Famulatur Gastroenterologie im Luisen-Hospital Aachen
06/2008	Famulatur Onkologische Ambulanz Universitätsklinikum Hamburg
08/2008 – 09/2008	Famulatur Hämatologie Chaim sheba medical center Tel-Aviv, Israel
03/2009 – 04/2009	Famulatur Allgemeinmedizin Gemeinschaftspraxis Dr.med. Fischer & Dr.med. Müller, Aachen
08/2009 – 10/2009	PJ-Tertial Radiologie (1.Hälfte) Universitätsklinikum Hamburg
10/2009 – 12/2009	PJ-Tertial Radiologie (2.Hälfte) Royal London Hospital London, Großbritannien
12/2009 – 01/2010	PJ-Tertial Innere Medizin (1.Hälfte) Asklepios Klinik Barmbek Hamburg
02/2010 – 03/2010	PJ-Tertial Innere Medizin (2.Hälfte) New Somerset Hospital Kapstadt, Südafrika
03/2010 – 06/2010	PJ-Tertial Chirurgie Asklepios Klinik St.Georg Hamburg

XII Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Versicherung

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.

Unterschrift:

