

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus dem Institut für Biochemie und Signaltransduktion  
des Zentrums für Experimentelle Medizin  
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf  
Direktor: Prof. Dr. Georg W. Mayr

## **Identifizierung von differentiell exprimierten Genen einer faktorunabhängigen Zelllinie mit einer Leukämie-assoziierten chromosomalen Aberration (3q21)**

### **Dissertation**

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

vorgelegt von:

Sebastian Gelbert

aus Bad Hersfeld, Deutschland

Hamburg 2017

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 01.09.2017**

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

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. M. Jücker**

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

# Inhaltsverzeichnis

1. Arbeitshypothese und Fragestellung .....	6
2. Einleitung .....	7
2.1 Chromosomale Aberrationen .....	7
2.1.1 Die Bedeutung rekurrenter chromosomaler Aberrationen in der Tumorentstehung .....	7
2.1.2 Mechanismen der Tumorentstehung in Folge chromosomaler Translokationen...	8
2.2 Leukämien .....	11
2.2.1 Definition, Inzidenz und Einteilung von Leukämien .....	11
2.2.2 Akute myeloische Leukämie.....	12
2.2.3 Zytogenetische Veränderungen der AML.....	14
2.2.4 Therapie der AML .....	15
2.3 Wachstumsfaktorunabhängigkeit in hämatopoetischen Zelllinien.....	16
2.4 3q21-Aberrationen .....	17
2.5 Die NOS1 Zelllinien als Modellsystem einer 3q21-Aberration.....	19
3. Material und Methoden .....	21
3.1 Materialien .....	21
3.1.1 Chemikalien .....	21
3.1.2 Puffer und Stammlösungen .....	21
3.1.3 Enzyme und Reaktionskits .....	22
3.1.4 Bakterienstämme.....	23
3.1.5 DNA-Oligonukleotide.....	23
3.1.6 Vektoren .....	24
3.1.7 Zelllinien .....	25
3.1.7.1 NOS1-#4 und NOS1-FI.....	25
3.1.7.2 MV 4-11 .....	25
3.1.8 Geräte .....	26
3.1.9 Verbrauchsmaterialien .....	27
3.2 Methoden.....	27
3.2.1 Zellkultur.....	27
3.2.1.1 Stammhaltung und Vermehrung .....	27
3.2.1.2 Einfrieren von Zellen .....	28

3.2.1.3	Auftauen von Zellen.....	28
3.2.1.4	Zellzahlbestimmung mittels Trypanblaufärbung .....	29
3.2.2	Isolation von Gesamt-RNA aus Gewebekulturzellen .....	29
3.2.3	cDNA Synthese.....	30
3.2.4	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der Nucleinsäuren .....	30
3.2.5	Polymerasekettenreaktion .....	31
3.2.5.1	Konventionelle PCR.....	31
3.2.5.2	Quantitative Real-Time RT-PCR .....	32
3.2.5.3	Agarosegel.....	33
3.2.5.4	Annealingzeit und Annealingtemperatur der Oligonucleotide .....	33
3.2.6	Proliferationsversuche.....	34
3.2.6.1	Proliferationsversuch mit Überstand der NOS1-FI.....	34
3.2.6.2	Proliferationsversuch mit einem Flt3-Tyrosinkinaseinhibitor .....	34
3.2.7	Klonierung des CYTL1-Gens in einen retroviralen Vektor.....	35
3.2.7.1	Bakterienkulturen .....	35
3.2.7.2	Anlegen von Glycerolstocks .....	35
3.2.7.3	Transformation von Bakterien .....	35
3.2.7.4	Restriktionsverdau.....	36
3.2.7.5	Dephosphorylierung von DNA .....	37
3.2.7.6	Ligation von DNA.....	37
3.2.7.7	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	37
3.2.7.8	Mini-Präparation .....	38
3.2.7.9	Sequenzierung .....	38
4.	Ergebnisse .....	40
4.1	Auswahl der zu untersuchenden Gene .....	40
4.2	Untersuchung der Genexpression mittels quantitativer Real-Time PCR .....	42
4.2.1	Gene mit postulierter Assoziation zu 3q21-Aberrationen.....	43
4.2.2	Gene im Bruchpunktbereich der Translokation .....	44
4.2.3	Gene mit proliferationsfördernden Eigenschaften unabhängig von der 3q21- Translokation.....	46
4.3	Proliferationsversuche .....	46
4.3.1	Zellproliferation der NOS1-Zellen mit Überstand der NOS1-FI-Zellen .....	47
4.3.2	Proliferationsversuch mit einem Flt3-Tyrosinkinaseinhibitor .....	48

4.4	Klonierung des CYTL1-Gens in den SF91 Vektor .....	49
5.	Diskussion .....	50
5.1	Einleitung .....	50
5.2	Diskussion der untersuchten Gene mit proliferationsfördernden Eigenschaften unabhängig von der 3q21-Translokation .....	51
5.2.1	Cytokine like 1 (CYTL1) .....	51
5.2.2	AF4/FMR2 Family, Member (AFF3) .....	53
5.2.3	FMS-related tyrosine kinase 3 (FLT3).....	54
5.3	Diskussion der untersuchten Gene im Bereich des Bruchpunktes der 3q21- Translokation .....	58
5.3.1	Transmembrane and coiled-coil domain family 1 (TMCC1) .....	58
5.3.2	KIAA1257 .....	59
5.3.3	Ninjurin 2 (NINJ2).....	59
5.3.4	WNK lysine deficient protein kinase 1 (WNK1).....	61
5.3.5	GATA Binding Protein 2 (GATA2) .....	63
5.3.6	Ribophorin 1 (RPN1).....	64
5.4	Ausblick .....	66
6.	Zusammenfassung .....	68
6.1	Zusammenfassung .....	68
6.1	Abstract .....	69
7.	Literaturverzeichnis .....	71
8.	Anhang .....	81
8.1	Abkürzungsverzeichnis .....	81
8.2	Danksagung .....	84
8.3	Lebenslauf .....	85

# 1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Chromosomale Aberrationen, insbesondere Translokationen, sind ein wichtiger Mechanismus bei der Entstehung maligner Erkrankungen. Die Identifikation der involvierten Gene und die Entschlüsselung ihrer Rolle in der Kanzerogenese und Leukämogenese ist dabei nicht nur ein entscheidender Faktor für das Verständnis der Krebsentstehung, die involvierten Gene bzw. die Genprodukte bieten auch einen hervorragenden Ansatz für die Behandlung dieser Erkrankungen. Ziel dieser experimentellen Doktorarbeit war es, den Zusammenhang von wachstumsfaktorunabhängigem Wachstum einer AML-Zelllinie und der in Leukämien vorkommenden, mit einer schlechten Prognose einhergehenden, chromosomalen Aberration 3q21 zu untersuchen. Hierzu wurde als Modellsystem die humane, wachstumsfaktorabhängige Leukämiezelllinie NOS1, die GM-CSF zum Wachstum benötigt, und die von dieser Linie abstammende wachstumsfaktorunabhängige Sublinie NOS1-FI, welche ohne GM-CSF wächst und eine 3q21-Translokation aufweist, verwendet. Basierend auf vorliegenden Microarray-Expressionsdaten dieser beiden Linien sollten in dieser Arbeit die differenzielle Expression von bestimmten Gene mittels quantitativer RNA-Analysen im LightCycler validiert werden, welche eine unterschiedliche Expression in beiden Linien zeigen und in einer Entfernung von maximal einer Million Basenpaare zum Bruchpunkt auf dem translozierten Teilstück 3q21 bzw. auf dem angrenzenden Abschnitt von Chromosom 12 liegen. Zudem sollte die differenzielle Expression ausgewählter Gene, unabhängig von deren Lage in der Nähe des 3q21-Bruchpunkts untersucht werden. Diese Gene wurden aufgrund ihrer bekannten oder postulierten proliferationsfördernden Eigenschaften aus den vorhandenen Microarray-Daten ausgewählt und hinsichtlich der Frage untersucht, ob sie in der wachstumsfaktorunabhängigen Zelllinie eine veränderte Expression zeigen und somit möglicherweise zu der Wachstumsfaktorunabhängigkeit beigetragen haben könnten. Nach der Validierung der differentiellen Expression solcher potenziell wichtigen Gene mittels quantitativer RT-PCR sollte exemplarisch untersucht werden, ob das Wachstum der wachstumsfaktorunabhängigen NOS1-FI-Zellen durch einen spezifischen Hemmstoff gegen das in diesen Zellen hochregulierte Target-Protein inhibiert werden kann. Letztlich sollte untersucht werden, ob das faktorunabhängige Wachstum der Zelllinie NOS1-FI möglicherweise durch eine autokrine Stimulation von sezernierten Wachstumsfaktoren vermittelt wird. Hierfür sollten Proliferationsexperimente mit dem Zellkulturüberstand der NOS1-FI-Zellen auf den parentalen NOS1-Zellen in GM-CSF-freiem Medium durchgeführt werden.

## **2. Einleitung**

### **2.1 Chromosomale Aberrationen**

#### **2.1.1 Die Bedeutung rekurrenter chromosomaler Aberrationen in der Tumorentstehung**

Chromosomale Veränderungen sind ein bedeutender Faktor in der Entstehung maligner Erkrankungen. Bis heute sind weit mehr als 50.000 Fälle chromosomaler Aberrationen in über 11.500 Publikationen in Verbindung mit verschiedensten Tumortypen beschrieben (Mitelman et al. 2013). Theodor Boveri postulierte bereits 1914 die Idee, dass erworbene strukturelle Veränderungen der Chromosomen eine Ursache für die maligne Entartung von Zellen darstellen (Boveri 1914). Aufgrund der fehlenden technischen Mittel konnte diese Hypothese in den folgenden Jahrzehnten nicht bewiesen werden, bis schließlich im Jahr 1960 von Nowell und Hungerford zum ersten Mal eine spezifische chromosomale Veränderung, das Philadelphia Chromosom, mit einer malignen Erkrankung, der chronisch myeloischen Leukämie (CML), in direktem Zusammenhang beschrieben wurde (P. C. Nowell & Hungerford 1960; Peter C Nowell & Hungerford 1960). In den folgenden Jahren und mithilfe neuer Darstellungsmethoden für die Struktur von Chromosomen, insbesondere der G-Bänderung, wurde diese Veränderung als reziproke Translokation der Chromosomen 9 und 22 identifiziert (Caspersson et al. 1970).

Somit war das Philadelphia Chromosom die erste beschriebene rekurrente Translokation in einer malignen Erkrankung, der molekulare Mechanismus dahinter blieb zunächst unverstanden. Die erste molekulare Charakterisierung einer spezifischen Translokation gelang in den 1980er Jahren mit der Identifikation des c-MYC-Onkogens am Bruchpunkt der Translokation t(8;14) des Burkitt-Lymphoms. Kurz darauf wurde mit der Entdeckung des BCR/ABL-Fusionsgens auch die molekulare Grundlage des Philadelphia-Chromosoms entschlüsselt (Stam et al. 1985). Diese beiden Entdeckungen gaben den Anstoß für die dezidierte Erforschung weiterer chromosomaler Aberrationen in neoplastischen Erkrankungen und deren Bedeutung für die maligne Transformation von Zellen (Mitelman et al. 2007). Insbesondere technische Innovationen wie die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und die Microarray basierte, komparative genomische Hybridisierung (aCGH), brachten enorme Fortschritte auf diesem Gebiet. Bis heute sind mehr als 60.000 Fälle von chromosomalen Aberrationen in über 100.000 Publikationen beschrieben (F Mitelman et al., 2013; Felix Mitelman et al., 2007). Über den Fokus auf rekurrente chromosomale

Veränderungen ergab sich die Entdeckung von mittlerweile insgesamt 337 verschiedenen, in Fusionen involvierten Genen (Mitelman et al. 2007). Die so identifizierten (Proto-)Onkogene bilden heute einen Grundstein für das Verständnis der neoplastischen Entartung von Zellen (Futreal et al. 2004; Sjöblom et al. 2006). Ein Großteil der bisher bekannten Neoplasien mit spezifischen chromosomalen Aberrationen machen die hämatologischen Erkrankungen, wobei jedoch auch in zahlreichen soliden mesenchymalen und epithelialen Tumoren rekurrente Aberrationen beschrieben worden sind (Gasparini et al. 2007).

### **2.1.2 Mechanismen der Tumorentstehung in Folge chromosomaler Translokationen**

Es gibt grundsätzlich zwei Wege, wie eine Translokation zur unkontrollierten Proliferation und somit zur neoplastischen Transformation führen kann. Zum einen ist das über die Bildung von Fusionsproteinen möglich, zum anderen kann dies über die dysregulierte Expression eines strukturell normalen Proteins durch translokationsbedingte Verlagerung in einen fremden Promotorbereich geschehen.

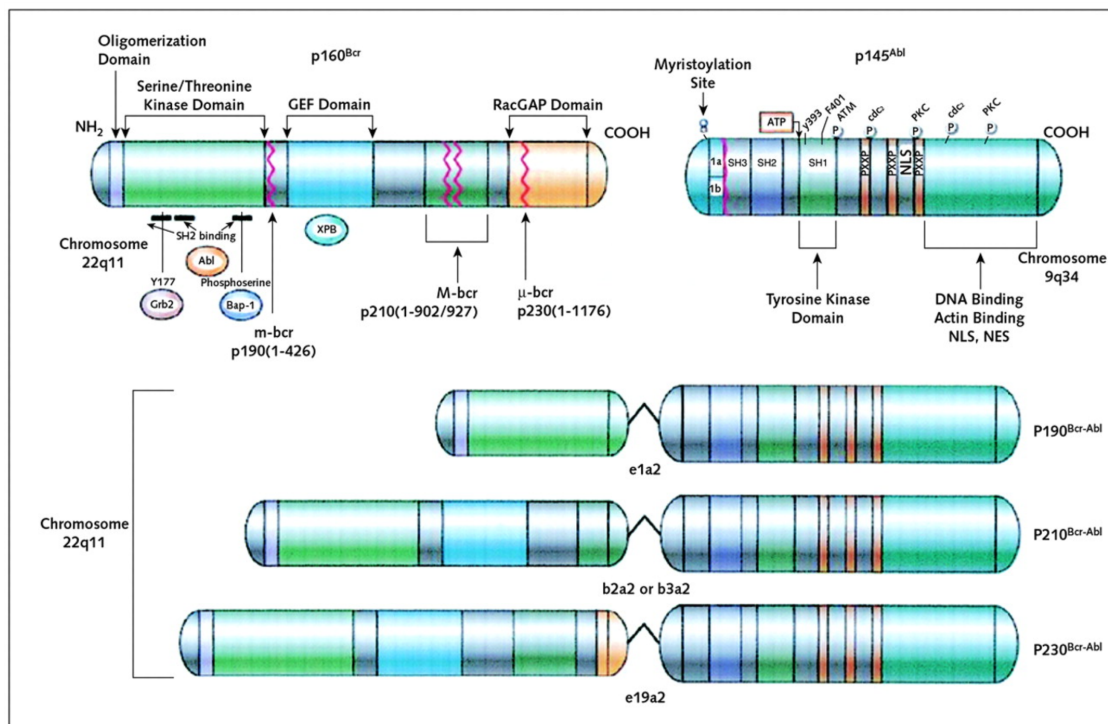
Das erste und bekannteste Beispiel für eine maligne Transformation von Zellen infolge einer chromosomalen Translokation mit Ausbildung eines Fusionsgens ist sicherlich das Philadelphia-Chromosom. Hieran soll beispielhaft der Mechanismus von Fusionsproteinen in der Tumorentstehung erläutert werden.

Das Philadelphia-Chromosom ist eine chromosomale Translokation zwischen Chromosom 9 und Chromosom 22  $t(9;22)(q34;q11)$  (Peter C Nowell & Hungerford 1960). Aus dieser Translokation resultiert eine Genfusion zwischen dem BCR-Gen auf Chromosom 22 und dem ABL1-Gen auf Chromosom 9 (Stam et al. 1985). Abgesehen von der Fusion im Rahmen des Philadelphia-Chromosoms ist über die Genfunktion von Wildtyp-BCR, trotz intensiver Forschung, nicht viel bekannt. Das BCR-Protein hat eine Serin/Threonin-Kinase-Funktion und ist ein GTPase aktivierendes Protein für p21rac (National Center for Biotechnology Information 2015b). Das ABL-Gen ist ein Protoonkogen, welches für eine Tyrosinkinase mit vielfältigen Funktionen in der Zelle wie Zellteilung, Adhäsion, Differenzierung und Anpassung an Stress (National Center for Biotechnology Information 2015a) verantwortlich ist.

Durch die Fusion beider Gene kommt es zur Bildung einer chimären mRNA, diese wird, je nach Bruchpunkt und aufgrund alternativen Splicings, in ein BCR-ABL-



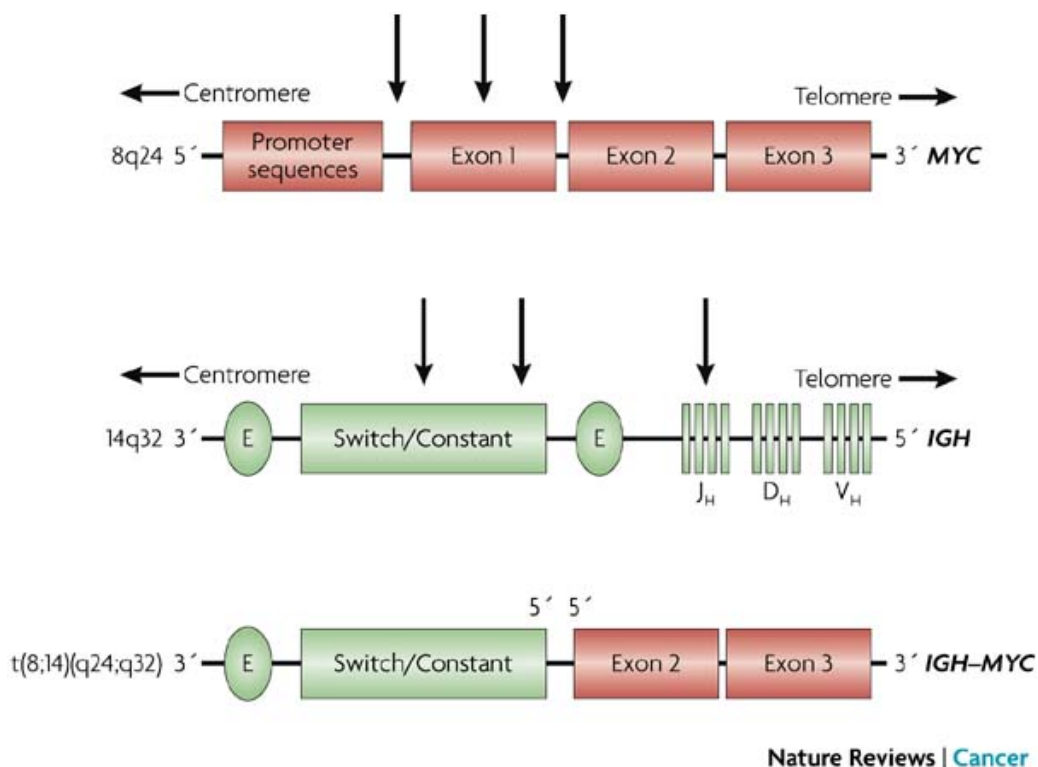
Fusionsprotein mit einem Molekulargewicht von 230 kDa, 210 kDa oder 190 kDa translatiert (siehe Abbildung 1). Physiologisch steht die Funktion der ABL-Kinase in der Zelle unter strenger Regulation (Konopka et al. 1984). Diese Kontrolle ist bei dem BCR/ABL-Onkoprotein aufgehoben, die Proteinkinase ist hier dauerhaft aktiv, die Aktivität der Kinase korreliert dabei mit dem Potential zur malignen Transformation (Lugo et al. 1989).



**Abb. 1 Die normalen BCR- und ABL- Proteine und die verschiedenen aberranten Fusionsproteine:** Dargestellt sind die in der oberen Reihe das normale BCR-Protein (links) und das ABL-Protein (rechts) mit den jeweiligen funktionellen Domänen. Unten sind drei verschiedene Varianten des BCR-ABL-Fusionsprotein dargestellt (Kurzrock et al. 2003)

Die ständig aktivierte Kinasefunktion führt über vielfältige und komplexe Wege zu vermehrter Proliferation, über die Aktivierung von zahlreichen Signalwegen, unter anderem des Ras-Signalwegs, über die Hemmung der Apoptose, über die Veränderung von Adhäsionsmolekülen und über Veränderungen in den DNA-Reparaturmechanismen der Zelle (Kurzrock et al. 2003). Das BCR/ABL-Onkoprotein kann in vitro zu einer Wachstumsfaktorunabhängigkeit von CD34 positiven Stammzellen führen (Chalandon et al. 2004).

Der zweite Mechanismus, über den eine chromosomale Translokation zur malignen Transformation führt, ist die fehlregulierte Expression eines Protoonkogens durch translokationsbedingte Verlagerung in einen anderen Promotorbereich. Dies soll beispielhaft anhand des Burkitt-Lymphoms erörtert werden. Beim Burkitt-Lymphom tritt eine von drei rekurrenten chromosomalen Translokationen auf,  $t(8;14)(q24;q32)$ ,  $t(2;8)(p11;q24)$  oder  $t(8;22)(q24;q11)$ . Alle drei Translokationen schließen das Myc-Onkogen auf Chromosom 8 ein, die anderen Bruchpunkte befinden sich jeweils in einem Immunglobulin-Gen (Abb. 2) (Mitelman et al. 2007). Da die Immunglobulin-Gene in Lymphozyten sehr stark exprimiert werden, steht nun ein sonst streng reguliertes Gen, nämlich Myc, unter dem Einfluss eines stark aktiven Promotors, was zu einer konstitutiven Expression des Myc-Gens führt. Das Myc-Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der in zahlreichen proliferationsfördernden Signalwegen beteiligt ist, und die Überexpression führt zur unkontrollierten Proliferation der Zellen und damit schließlich zur malignen Transformation (Sewastianik et al. 2014).



**Abb. 2 Hochregulation durch Genfusion:** Die Translokation  $t(8;14)(q24;q32)$  führt zu einer Dysregulation der Expression des MYC-Onkogens durch Verlagerung zweier kodierender Exons in die Enhancer Region (E) der stark exprimierten Immunglobulin-Schwerkette-Gene (IGH) (Mitelman et al. 2007)

## 2.2 Leukämien

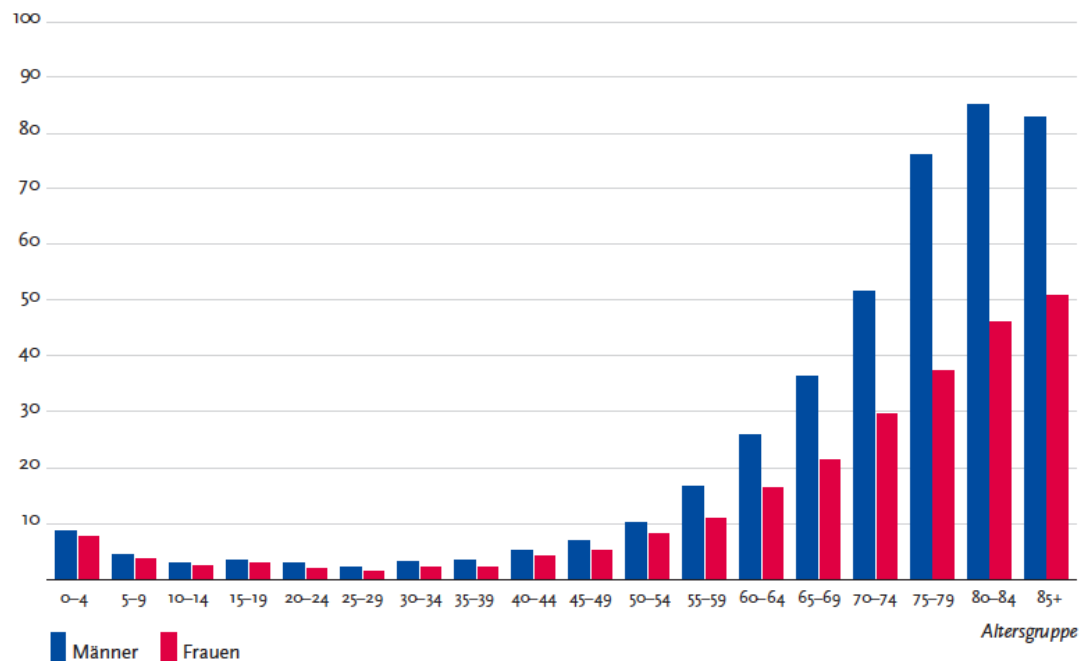
### 2.2.1 Definition, Inzidenz und Einteilung von Leukämien

Der Begriff „Leukämie“ bedeutet wörtlich aus dem griechischen übersetzt so viel wie „weißes Blut“, da sich nach Zentrifugation von Blut eines Leukämiepatienten eine verbreiterte Leukozytenmanschette auf der Erythrozytensäule bildet. Leukämien machen in Deutschland etwa 2,4 % aller Krebserkrankungen aus, somit sind sie, im Gegensatz zu den häufigsten malignen Erkrankungen, wie Colon-, Mamma-, Prostata- oder Lungenkarzinome, eine eher seltene Erkrankung. Die Inzidenz liegt hierzulande bei etwas mehr als 11.400 Neuerkrankungen pro Jahr (Bundes 2012). Die Inzidenz steigt mit dem Lebensalter, bei jedoch einer erhöhten Inzidenzrate im Kindesalter (Abb. 3.), wobei dies in erster Linie die Form der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) betrifft.

Eine Leukämie ist eine maligne Neoplasie hämatopoetischer Zellen, wobei sich ein transformierter Zellklon, eine sogenannte leukämische Stammzelle unkontrolliert in den blutbildenden Organen vermehrt. Zudem kommt es teilweise zu einer Ausschwemmung in das Blut, in manchen Fällen erfolgt auch eine Infiltration anderer Organe oder Organsysteme (McCulloch 1979; Fialkow et al. 1987). Die Expansion im hämatopoetischen System führt zu einer Verdrängung der physiologischen Hämatopoese, was letztlich zu einer Knochenmarksinsuffizienz führt. Die aus der Knochenmarksinsuffizienz resultierende Panzytopenie erklärt wiederum einen Großteil der klinischen Symptome. Zu diesen klinischen Symptomen gehören Müdigkeit, Schwäche, Atemnot, Schwindel, Herzrasen und Blässe infolge der Anämie. Aufgrund der Leukopenie kommt es zu einer vermehrten Infektneigung. Die Thrombopenie führt zu einer Blutungsneigung mit Zahnfleisch- und Nasenbluten sowie petechialen Einblutungen der Haut und der Schleimhäute. Neben diesen, aus der Panzytopenie zu erklärenden, Symptomen zeigen Leukämiepatienten auch häufig eine unspezifische Symptomatik mit vermehrtem Nachtschweiß, Fieber und Gewichtsverlust (sog. B-Symptomatik). Zudem kann es zu Lymphknotenschwellung, Hepato- und Splenomegalie, Gelenkbeschwerden, Ginigvahypertrophie und Fundusveränderungen kommen.

Leukämien können, je nach klinischem Verlauf, in akute und chronische Leukämien unterteilt werden. Außerdem erfolgt in der Regel eine Einteilung gemäß der Abstammung des entarteten Zellklons, entweder aus der myeloischen oder lymphatischen Zellreihe. Daraus ergibt sich die Einteilung und Nomenklatur der häufigsten Leukämieformen in chronische myeloische Leukämien (CML), akute myeloische Leukämien (AML), chronische

lymphatische Leukämien (CLL) und akute lymphatische Leukämien (ALL). Neben diesen Hauptformen gibt es noch myelodysplastische Syndrome sowie myeloproliferative Erkrankungen, wie die Polycythaemia vera, die Osteomyelofibrose, die essentielle Thrombozythämie und die chronische Erythroleukämie.



**Abb. 3 Altersspezifische Inzidenz Leukämien:** Neuerkrankungen pro 100.000 Personen in Altersgruppen; ICD-10 C91-C95, Deutschland 2009-2010 (Bundes 2012).

### 2.2.2 Akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie ist eine seltene maligne Erkrankung mit einer Inzidenz von etwa 4 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner. Sie ist die häufigste Leukämie im Erwachsenenalter, das mediane Alter der Patienten bei Diagnosestellung liegt bei 67 Jahren. Die Erkrankung zeichnet sich durch ein schnelles Voranschreiten aus, unbehandelt führt die AML in der Regel innerhalb weniger Monate zum Tod. Auch behandelt ist die Prognose insgesamt schlecht, die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei etwa 26 % (Burnett et al. 2012).

Da die AML eine sehr heterogene Krankheit darstellt, sind zahlreiche Versuche der Klassifizierung unternommen worden. Die bekannteste und bis heute anerkannte Einteilung nach morphologischen Gesichtspunkten ist die Klassifizierung der French-American-British-

Group (FAB) aus dem Jahre 1976, hierbei wurde die Erkrankung in 6 Untergruppen unterteilt (Bennett et al. 1976). Im Laufe der Jahre wurde die Klassifikation modifiziert, es erfolgt heute eine Untergliederung von akuten myeloischen Leukämien in die Subgruppen M0 bis M7 (Tab. 1).

FAB Subtyp	Name	Häufigkeit in Prozent
M0	Akute myeloische Leukämie mit minimaler Differenzierung	<5%
M1	Akute myeloische Leukämie ohne Ausreifung	15-20 %
M2	Akute myeloische Leukämie mit Ausreifung	25-30%
M3	Akute Promyelozyten-Leukämie (APL)	5-10%
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie	20-30%
M5a	Akute Monozyten-Leukämie ohne Ausreifung	5%
M5b	Akute Monozyten-Leukämie mit Ausreifung	5-10%
M6	Akute Erythroleukämie	5%
M7	Akute Megakaryoblasten-Leukämie	5%

**Tabelle 1 FAB-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämien** modifiziert nach (Bennett et al. 1976; Bennett et al. 1985)

Neben der FAB-Klassifikation ist die etwas komplexere Einteilung der WHO (Tab. 2) entscheidend für die klinische Einordnung und Behandlung, hierbei werden neben der Morphologie noch die zytogenetischen und molekulargenetischen Veränderungen der Leukämiezellen berücksichtigt (Vardiman et al. 2002; JW et al. 2009)

## WHO-Klassifikation der AML 2008

### **AML mit rekurrenten genetischen Veränderungen:**

AML mit t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1  
AML mit inv(16)(p13.1;q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11  
APL mit t(15;17)(q22;q12); PML-RARA  
AML mit t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL  
AML mit t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214  
AML mit inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1  
AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1  
AML mit NPM1-Mutation  
AML mit CEBPA-Mutation

### **AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen:**

definiert durch Zytogenetik  
definiert über MDS Vorphase  
definiert über Morphologie

### **Therapie-assoziierte myeloische Neoplasien**

#### **AML, nicht anderweitig klassifiziert:**

AML mit minimaler Differenzierung  
AML ohne Ausreifung  
AML mit Ausreifung  
Akute myelomonozytäre Leukämie  
Akute monozytäre Leukämie  
Akute Erythrozytenleukämie  
Akute Megakaryoblastenleukämie  
Akute Basophilenleukämie  
Akute Panmyelose mit Myelofibrose

**Tab. 2 WHO-Klassifikation der AML** modifiziert nach (JW et al. 2009; Vardiman et al. 2002)

### **2.2.3 Zytogenetische Veränderungen der AML**

Die zytogenetische Untersuchung der AML-Blasten gehört zur Standarduntersuchung eines jeden AML-Patienten (Döhner et al. 2010). Die maligne transformierten Zellen der AML weisen häufig chromosomale Veränderungen auf, einige hiervon sind rekurrente, also immer wieder auftretende, Veränderungen, die sich teilweise auch in der WHO-Klassifikation wiederfinden (Tab. 2). Es sind bislang mehr als 200 unterschiedliche rekurrente numerische chromosomale Aberrationen bekannt, hierzu gehören reziproke Translokationen, Inversionen,

Insertionen, Deletionen, unbalancierte Translokationen, die Bildung von Isochromosomen und isozentrischen Chromosomen sowie isolierte Trisomien und Monosomien. Etwa 55% der akuten myeloischen Leukämien des Erwachsenenalters und etwa 76 % der AML des Kindesalters weisen chromosomale Aberrationen auf (Mrózek et al. 2004). Tabelle x. gibt einen Überblick über die wichtigsten chromosomalen Veränderungen der AML im Erwachsenen- sowie im Kindesalter. Der Karyotyp der Leukämiezellen ist insgesamt der stärkste prognostische Faktor, sowohl für das Ansprechen auf eine Induktionstherapie als auch für das Überleben des Patienten (Döhner et al. 2010).

#### **2.2.4 Therapie der AML**

Die Grundlage für die Therapie einer akuten myeloischen Leukämie ist die exakte Risikostratifizierung. Hierzu benötigt man neben den Untersuchungsergebnissen der Morphologie, der Immunphänotypisierung, der Zytogenetik und der Molekulargenetik der Leukämiezellen noch AML-unabhängige Informationen wie Alter, Allgemeinzustand und Komorbiditäten des Patienten. Die Behandlung einer AML sollte im Idealfall in hämatologisch-onkologischen Zentren im Rahmen von Therapiestudien durchgeführt werden, die Therapie erfolgt dort anhand exakt definierter Studienprotokolle.

Unbehandelt ist die akute myeloische Leukämie eine hochgradig aggressive Erkrankung und führt bereits nach 6 Monaten bei etwa der Hälfte der Patienten und nach 12 Monaten bei allen Patienten zum Tode (Mackintosh & Investigations 1945). Es wurde gezeigt, dass insbesondere bei jüngeren Patienten bereits eine Verzögerung des Therapiebeginns um 5 Tage mit einer messbaren Verschlechterung der Prognose einhergeht (Sekeres et al. 2009). Somit ist eine möglichst schnelle Einleitung der Therapie unbedingt notwendig.

Im Rahmen verschiedener Studien erfolgt eine stetige Weiterentwicklung der exakten Therapieschemata. Im Allgemeinen setzt sich eine AML-Therapie immer aus einer Induktionstherapie, welche die Komplettremission als Ziel hat, und einer Postremissionstherapie, mit dem Ziel der Erhaltung der Komplettremission, zusammen. Ein Beispiel für eine Standard-Induktionstherapie beinhaltet die Kombination aus der dreitägigen Gabe eines Anthrazyklins/Anthracendions (z.B. Daunorubicin 60 mg/m<sup>2</sup>, Idarubicin 10-12 mg/m<sup>2</sup> oder Mitoxantron 10.-12mg/m<sup>2</sup>) und der siebentägigen Gabe von Cytarabin (100-

200mg/m<sup>2</sup> kontinuierlich). Ist mittels Induktionstherapie eine Komplettremission erreicht, muss eine Postremissionstherapie erfolgen, andernfalls droht ein schnelles Rezidiv der Erkrankung. Die Postremissionstherapie erfolgt häufig in Form einer sogenannten Konsolidationstherapie mittels einer intensiven Chemotherapie, z.B. mit hochdosiertem Cytarabin oder einer autologen oder allogenen Blutstammzelltransplantation. Als Alternative zur Konsolidationstherapie kann auch eine Erhaltungstherapie mit einer monatlichen Verabreichung myelosuppressiver Substanzen durchgeführt werden. Nach Abschluss der Therapie wird eine regelmäßige klinische und hämatologische Nachsorge angestrebt. Im Falle eines Rezidivs erfolgt eine Reinduktionstherapie, im Idealfall mit anschließender allogener Stammzelltransplantation (Büchner et al. 2010).

### **2.3 Wachstumsfaktorunabhängigkeit in hämatopoetischen Zelllinien**

Die Entdeckung Kolonie-stimulierender Faktoren (CSF) gelang bereits in den frühen 1960er Jahren. Die erste Isolierung und Aufreinigung Kolonie-stimulierender Faktoren erfolgte in Form des Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktors (M-CSF) und des Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktors (GM-CSF) gelang in den späten 1970er Jahren. In der Folgezeit konnten weitere CSF isoliert und charakterisiert werden. Zu Beginn der 1980er Jahre war die Gruppe der Kolonie-stimulierenden Faktoren mit der Entdeckung des Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (G-CSF) und einem Multi-Kolonie-stimulierenden Faktor (M-CSF, IL-3) komplett. Hinzu kam die Entdeckung weiterer Glykoproteine mit ähnlichen, das Wachstum und die Differenzierung von hämatopoetischen Zellen steuernden Eigenschaften, wie Interleukin 4 (IL-4) und Interleukin 6 (IL-6). Mit dem Voranschreiten molekularbiologischer Techniken gelang zwischen 1984 und 1987 die Herstellung größerer Mengen rekombinanter CSFs, was die weitere Verwendung und Erforschung, sowohl *in vivo* als auch *in vitro*, ermöglichte. Neben den zahlreichen klinischen Anwendungsmöglichkeiten, z.B. in der Behandlung von Leukopenien unterschiedlichster Ursachen, gelang mit dem Einsatz Kolonie-stimulierender Faktoren die klonale Kultivierung von Leukämiezellen aus Patienten mit myeloischen Leukämien (Hansson & Söderström 1993).

Das *in vitro* Wachstum aller Zellen einer CML sowie der meisten Zellen einer AML ist in der Regel abhängig von der Zugabe Kolonie-stimulierender-Faktoren, oder es wird eine Kultivierung der Zellen auf Stroma-Zellen des Knochenmarks benötigt (Metcalf 1988). Ohne



die externe Zugabe stimulierender Faktoren oder die Kultivierung der Zellen auf Stromazellen des Knochenmarks kommt es bei den meisten AML-Zellen zwar zu einem initialen Wachstum in Kultur, es folgt jedoch schnell ein Wachstumsstopp, und die Zellen gehen über den Weg der Apoptose zugrunde (Bendall et al. 1994). Von den AML-Zellen, welche sich ohne künstlichen CSF-Zusatz kultivieren lassen, zeigen einige hiervon eine autokrine Stimulation durch selbst produziertes GM-CSF (Young & Griffin 1986). Akute myeloische Leukämien, welche sich bereits primär ohne künstliche Stimulation in Zellkultur etablieren lassen, zeigen hierbei einen aggressiven klinischen Verlauf (Barjesteh Waalwijk et al. 2003). Außerdem konnte in einem Großteil der Fälle ein Verlust der Faktorabhängigkeit mit einem bösartigeren Phänotyp der Zellen in Verbindung gebracht werden (Schrader & Crapper 1983; Lang et al. 1985; Daley & Baltimore 1988; Stocking et al. 1988).

Die Möglichkeit des Wachstums einer Zelle, unabhängig von den sonst benötigten Umgebungsfaktoren, ist bereits früh als ein möglicher Schritt zur malignen Entartung diskutiert worden (Holley 1975). Das Phänomen des faktorunabhängigen Wachstums eines Klons, bei sonst wachstumsfaktorabhängigen Zelllinien, bietet eine exzellente Möglichkeit, den Schritt und die Mechanismen, die der Veränderung zu Grunde liegen, unter Laborbedingungen im direkten Vergleich zwischen ursprünglichen Zellen und unabhängig gewordenen Mutanten zu untersuchen. Die Wachstumsfaktorunabhängigkeit kann hierbei entweder spontan auftreten oder aber extern, z.B. durch retrovirale Mutagenese, induziert werden (Stocking et al. 1988; Stocking et al. 1993). Es wurde auch früh gezeigt, dass mindestens zwei Ereignisse auftreten müssen, um ein wachstumsfaktorunabhängiges Wachstum zu induzieren (Laker et al. 1987; Chang et al. 1989; Stocking et al. 1988). Zudem konnten verschiedene Mechanismen der Entstehung der Faktorunabhängigkeit aufgezeigt werden. Neben dem bereits beschriebenen Phänomen einer Produktion von Wachstumsfaktoren durch die faktorunabhängige Zelllinie mit anschließender autokriner Stimulation können auch eine Überexpression oder aktivierende Mutationen der Wachstumsfaktorrezeptoren ein faktorunabhängiges Wachstum auslösen (Hannemann et al. 1995; Steelman et al. 1996; McCormack & Gonda 1997; Prassolov et al. 2001).

## **2.4 3q21-Aberrationen**

Chromosomale Translokationen in neoplastischen Erkrankungen mit Involvierung der Bruchpunktregion 21 auf dem langen Arm des Chromosom 3 (3q21) sind kein seltenes

Phänomen. In der „*Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer*“ sind insgesamt 1.015 Fälle bösartiger Erkrankungen mit Assoziation zu diesem Bruchpunkt gelistet. Dabei handelt es sich um 735 Fälle mit einer balancierten und 280 Fälle mit einer unbalancierten chromosomalen Aberration. Bei den balancierten Aberrationen handelt es sich um Inversionen (n=434) und Translokationen (n=301). Bei den unbalancierten Veränderungen sind es Additionen (n=69), Deletionen (n=175) und unbalancierte Translokationen (n=36). Einen Großteil der Erkrankungen mit nachgewiesener 3q21-Translokation machen dabei die akuten myeloischen Leukämien sowie myeloproliferative Erkrankungen wie die chronische myeloische Leukämie, die essentielle Thrombozythämie oder die primäre Myelofibrose aus. Deutlich seltener konnten die Veränderungen der 3q21-Region bei nicht myeloischen Erkrankungen wie Lymphomen, Karzinomen und Sarkomen nachgewiesen werden. Die in der wachstumsfaktorunabhängigen Mutante der NOS1-Zelllinie nachgewiesene Translokation mit dem kurzen Arm von Chromosom 12 als Translokationspartner (t (3;12)(q21;p13)) wurde in insgesamt vier weiteren Fällen nachgewiesen. Hierbei handelt es sich um jeweils zwei Fälle einer akuten lymphoblastischen Leukämie bzw. eines lymphoblastischen Lymphoms sowie zwei Fälle einer refraktären Anämie (Mitelman et al. 2015).

Es wurden insgesamt einige Gene im Zusammenhang mit 3q21-Aberrationen diskutiert, viele hiervon befinden sich jedoch auf dem jeweiligen Gegenstück der jeweiligen Aberration, also auf einem anderen Chromosom. Diese Gene sind somit kein konstanter Faktor zur Klärung der Rolle der Aberrationen in der Leukämogenese. Zwei Gene, welche im Bereich des Bruchpunktes auf Chromosom 3 liegen und immer wieder im Zusammenhang mit 3q21 Veränderungen diskutiert wurden, sind GATA2 und RPN1.

GATA2 ist hierbei aufgrund der wichtigen Funktionen des GATA2-Gens in der Hämatopoese sowie einer nachgewiesenen Überexpressionen in Leukämien als mögliches 3q21 assoziiertes Onkogen diskutiert worden (Wieser et al. 2000). Zudem konnte eine Überexpression von GATA2 in zahlreichen Patienten mit 3q21-Aberrationen gezeigt werden, was die These, dass das Gen ein wichtiger Faktor im Rahmen von 3q21-Veränderungen sein könnte, untermauert (Wieser et al. 2000; Lahortiga et al. 2004).

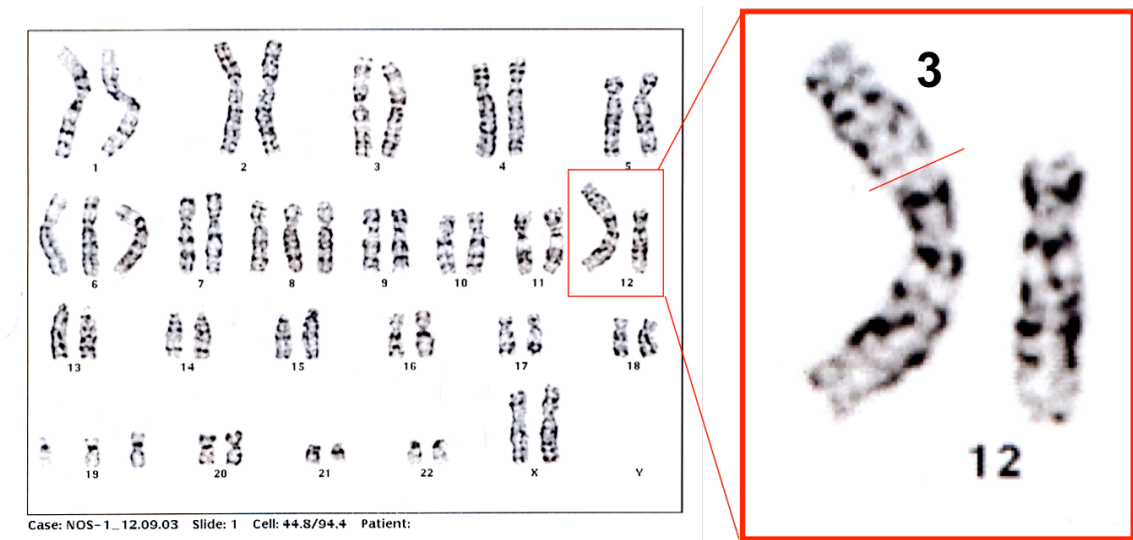
In der Literatur wird auch häufig das RPN1-Gen im Rahmen von 3q21-Translokationen diskutiert. In Folge einer reziproken Translokation, welche zum 3q21q26-Syndrom führt, kommt es entweder zu einer Fusion von RPN1 mit dem EVI1-Gen oder zu

einer Verlagerung von EVI1 in den Promotorbereich von RPN1. Beide Ereignisse führen letztlich zu einer EVI1-Aktivierung (Shearer et al. 2010; Lee et al. 2010; Martinelli et al. 2003). Des Weiteren ist ein Fall einer chronischen idiopathischen Myelofibrose bekannt, bei dem diskutiert wird, dass die t(3;9)(q21;p24) Translokation eine translokationsbedingte Verlagerung des Jak2-Gens in den Promotorbereich von RPN1 bewirkt (Mark et al. 2006).

## **2.5 Die NOS1 Zelllinien als Modellsystem einer 3q21-Aberration**

Die Zelllinie NOS1 wurde 1999 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jücker in Zusammenarbeit mit Prof. Walter Fiedler (Onkologisches Zentrum, II. Medizinische Klinik und Poliklinik, Onkologie/Hämatologie, UKE) etabliert. Die Zellen stammen aus dem peripheren Blut einer 74-jährigen Patientin mit einer akuten myelomonozytären Leukämie (FAB M4). Mittels Endpunktverdünnung wurden mehrere Klone etabliert, wobei der Klon NOS1-#4 für die weitere Kultivierung und Analyse verwendet wurde. Die chromosomalen Analysen wurden durch Prof. Kerstin Kutsche (Institut für Humangenetik am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf) durchgeführt und zeigten einen Karyotyp von 49 Chromosomen, XX, +6, +8, +19. Die Zelllinie NOS1 wächst in Zellkultur nur unter Zugabe des Wachstumsfaktors GM-CSF, der Entzug des Faktors führt zur Apoptose der Zellen.

In weiterführenden Experimenten konnte eine Mutante der Zelllinie etabliert werden, welche ohne die Zugabe von GM-CSF wächst. Dieser faktorunabhängige Klon wurde fortan NOS1-FI genannt. Eine Chromosomenanalyse durch Frau Prof. Kutsche zeigte für die faktorunabhängige Mutante den Karyotyp von 49, XX, +6, +8, +19, der (12) t (3;12) (q21;p13).



**Abb. 4 Karyotyp der Zelllinie NOS1-FI:** 49, XX, +6, +8, +19, der (12) t (3;12) (q21;p13). Ein Teil des langen Arms von Chromosom 3 (q21) wurde an den kurzen Arm von Chromosom 12 (p13) transloziert. Die Triploidie der Chromosomen 6, 8 und 19 bestand bereits bei der ursprünglich etablierten Zelllinie NOS1-#4. (Zur Verfügung gestellt von Prof. Kutsche, UKE, Hamburg)

Wie in Abbildung 4 zu sehen ist, weist die wachstumsfaktorunabhängige Zelllinie NOS1-FI gegenüber der parentalen, wachstumsfaktorabhängigen Zelllinie NOS1 eine zusätzliche 3q21-Translokation auf t (3;12) (q21;p13). Zusammengefasst liegt somit eine Paarung von 2 Zelllinien ein und derselben Leukämie vor, wobei eine Zelllinie eine, in diversen Leukämien vorhandene, mit einer schlechten Prognose einhergehende, chromosomale Aberration aufweist. Dies bietet die ideale Möglichkeit einer vergleichenden Analyse hinsichtlich der Auswirkung der Translokation auf die Regulation von Genen in der Umgebung des Bruchpunktes 3q21. Zudem können mögliche gefundene, regulierte Gene auf eine eventuell bestehende Rolle in der Entstehung der Wachstumsfaktorunabhängigkeit untersucht werden.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und Merck-Eurolab (Darmstadt) verwendet. Die Zusätze für die Bakterienmedien wie Bacto-Tryptone und Hefe-Extrakt stammten von der Firma Difco (Detroit, USA). Sämtliche Materialien für die Zellkultur, das Kulturmedium selbst, das fötale Kälberserum sowie verschiedene Medienzusätze, wurden von der Firma GibcoBRL (Eggenstein) gekauft.

#### 3.1.2 Puffer und Stammlösungen

LB-Medium: 1% Trypton  
(*Lysogeny broth*) 0,5% Hefeextrakt  
1% NaCl  
pH 7,0 mit 1 M NaOH eingestellt

1x PBS pH 7,4: 137 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O  
1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

10x TBS: 1,4 M NaCl  
0,1 M Tris-HCl pH 8,0

NP40-Lysepuffer: 50 mM Hepes pH 7,5  
4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure)

	150 mM NaCl
	1% NP40 Nonylphenylpolyethylenglykol (Nonidet P 40)
	2% Trasylol®
	2 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)
	50 mM NaF
	10 mM NaPyrophosphat
	10% Glycerin
	1 mM Natriumorthovanadat
	1 mM PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)
1x TAE:	40 mM Tris (2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol)
(Tris-Acid-EDTA)	13 mM Essigsäure
	1 mM EDTA pH 8,0 (Ethylendiamintetraessigsäure)
TE pH 7,5:	10 mM Tris-HCl pH 7,5
(Tris-EDTA)	1 mM EDTA pH 8,0 (Ethylendiamintetraessigsäure)
1x DNA-Ladepuffer	5% Glycerin
(für Gelelektrophorese)	166,7 $\mu$ M EDTA pH 8,0 (Ethylendiamintetraessigsäure)
	0,025% Bromphenolblau
	0,025% Xylencyanol

### 3.1.3 Enzyme und Reaktionskits

Die zur Restriktion von Plasmid- und genomischer DNA benutzten Enzyme wurden sowohl von Roche Diagnostics (Mannheim), als auch von MBI Fermentas (St.Leon-Rot) bezogen. Von MBI Fermentas stammte zudem die zur Dephosphorylierung von Vektorenden eingesetzte alkalische Phosphatase.

### 3.1.4 Bakterienstämme

Für die Transformation und die anschließende Amplifikation des gewünschten Plasmids wurden *E.coli* des Stammes XL1-Blue verwendet.

### 3.1.5 DNA-Oligonukleotide

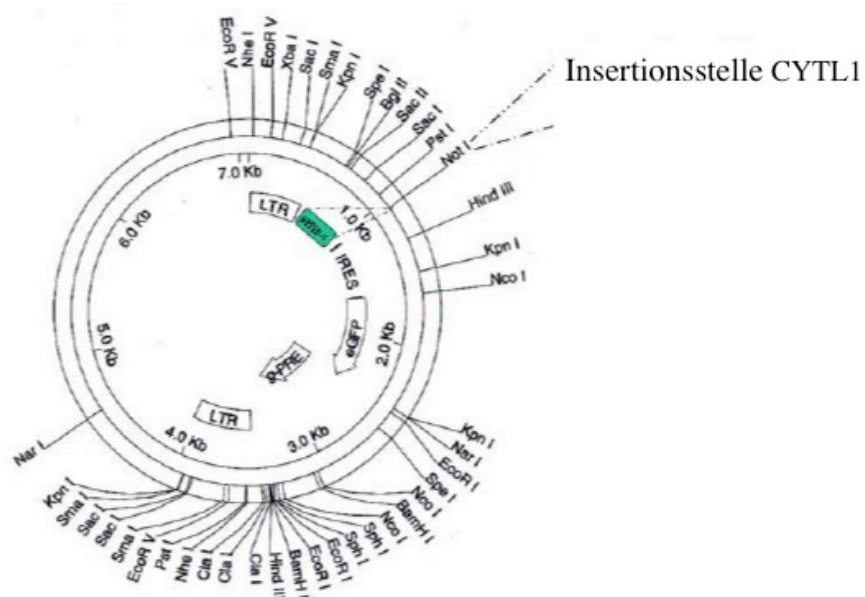
Gen-Symbol	Primer	Sequenz
NINJ2	forward	5'-CTG TGA AGT AGG GGC ACA AAG T- 3'
	reverse	5'-GCT GGA AAA CGT TGG AGA AG- 3'
WNK1	forward	5'-GTA ATG AGG ATG AGG GCT AGG A- 3'
	reverse	5'-CCC CAG TAC CCT GGT ATT TTT C- 3'
TMCC1	forward	5'-GGT CTT CTC TCT CCC CTG TTC T- 3'
	reverse	5'-CAG CTC CTC ATT GGA ACT CTC T- 3'
AFF3	forward	5'-AGT ATG AGT CAC TGC GTG TTC G- 3'
	reverse	5'-ACG CAG ATT ACT GGG TCT GAA G- 3'
CYTL1	forward	5'-ATA CCC AAT CCC AGT GAC TAC G- 3'
	reverse	5'-GGA GGT TCC TGG GTA GGA ATA C- 3'
FLT3	forward	5'-AGG ACT TCA TCC CTC CAC CT- 3'
	reverse	5'-TAT CAG CTC CTC CTG CCT TG- 3'
KIAA1257	forward	5'-AGG GAA GAA GGA AAA TCC AGA G- 3'
	reverse	5'-GTC ATT AGG AGC ATC CGC TTA T- 3'
GATA2	forward	5'-ATC CCA CAG CCC TAG TAT GAA AG- 3'
	reverse	5'-TAC AGA ATC TAA GCT CGG GAC AC- 3'
RPN I	forward	5'-AGC TGG TCA CCA AGA TCG AC- 3'
	reverse	5'-AGG ACA AAC GGC AAA CTC AC- 3'
GAPDH	forward	5` -GAT GAC ATC AAG AAG GTG GTG A- 3`
	reverse	5` -CTT ACT CCT TGG AGG CCA TGT- 3`

**Tabelle 3 DNA-Oligonucleotide:** Die sowohl für die Real-Time PCR, als auch für die konventionelle PCR verwendeten Primer

Die Oligonucleotide wurden mit Hilfe der Primer 3 Software (Version 0.2) des Whitehead Institute for Biomedical Research ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) entworfen und anschließend bei MWG Biotech (Ebersberg) bestellt.

### 3.1.6 Vektoren

Als Vektor für die Insertion potentieller Zielgene wurde der SF91 iGpre-Vektor benutzt. Bei diesem Vektor handelt es sich um einen retroviralen Vektor. Dieser Vektor besitzt eine IRES (*internal ribosome entry site*), EGFP und ein PRE (posttranskriptionelles regulatorisches Element). Dieses PRE erhöht den Transport der RNA aus dem Kern in das Zytoplasma. Dadurch kommt es zu einer verstärkten Translation und somit zu einer erhöhten Expression.



**Abb. 5: Retroviraler Vektor SF91iGpre**

Der retrovirale Vektor besitzt ein LTR: *long terminal repeat*, eGFP: *enhanced green fluorescence protein*; IRES: *Internal ribosomal entry site*



Über eine NotI-Restriktionsschnittstelle wurde das CYTL1-Gen in den Vektor eingebracht. Nach der IRES befinden sich das EGFP und dann das PRE. Die IRES hat die Funktion eine von der 5'-Cap-Struktur und dem Cap-Bindungskomplex unabhängige Translation der eukaryotischen mRNA zu ermöglichen.

### **3.1.7 Zelllinien**

#### **3.1.7.1 NOS1-#4 und NOS1-FI**

Die Zelllinie NOS1 wurde 1999 von Dr. Stefan Horn und Wiebke Wegner in der Arbeitsgruppe von Prof. Manfred Jücker in Zusammenarbeit mit Prof. Walter Fiedler (Onkologisches Zentrum, II. Medizinische Klinik und Poliklinik, Onkologie/Hämatologie, UKE) etabliert. Die Zellen stammen aus peripherem Blut einer 74-jährigen Patientin mit einer akuten myelomonozytären Leukämie (FAB M4). Die Authentizität der Zellen konnte zytogenetisch bestätigt werden. Die Zellen zeigen einen Karyotyp von 49 Chromosomen, XX, +6, +8, +19 (alle zytogenetischen Untersuchungen wurden von Frau Prof. Kerstin Kutsche, Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, durchgeführt).

Die faktorunabhängige Mutante NOS1-FI wurde 1999 ebenfalls von Dr. Stefan Horn und Wiebke Wegner in der Arbeitsgruppe von Prof. Jücker etabliert. Zytogenetische Untersuchungen zeigten einen Karyotyp von 49, XX, +6, +8, +19, der (12) t (3;12) (q21;p13).

#### **3.1.7.2 MV 4-11**

Die MV 4-11 ist eine akute myeloische Leukämiezelllinie, mit der Translokation t(4;11)(q21;q23). MV4-11 wächst auch in Abwesenheit von GM-CSF und wurde aus dem peripheren Blut eines, an einer B-Zell myeloischen Leukämie erkrankten Patienten etabliert. In dieser Zelllinie weist das „*fms-like tyrosine kinase*“ – Gen, kurz FLT3-Gen, eine interne Tandemduplikation (ITD) in Exon 14 auf, wobei 30 Basenpaare wiederholt werden, was zu einem Austausch der ersten Aminosäure Tyrosin zu Histidin, nicht aber zu einer Verschiebung des Leserasters führt. Die in MV4-11 Zellen gefundene interne Tandemduplikation führt zu einer Aktivierung der Tyrosinkinase-Aktivität des Rezeptors (Gary Gilliland & Griffin 2002). Die Zelllinie wurde freundlicherweise von PD Dr. Justus Duyster (3. Medizinische Klinik, TUM) zur Verfügung gestellt.

### 3.1.8 Geräte

Zellkultur-Brutschränke	Heraeus
Cell Counter System CASY1	Schärfe System GmbH
Elektrophorese-Kammern (horizontal)	MWG-Biotech
Elektrophorese-Kammern (vertikal) Protean®IIxiCell	BioRad
Luftgeltrockner	Bio Rad
Geldokumentationssystem CF8/1 FMC	Kappa Messtechnik
Flow Titertek® Multiskan Plus	ICN
Horizontalschüttler Rocky®	Fröbel Labortechnik
Lyophyllisator: SpeedVac Concentrator	Savant
pH-Meter CG 820	Schott-Geräte GmbH
Power Supply EPS200	Amersham Pharmacia Biotech
PCR-Gerät	Eppendorf
Rührplatte	Heidolph
Schutron Schnipptherm	MS-Laborgeräte
Schüttelinkubator (Bakterien)	HAT Infors AG
Sonifiziergerät B-12	Branson Sonic Power Company
Thermomixer 5436	Eppendorf
Wasserbad 1086	GFL
Multi-Imager Fluor-Smax	Fuji
LightCycler™	Roche
Zentrifugen:	
• Ultrazentrifuge L-60	Optima-L Beckman
• Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf
• Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus
• Zentrifuge 540	Eppendorf
• Zentrifuge Varifuge K	Heraeus
• Zentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus
• Sorvall-Zentrifuge RC-5B	DuPont Instruments
Mikroskope Axiovert 200	Zeiss

### 3.1.9 Verbrauchsmaterialien

0,2 ml-Reaktionsgefäße	Biolabs
0,5 ml-Reaktionsgefäße	Biolabs
1,5 ml-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Sarstedt
2,0 ml-Reaktionsgefäße	Eppendorf
5 ml Polystyren Röhren	Becton & Dickinson
15 ml-Röhren	Falcon
25 ml-Weißkappenröhren	Sarstedt
50 ml-Röhren	Falcon
Bakterien-Petrischalen	Greiner, Sarstedt
96-Loch-Platten	Greiner
24-Loch-Platten	Greiner
6-Loch-Platten	Greiner
Gewebekulturflaschen T25	Greiner
Gewebekulturflaschen T175	Greiner
Nunc™ Gewebekulturflaschen T250	Nalgene
Nunc™ Plastikampullen	Nalgene
Pipettenspitzen	Sarstedt & Biozyme
SW-40-Polyallomer-Röhren	Beckman
LightCycler™ -Kapillargefäße	Roche

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultur

#### 3.2.1.1 Stammhaltung und Vermehrung

Die Zellen der NOS1-#4 wurden in RPMI 1640, Medium (GlutaMAX™ I, 25 mM HEPES) (Invitrogen) unter 5% CO<sub>2</sub> und wassergesättigter Atmosphäre bei 37° C kultiviert. Dem Medium wurden außerdem 10% fötales Kälberserum (FCS), Penicillin/Streptomycin (50 µg/ml Streptomycin; 50 Einheiten/ml Penicillin) sowie humaner Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor (GM-CSF, 44 Einheiten/ml) zugesetzt. GM-CSF Entzug führt zur Apoptose. Eingefroren wurden die Zellen in 89% FCS + 10% DMSO + 1% Glucose.

NOS1-FI wurde in gleicher Weise wie NOS1, jedoch ohne den Zusatz von GM-CSF, kultiviert. In dieser Weise wurden auch die Zellen der Linie MV 4-11 kultiviert.

Beide Zelllinien wurden alle zwei bis drei Tage in frisches Medium aufgenommen. Hierbei war zu beachten, dass die Zelllinien nicht zu stark verdünnt wurden. Insbesondere die faktorunabhängige Mutante benötigt eine hohe Zelldichte zur Proliferation von etwa  $2 \times 10^6$  bis  $8 \times 10^6 \frac{\text{Zellen}}{\text{mL}}$ .

### **3.2.1.2 Einfrieren von Zellen**

Je einzufrierendem Röhrchen wurden ca.  $1 \times 10^6$  Zellen verwendet. Die Zellsuspension mit der entsprechenden Anzahl an Zellen wurde in ein Falcon-Röhrchen überführt und bei 1.200 rpm und 20°C für zehn Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in einem entsprechenden Volumen von FCS aufgenommen, 900  $\mu\text{L}$  je  $1 \times 10^6$  Zellen. In jedes Kryo-Röhrchen wurden 900  $\mu\text{L}$  der Zellsuspension gegeben. Nachdem jeweils 100  $\mu\text{L}$  DMSO hinzu pipettiert wurden, wurde das Röhrchen sofort auf Eis gestellt.

Das Röhrchen wurde über Nacht in die Einfrierhilfe bei -80°C gestellt. Anschließend wurde dieses im Stickstofftank eingefroren.

### **3.2.1.3 Auftauen von Zellen**

In einem Falcon-Röhrchen wurden 10 mL des Kulturmediums für die aufzutauenden Zellen vorgelegt. Die eingefrorenen Zellen im Kryo-Röhrchen wurden per Handwärme angetaut und anschließend in das vorgelegte Medium im Falcon-Röhrchen pipettiert.

Diese Zellsuspension wurde bei 1.200 rpm und 20°C zehn Minuten zentrifugiert, der Überstand, welcher noch Reste von DMSO enthielt, wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in frischem Medium aufgenommen und in eine Kulturflasche überführt.

### 3.2.1.4 Zellzahlbestimmung mittels Trypanblaufärbung

Um die Menge der Zellen zu bestimmen, wurden 20  $\mu\text{L}$  der homogenen Zellsuspension entnommen. Dieser wurden 20  $\mu\text{L}$  Trypanblau zugesetzt. Durch dieses Reagenz wurde zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden, da die toten Zellen wegen der Zellwandschädigung den Farbstoff komplett aufnehmen, während lebendige Zellen lediglich von außenseitig gefärbt werden. Mittels einer Neubauerzählkammer wurde die Zellzahl bestimmt.

### 3.2.2 Isolation von Gesamt-RNA aus Gewebekulturzellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus den kultivierten Zellen wurde nach der Methode von Chirgwin *et al.* 1979 mittels Cäsiumchlorid-Dichtegradienten durchgeführt. Das Protokoll wurde modifiziert von Garcia-Palma (2006). Zunächst wurden  $1 \times 10^8$  Zellen für 5 Minuten bei 1.200 rpm (Heraeus-Zentrifuge) in einem 50ml Falcon-Röhrchen zentrifugiert, der Überstand wurde abgegossen, und das Röhrchen für eine Minute überkopf auf ein Papiertuch gestellt. Anschließend wurde das Pellet unter Vortexen in 7 ml eiskalter GCN-Lösung (4 M Guanidiniumthiocyanat; 25 mM Natriumacetat pH 7,0; 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol; 0,5% N-Lauroylsarcosin) aufgelöst. Diese Lösung wurde bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert, bis genügend Proben für die Ultrazentrifugation zur Verfügung standen. Um die DNA zu scheren, wurden die Proben nach dem Auftauen für 3 Minuten gevortext. Die für die Ultrazentrifugation verwendeten SW-40-Polyallomer-Röhrchen wurden zunächst mit kalter GCN-Lösung gespült und anschließend mit je 3,5 ml 5,7 M CsCl-Lösung befüllt. Die CsCl-Lösung wurde nun mit 7ml Lysat überschichtet und anschließend für 21 Stunden mit 32.000 rpm bei  $20^\circ\text{C}$  im SW41Ti-Rotor ultrazentrifugiert (Beckmann Ultrazentrifuge). Die GCN-Lösung wurde bis auf 1ml über dem RNA-Pellet abgenommen, der restliche Milliliter dekantiert und das Röhrchen für einige Minuten überkopf auf ein Papiertuch gestellt, so dass die restliche GCN-Lösung abtropfen konnte. Um ein Resuspendieren von RNasen aus der oberen Phase zu vermeiden, wurde das SW-40-Röhrchen mit einem heißen Skalpell innerhalb des CsCl-Bereichs abgeschnitten. Anschließend wurde die RNA in 500  $\mu\text{l}$   $65^\circ\text{C}$  warmem DEPC-behandeltem  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und das Röhrchen mit demselben Volumen gespült. Die nun in 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gelöste RNA wurde mit 1 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, Phenol mit 0,1 M Citratpuffer gesättigt; pH 4,3 für ein Verbleiben von nur RNA und nicht DNA in der wässrigen Phase) versetzt, kurz gevortext und bei Raumtemperatur 5 Minuten bei

maximaler Geschwindigkeit in der Eppendorf Zentrifuge 5415C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein 15ml-Röhrchen überführt und zur Fällung der RNA über Nacht mit dem 2,5fachen Volumen Ethanol abs. sowie 1/10 Volumen 2 M Natriumacetat (pH 5,5) versetzt (Fällung für 30 Minuten bei  $-80^{\circ}\text{C}$ , anschließend über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$ ). Am nächsten Tag wurden die Proben auf 2 ml Reaktionsgefäße verteilt, 30 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit und  $4^{\circ}\text{C}$  in der Eppendorf Zentrifuge 5415C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in der Lyophylle getrocknet. Die Aliquots wurden anschließend wieder vereinigt und erneut mit Ethanol und Natriumacetat gefällt (siehe oben) und in diesem Zustand bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Konzentrationsbestimmung wurden  $10\ \mu\text{l}$  abgenommen, 30 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit in der Eppendorf Zentrifuge 5415C zentrifugiert, das Pellet in der Lyophylle getrocknet und in  $100\ \mu\text{l}$  DEPC behandeltem  $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert.

### **3.2.3 cDNA Synthese**

Das Erstellen der cDNA aus der gewonnenen RNA erfolgte mittels der Reversen Transcriptase SuperScript II (Invitrogen) und Oligo-(dT)<sub>12-18</sub> Primern (Invitrogen). Es wurden pro Ansatz  $5\ \mu\text{g}$  RNA eingesetzt. Die in Ethanol bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagerte RNA wurde zunächst bei  $14.000\ \text{g}$  und  $4^{\circ}\text{C}$  für 30 Minuten zentrifugiert, das Pellet in der Lyophylle getrocknet. Die RNA wurde in  $11\ \mu\text{l}$   $65^{\circ}\text{C}$  warmem DEPC behandeltem  $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert und mit  $1\ \mu\text{l}$  Oligo-d(T)<sub>12-18</sub> ( $0,5\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) bei  $70^{\circ}\text{C}$  für 10 Minuten inkubiert. Nach Kühlung auf Eis und kurzer Zentrifugation wurden  $4\ \mu\text{l}$  5x First Strand Buffer ( $15\ \text{mM MgCl}_2$ )  $2\ \mu\text{l}$   $0,1\ \text{M DTT}$ ,  $1\ \mu\text{l}$   $10\ \text{mM dNTP Mix}$  (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, jeweils  $10\ \text{mM}$ , neutraler pH) zugegeben und 5 Minuten bei  $42^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach Zugabe von  $1\ \mu\text{l}$  ReverserTranscriptase SuperScript II (Invitrogen) ( $200\ \text{U}/\mu\text{l}$ ) folgte die Synthese bei  $42^{\circ}\text{C}$  für 50 Minuten. Gestoppt wurde die Reaktion durch 15 Minuten Erwärmen auf  $70^{\circ}\text{C}$ . Durch Zugabe von  $2\ \text{U E. Coli RNase H}$  (Invitrogen) wurde die verbleibende RNA degradiert.

### **3.2.4 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der Nucleinsäuren**

Die Konzentration der gewonnenen Nucleinsäuren wurde photometrisch mittels Biophotometer von Eppendorf ermittelt. Hierzu wurden die zu untersuchenden Lösungen in einer 1:10 Verdünnung bei einer Absorption von  $260\ \text{nm}$  gemessen. Zusätzlich wurde über das Verhältnis der Absorption von  $260\ \text{nm}$  zu  $280\ \text{nm}$  die Reinheit der Nucleinsäuren

bestimmt. Reine DNA-Lösungen zeigen hierbei einen  $\frac{OD_{260}}{OD_{280}}$ -Wert von 1,8, während reine RNA-Lösungen einen Wert von 2,0 zeigt.

### 3.2.5 Polymerasekettenreaktion

#### 3.2.5.1 Konventionelle PCR

Zur Überprüfung der cDNA Synthese sowie zur Überprüfung der Spezifität der entworfenen Primer für die quantitative Real-Time RT-PCR wurde die konventionelle PCR benutzt. Jeder 20  $\mu$ l Ansatz enthielt 1xPCR-Puffer (Qiagen), 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP-Mix (Invitrogen), 1 Unit *Taq* Polymerase (Qiagen) sowie eine Konzentration von 0,5  $\mu$ M pro Primer. Pro 20  $\mu$ l Ansatz wurden 2  $\mu$ l 1:5 verdünnte cDNA eingesetzt. Die Reaktionen wurden in 0,5 ml Reaktionsgefäßen im MasterCycler gradient, Modell 5331 (Eppendorf), durchgeführt. Zur Überprüfung der Effektivität der cDNA Synthese wurden Primer für das als *Housekeeping Gen* gewählte *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH)-Gen benutzt. Um eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen, wurden Primer für die PI3-Kinase benutzt, welche ein Intron umspannen, so dass bei einer Kontamination mit genomischer DNA neben dem 250 bp großen Fragment ein 1,4 Kb Fragment entstehen würde. Das Programm bestand aus 5 Minuten initialer Denaturierung bei 95°C mit anschließend 30 Zyklen jeweils eine Minute Denaturierung bei 95°C, 30 Sekunden Primer-Annealing bei 55°C, 90 Sekunden Elongation bei 72°C. Nach einer Minute finaler Elongation bei 72°C wurden die Proben bis zur Entnahme auf 4°C gekühlt. Die Überprüfung der Spezifität der Primer für die quantitative Real-Time RT-PCR erfolgte mit einem der Real-Time RT-PCR angenäherten PCR-Programm. Das Programm bestand aus 10 Minuten initialer Denaturierung und 55 Zyklen von je 15 Sekunden Denaturierung, 5 oder 10 Sekunden Primer-Annealing bei verschiedenen Temperaturen sowie 20 Sekunden Amplifikation bei 72°C. Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese in 2% Agarose aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid unter einer UV-Lampe sichtbar gemacht und fotografiert. Die Primer wurden zunächst bei 57°C Annealing-Temperatur getestet, und diese Temperatur wurde solange erhöht, bis spezifische Produkte erreicht wurden. Erst dann wurden die Primer für die Real-Time RT-PCR verwendet.

### 3.2.5.2 Quantitative Real-Time RT-PCR

Verglichen wurde die Expressionsmenge ausgewählter Gene der wachstumsfaktorunabhängigen Zelllinie NOS1-FI in Relation zur faktorabhängigen Zelllinie NOS1 Zellklon #4 (NOS1-#4). Die Primer wurden mit Hilfe der Primer 3 Software (Version 0.2) des Whitehead Institute for Biomedical Research ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) entworfen und anschließend mit einem Nucleotide-nucleotide Blast der Datenbank des National Institute for Biotechnology Information (NCBI) auf Spezifität überprüft. Alle Analysen wurden mit Duplikaten in mindestens zwei Messungen am LightCycler System Version 3.5 (Roche) durchgeführt. Der Reaktionsansatz bestand aus jeweils 2  $\mu$ l LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I, 4 mM MgCl<sub>2</sub> sowie einer Primerkonzentration von jeweils 0,5  $\mu$ M. Das gewählte Programm bestand aus 10 Minuten initialer Denaturierung mit anschließend 45 Zyklen von kurzem Aufheizen auf 95°C, 5 Sekunden bzw. 10 Sekunden Annealing und 20 Sekunden Amplifikation. Die Schmelzkurve zur Überprüfung der Spezifität wurde durch kontinuierliches Aufheizen von 65°C auf 95°C erstellt. Anschließend wurden die Proben für 30 Sekunden auf 40°C runtergekühlt. Die Messungen wurden zunächst mit der LightCycler Software Version 3.5 analysiert. Diese Software errechnet mit der „Second derivative Maximum“-Methode die für die weiteren Auswertungen benutzten Crossing Points. Die PCR-Effizienz wurde mittels linearer Regression durch das LinRegPCR-Programm (Ramakers *et al.*, 2003) berechnet. Die Daten wurden nur für die weitere Auswertung herangezogen, wenn die Effizienzen für das jeweilige Gen größer als 1,5 waren und eine Standardabweichung von 0,05 nicht überschritten wurde. Ebenfalls mussten diese Bedingungen im Vergleich mit dem Housekeeping-Gen GAPDH erfüllt sein. Die eigentliche Auswertung der relativen Genexpression erfolgte mittels der Delta-Delta-Ct-Methode (Livak und Schmittgen, 2001). Bei dieser Methode wurde zunächst die Expressionsmenge des untersuchten Gens in Relation zum *Housekeeping*-Gen GAPDH normalisiert. Anschließend wurde die Expression des untersuchten Gens in NOS1-FI und NOS1-#4 in Relation gesetzt und das Ergebnis als *Fold Change* ausgedrückt. Die Ergebnisse wurden mittels vereinfachtem Student's T-Test auf ihre Signifikanz überprüft, wobei ein Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  festgelegt wurde.



### 3.2.5.3 Agarosegel

Das Agarosegel, versetzt mit Ethidiumbromid, wurde verwendet PCR-Produkte und Plasmide auf ihr Reinheit und Größe zu überprüfen. Für die Plasmide wurden 0,8%ige Agarosegele, für die PCR-Produkte 1,6%ige verwendet. Die Agarose wurde in 1xTAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und 0,7  $\mu$ L Ethidiumbromid bei ca. 60°C zugesetzt. Das noch flüssige Gel wurde auf den Gelträger gegossen, wo es nach ca. 30 Minuten erstarrte. Als Laufpuffer wurde ebenfalls 1xTAE-Puffer verwendet. Zur Kontrolle der Bandengröße wurde als Marker der Hyper Lader I verwendet sowie zu Überprüfung der Konzentration der Plasmide der Lamda Hind III. Je nach Größe der Produkte wurde das Gel zwischen 40 und 60 Minuten bei einer Stromstärke von 100 mA laufen gelassen.

### 3.2.5.4 Annealingzeit und Annealingtemperatur der Oligonucleotide

Gen-Symbol	Annealingzeit in Sekunden	Annealingtemperatur in °C
NINJ2	10	62
WNK1	10	62
TMCC1	10	62
AFF3	5	65
CYTL1	10	62
FLT3	10	60
KIAA1257	10	62
GATA2	10	62
RPN I	10	65
GAPDH	10	62

**Tabelle 4:** Annealingzeit und Annealingtemperatur der verwendeten Oligonukleotide

### **3.2.6 Proliferationsversuche**

#### **3.2.6.1 Proliferationsversuch mit Überstand der NOS1-FI**

Die Zellen wurden in einer rechnerischen Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen pro ml ausgebracht und unter üblichen Bedingungen kultiviert. Das Experiment wurde jeweils in Triplikaten durchgeführt. Die NOS1-#4 Zellen wurden mit Überstand aus der NOS-FI Reihe einmal unverdünnt und dann in verschiedenen Ansätzen jeweils in 10facher Verdünnung bis zu einer Konzentration von 1:10.000 versetzt. Als Positivkontrolle wurden die NOS1-#4 Zellen mit GM-CSF in einer 1:800 Verdünnung kultiviert. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne GM-CSF Zusatz genutzt. Die Zellen wurden eine Stunde nach Aussaat und danach für vier Tage alle 24 Stunden gezählt. Hierzu wurden 20  $\mu$ L einer homogenen Zellsuspension entnommen und mit der gleichen Menge Trypanblau versetzt. Die Zählung wurde dann mittels zuvor auf die Zelllinien geeichtem Cellcounter durchgeführt.

#### **3.2.6.2 Proliferationsversuch mit einem Flt3-Tyrosinkinaseinhibitor**

Für diesen Versuch wurden Zellen der Linien NOS1-FI, NOS1-#4 sowie Zellen der Linie MV4-11 jeweils in einer Dichte von  $5 \times 10^5$  Zellen pro ml in Kulturflaschen ausgebracht. Die Zelllinie MV4-11 diente hierbei als Positivkontrolle, da ihr Wachstum unter anderem auf einer Flt3-Kinasemutation beruht und mittels Inhibitor gestoppt werden kann. Es wurden Ansätze von jeder Zelllinie ohne Inhibitor, mit einer Inhibitorkonzentration von 50 nM und mit einer Konzentration von 500 nM angesetzt. Das Experiment wurde jeweils in Triplikaten durchgeführt. Die Zellen wurden bei üblichen Bedingungen für 6 Tage kultiviert, wobei die beiden Nos-Zelllinien in Kulturflaschen die MV4-11 in 6-Well-Platten ausgebracht wurden. Von Tag 0 beginnend wurde alle zwei Tage, mittels auf die jeweiligen Zellen geeichtem Cellcounter, die Zelldichte gezählt. Am dritten Tag wurden dem Ansatz der Zellen der Nos-Linien jeweils 2,5 ml frisches Medium mit der dazugehörigen Hemmstoffkonzentration zugefügt, für die Ansätze der MV4-11 waren es 1,5 ml.

### **3.2.7 Klonierung des CYTL1-Gens in einen retroviralen Vektor**

#### **3.2.7.1 Bakterienkulturen**

Die verwendeten Bakterien wurden in LB-Medium kultiviert. Da die verwendeten Plasmide jeweils ein Ampicillinresistenzgen enthalten, wurde zwecks positiver Selektion das Medium mit Ampicillin in einer Endkonzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  versetzt. Die Kultur wurde bei 37 °C und 200 rpm gehalten.

Als Vorkultur wurden Volumina von je drei ml angesetzt, die für 7 Stunden bei 37°C und 200 rpm inkubiert wurden. Für die Übernacht-Kultur wurden 200 – 300 ml LB-Medium mit Ampicillin vorbereitet, in die 200 bis 300  $\mu\text{l}$  (1:1000 Verdünnung) der Vorkultur gegeben wurden.

Um Bakterienkolonien auf festem Boden anzuzüchten, wurde dem Medium mit Ampicillin-Zusatz 1,5% Agar zugefügt und Petrischalen als Agarplatte gegossen. Die Bakterien wurden auf die Agarplatten angeimpft und über Nacht für 12-16 Stunden bei 37°C inkubiert.

#### **3.2.7.2 Anlegen von Glycerolstocks**

Die Bakterien wurden in Glycerolstocks gelagert. Dafür wurden einzelne Bakterienklone gepickt und über Nacht in 4 ml Medium unter den oben beschriebenen Bedingungen herangezogen. Nach 12 bis 16 Stunden wurde 1 ml Bakterienkultur in Nunc™ - Plastikampullen mit Glycerin (Endkonzentration 15%) versetzt und bei -80°C tiefgefroren.

#### **3.2.7.3 Transformation von Bakterien**

Hierzu wurden 100  $\mu\text{l}$  kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut, 100 ng Plasmid-DNA wurde hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Nach 30 min Inkubation auf Eis, erfolgte für eine Minute ein Hitzeschock bei 42°C. Danach wurden die Bakterien in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 100  $\mu\text{l}$  und 900  $\mu\text{l}$  der Bakteriensuspension auf Agarplatten gegeben und über Nacht für 14 Stunden

bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden verschiedene Klone mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in flüssiges Kulturmedium überführt.

### 3.2.7.4 Restriktionsverdau

Für die Klonierung in den SF91-Vektor wurde als Lokation für die Insertion die Schnittstelle der Restriktionsendonuklease Not1 gewählt.



**Abb. 6** Schnittstelle der Restriktionsendonuklease Not1

Das CYTL1 Gen wurde aus DNA der NOS1-FI Zelllinie amplifiziert, hierzu wurde folgendes Primerpaar mit einer integrierten Schnittstelle für die Restriktionendonuklease Not1 verwendet:

**Forward Primer :**

**5' - atat gcgccgc acc atg agg acg cct ggg cct ctg - 3'**

**Reverse Primer:**

**5' - gcat gcgccgc\_tta gcg ctg acg atc tgg cag gac - 3'**

Die Amplifikation wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Das Amplifikat wurde anschließend mit dem DNA-Purifikation Kit der Firma Quiagen aufgereinigt. Das gereinigte Fragment wurde zunächst mittels TOPO-TA Cloning Kit der Firma Invitrogen nach beiliegender Anleitung in den mitgelieferten Vektor eingefügt und in den XL1-Blue Stamm transformiert. Anschließend wurden die transformierten Bakterien auf Agarplatten ausgebracht, nach Übernachtinkubation wurden am nächsten Morgen mehrere Klone gepickt. Anschließend erfolgte eine Extraktion des Plasmids mittels Mini-Präparation.

### **3.2.7.5 Dephosphorylierung von DNA**

Die Vektor-DNA wurde mit alkalischer Phosphatase (*calf intestine alkaline phosphatase* von MBI Fermentas, St. Leon-Rot) an dem 5'-Ende dephosphoryliert. Hierfür wurde die Vektor-DNA in einer Konzentration von 20 pmol mit 1 U Enzym in 1x Dephosphorylierungspuffer für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden weitere 1 U Enzym hinzugefügt und 45 Minuten bei 55°C inkubiert.

### **3.2.7.6 Ligation von DNA**

Die Ligation der DNA erfolgte mit dem Enzym T4-DNA-Ligase (von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Hierzu wurden 50 ng des dephosphorierten Vektors mit einem dreifachen molaren Überschuss an Insert-DNA in ein Volumen von 20 µl mit den Pufferreagenzien nach Angaben des Herstellers gebracht. Der Ansatz wurde mit 2 U Ligaseenzym bei 4°C für 3 Tage inkubiert.

### **3.2.7.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarosegelen wurde der "QIAquick™ Gel Extraction Kit" (von Qiagen) verwendet. Das zu reinigende DNA-Fragment bzw. dPlasmid-DNA wurde jeweils doppelt auf präparative Agarosegel aufgetragen, wobei 90% der DNA in die eine und 10% in die andere Tasche aufgetragen wurden. Nach der Elektrophorese wurde der Teil des Gels, in welchem die 10% der DNA aufgetragen wurden auf den Transilluminator gebracht und unter UV-Licht wurde die Laufhöhe der gesuchten Bande markiert. Auf der gleichen Höhe wurde dann das zu reinigende DNA-Fragment aus der Gelspur herausgeschnitten, wo die restlichen 90% der DNA aufgetragen wurden. Dies geschah zum Schutz der zu reinigenden DNA vor eventuellen Schäden durch das UV-Licht. Das ausgeschnittene Gelsegment wurde dann mit dem dreifachen Volumen QG-Puffer versetzt und zur Auflösung der Agarose für 10 Minuten bei 50°C inkubiert. Die Lösung wurde anschließend auf eine „QIAquick“-Säule geladen. Durch 1 min Zentrifugation bei 5000 g in einer Eppendorf-Zentrifuge wurde die DNA an die Silicagel-Matrix der Säule gebunden. Das Eluat wurde verworfen. Anschließend wurde die an die Säule gebundene DNA mit 500 µl QG-Puffer gewaschen. Es folgte eine erneute Zentrifugation für eine Minute bei 5.000 g.

Das Eluat wurde erneut verworfen, und 750  $\mu$ l PE-Puffer wurden auf die Säule gegeben. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Säule wiederum für eine Minute bei 5000 g zentrifugiert, das Eluat wurde verworfen. Letztlich wurde die DNA in 50  $\mu$ l TE-Puffer bei erneuter Zentrifugation (eine Minute bei 5000 g) eluiert.

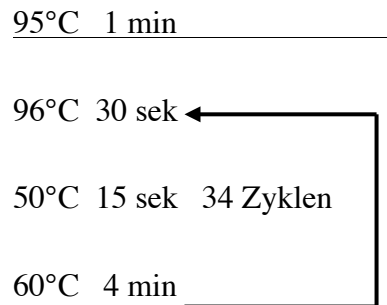
### **3.2.7.8 Mini-Präparation**

Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des Qiagen-Plasmid Maxi Kits (Qiagen, Hilden). Aus den Agarplatten wurden einzelne gewünschte Klone gepickt und in einer 4 ml Kultur für 4 bis 8 Stunden bei 37°C unter Schütteln (300 UpM) angezüchtet. Danach wurden 5  $\mu$ l dieser Kultur in 5 ml LB-Medium (Verdünnung 1:1.000) mit Ampicillinzusatz zugegeben und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (300 UpM) für 12 bis 16 Stunden inkubiert. Am nächsten Tag wurden aus dieser Kultur 4 ml abgenommen und für 20 Sekunden bei 5.000 g bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100  $\mu$ l 4°C kalten Puffer P1 (10 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mg/ml RNase A) resuspendiert. Es wurden 200  $\mu$ l Puffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) dazugegeben, der Ansatz wurde durch 5 bis 10 maliges Invertieren gemischt und für 5 Minuten bei 4°C inkubiert. In dieser Zeit fand die Lyse der Bakterien statt. Anschließend wurden 150  $\mu$ l 4°C kalter Puffer P3 (3 M KAc pH 4,8) dazugegeben, der Ansatz wurde durch 5 bis 10 maliges Invertieren gemischt und für 5 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Suspension bei 5.000 g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand mit der Plasmid-DNA abgenommen. Dadurch wurden Membrantrümmer, Proteine und genomische DNA aus den Proben entfernt. Die Plasmid-DNA aus dem Überstand wurde dann mit 900  $\mu$ l Ethanol absolut durch Inkubation für 30 Minuten bei -20°C gefällt und anschließend bei 5.000 g für 30 Minuten bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde mit 500  $\mu$ l 70%-igem Ethanol 4°C gewaschen und erneut bei 5.000 g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet im Lyophilisator getrocknet. Das trockene DNA-Pellet wurde in 50  $\mu$ l TE-Puffer aufgenommen.

### **3.2.7.9 Sequenzierung**

Zur Sequenzierung wurde das "ABY PRISM™ Big Dye Ready Reaction Terminator Cycle Sequencing"-Kit der Firma Perkin Elmer Applied Biosystems verwendet.

Es wurden 300 ng Plasmid-DNA zusammen mit 15 pmol Primer 6  $\mu$ l HT-Puffer (Endkonzentration 3x, PE Biosystems) und 4  $\mu$ l "Big Dye Terminator Ready Mix", eine Lösung, welche alle für die Synthese und Markierung der DNA benötigten Substanzen enthielt, in ein Volumen von 20  $\mu$ l aufgenommen und die Reaktion im folgenden Temperaturprofil durchgeführt:



Nach der Reaktion wurden die Proben mit 80  $\mu$ l 0,3 M Na-Ac und 250  $\mu$ l reinem, 4°C kaltem Ethanol versetzt, in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt und 30 Minuten bei 5.000 g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 1 ml 70%-igem Ethanol bei 4°C gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 15 Minuten bei 13.000 g und 4°C wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet an der Luft getrocknet. Die weitere Analyse erfolgte mittels Sequenziergerät (Applied Biosystems 373A) im Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg.

## 4. Ergebnisse

Als Basis für die Untersuchung der Genexpression dienten die Daten der AG Jücker aus einer Microarray-Analyse, welche im Jahr 2005 mit dem Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array in Zusammenarbeit mit Dr. Streichert (Institut für Klinische Chemie, UKE) durchgeführt wurde. Auf der Grundlage dieser Daten wurden Gene ausgewählt, welche in der Umgebung der 3q21 Translokation liegen und eine Regulation der Expression zeigten. Zudem wurden Gene untersucht, welche in der Literatur in Zusammenhang mit 3q21-Aberrationen diskutiert wurden. Als dritte Gruppe von Genen wurden solche ausgesucht, welche anhand der Microarraydaten eine starke Regulation der Expression zeigten, und bei denen entweder eine Rolle in der Leukämogenese bekannt ist, oder aber eine Funktion als möglicher Wachstumsfaktor angenommen wird.

### 4.1 Auswahl der zu untersuchenden Gene

Unter der Annahme einer Genregulation von bis zu einer Million Basenpaare vom Bruchpunkt entfernt (Pfeifer et al. 1999) und einer minimal nachweisbaren Regulation in den vorliegenden Microarray-Daten um den Faktor 2, wurden die in Tabelle 5 aufgelisteten Gene für die Untersuchung mittels quantitativer Real-Time PCR ausgewählt.

<b>Gene im Bereich des Bruchpunktes auf Chromosom 3</b>	
<b>Name</b>	<b>Gen-Symbol</b>
KIAA1257	KIAA1257
H1 histone family, member X	H1FX
Transmembrane and coiled-coil domain family 1	TMCC1

**Tab. 5: Die ausgewählten Gene auf Chromosom 3 im Abstand von bis zu einer Million Basenpaare vom Bruchpunkt**



<b>Gene im Bereich des Bruchpunktes auf Chromosom 12</b>	
<b>Name</b>	<b>Gen-Symbol</b>
solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 13	SLC6A13
Nerve injury-Inducted Protein 2	NINJ2
WNK lysine deficient protein kinase 1	WNK1

**Tab. 6: Die ausgewählten Gene auf Chromosom 12 im Abstand von bis zu einer Million Basenpaare vom Bruchpunkt**

Des Weiteren wurden die Gene Ribophorin I (RPNI) und GATA binding protein 3 (GATA2) ausgewählt, obwohl diese Gene nicht die oben genannten Kriterien erfüllten. Diese Gene wurden jedoch in der Literatur mehrfach in Zusammenhang mit 3q21 Translokationen diskutiert.

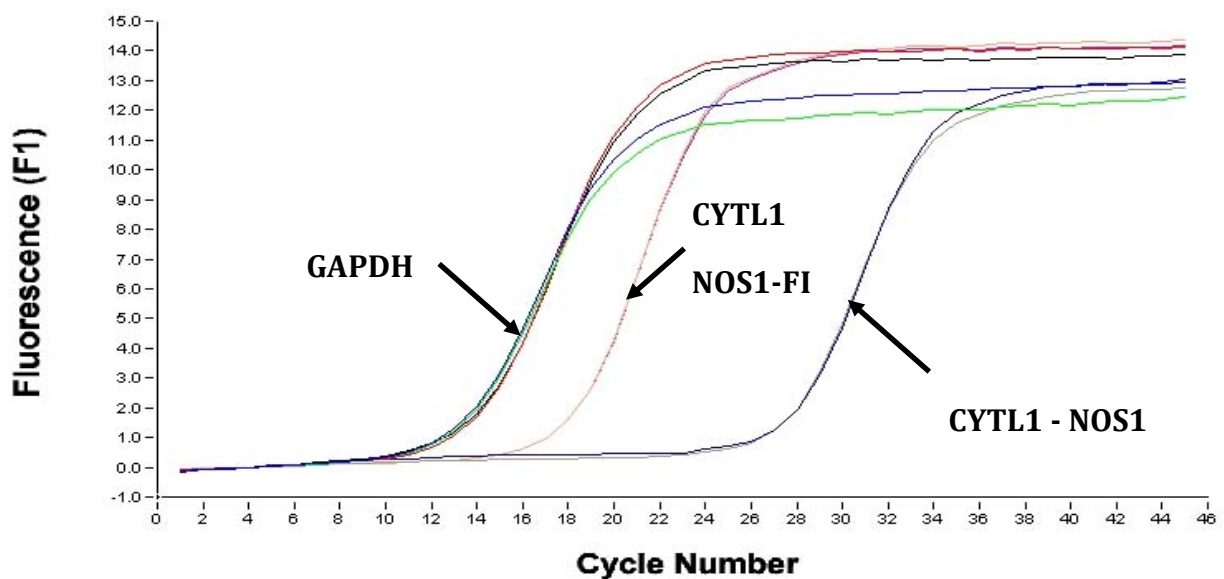
Zusätzlich zu den mit dem Bruchpunkt assoziierten Genen wurde in den Daten der Mikroarray-Analyse nach Genen gesucht, welche auffällig stark reguliert waren und aufgrund ihrer Eigenschaft möglicherweise zu dem faktorunabhängigen Wachstum der NOS1-FI beitragen könnten. Hierbei wurden die folgenden Gene ausgewählt:

<b>Name</b>	<b>Gen-Symbol</b>
AF4/FMR2 family, member 3	AFF3
Cytokine Like 1	CYTL1
Fms-related tyrosine kinase	FLT3

**Tab. 7: Die ausgewählten Gene unabhängig vom Bruchpunkt**

## 4.2 Untersuchung der Genexpression mittels quantitativer Real-Time PCR

Die Expression der ausgewählten Gene wurde mittels quantitativer Real-Time PCR im LightCycler der Firma Roche untersucht. Es wurden 3 verschiedene RNA Isolate verwendet und jeweils in cDNA umgeschrieben. Pro Lauf im LightCycler wurde jeweils in Duplikaten die Expression der Gene in den beiden Zelllinien der NOS1 mittels Fluoreszenzmessung bestimmt.



**Abb. 7** Fluoreszenzkurven hier am Beispiel des am stärksten regulierten Gens aller untersuchten Gene **CYTL1**: Die x-Achse zeigt die Anzahl an PCR-Zyklen an, die y-Achse die gemessene Fluoreszenz. Als Housekeeping-Gen dient GAPDH. Gemessen wurde die Expression von CYTL1 in der faktorunabhängigen Zelllinie NOS1-FI gegenüber der faktorabhängigen Zelllinie NOS1-#4. Jeder PCR-Ansatz wurde in Duplikaten gemessen. Die Kurven lassen erkennen, dass der Beginn der exponentiellen Phase der PCR bei der NOS1-FI für das untersuchte Gen etwa 10 Zyklen vor der NOS1-#4 liegt.

#### 4.2.1 Gene mit postulierter Assoziation zu 3q21-Aberrationen

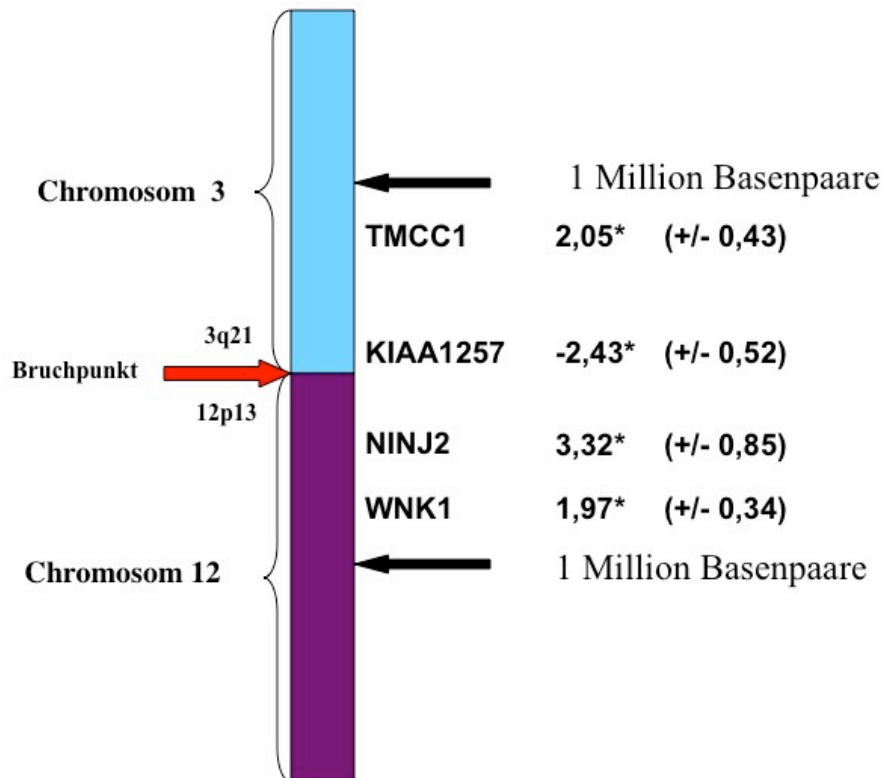
Die in der Literatur in Zusammenhang mit der 3q21 Translokation diskutierten Gene zeigen eine geringere Expression in der faktorunabhängigen Mutante, wobei jedoch keines der beiden Ergebnisse statistisch signifikant ist.

Gen	Fold Change	Standardabweichung	P-Wert
RPN1	-1,23	0,23	0,19
GATA2	-77,23	54,34	0,14

**Tab. 8:** Ergebnisse der Expressionsanalyse der im Zusammenhang mit 3q21-Aberrationen diskutierten Gene

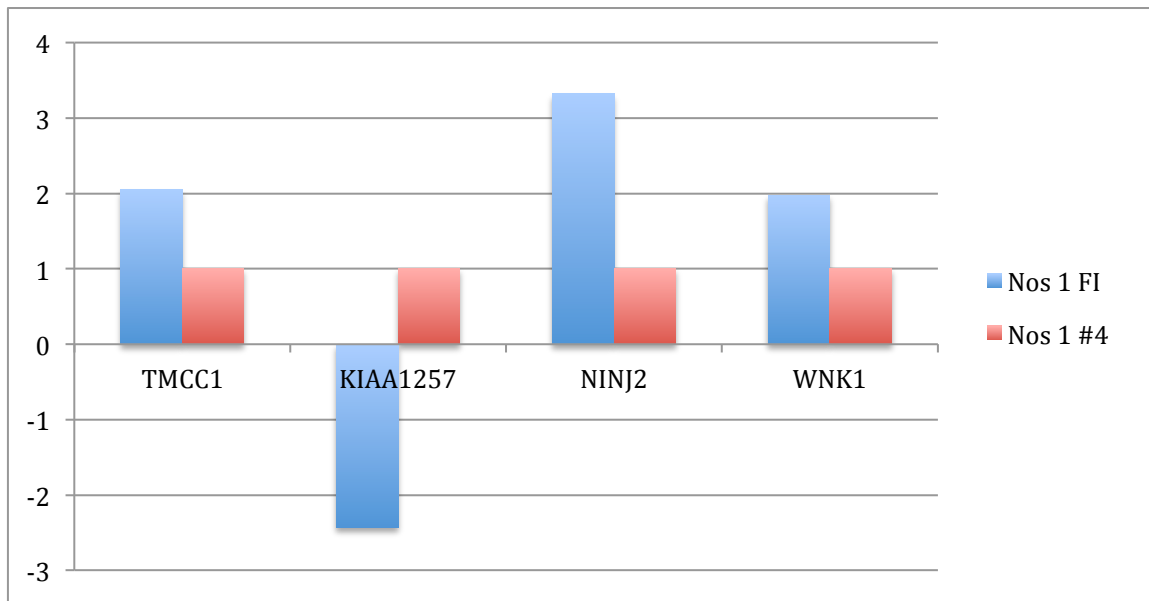
#### 4.2.2 Gene im Bruchpunktbereich der Translokation

Die Expressionsuntersuchungen ergaben für die ausgewählten Gene auf dem terminalen Ende von Chromosom 12 und dem translozierten Teilstück 3q21 folgende Ergebnisse:



**Abb. 8: Ergebnisse der Expressionsanalyse der ausgewählten Gene in der Nähe des Bruchpunktes:** Schematische Darstellung der Translokation. Genexpression angegeben als Fold Change in Gegenüberstellung von NOS1-FI in Relation zu NOS1-#4 jeweils mit Standardabweichung in Klammern. Mit \* gekennzeichnete Werte sind statistisch signifikant ( $p \leq 0,05$ ).

Für alle Gene im Bereich des Bruchpunktes konnte eine statistisch signifikante ( $p \leq 0,05$ ) Regulation nachgewiesen werden. Hierbei zeigt TMCC1 eine 2,05 fach höhere Expression, NINJ2 eine 3,32 fach höhere Expression und WNK1 eine 1,97 fach höhere Expression in der faktorunabhängigen Mutante gegenüber der ursprünglichen Zelllinie. Das Gen KIAA1257 ist das einzige der ausgewählten Gene, welches eine niedrigere Expression in der faktorunabhängigen Mutante zeigt, die gemessene RNA Menge ist 2,43 fach niedriger als in der Zelllinie NOS1-#4.



**Abb. 9 Relative RNA-Menge:** Dargestellt sind die relativen Mengen gemessener mRNA der untersuchten Gene in den Zelllinien Nos 1 FI und Nos 1 #4, wobei der RNA-Menge der Zelllinie Nos 1 # 4 der Wert 1 zugeordnet wurde.

Für das zur Expressionsanalyse ausgewählte, auf Chromosom 3 gelegene Gen H1FX sowie für das auf Chromosom 12 gelegene SLC6A13 konnten keine verwertbaren Messergebnisse erzielt werden. Nach jeweils 3 verschieden getesteten Primerpaaren mit zahlreichen Messversuchen bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen und Annealingzeiten wurden die Versuche zu diesen Genen beendet.

### 4.2.3 Gene mit proliferationsfördernden Eigenschaften unabhängig von der 3q21-Translokation

Für die Gene, welche einen bekannten bzw. möglichen wachstumsfördernden Einfluss haben und eine deutliche Regulation in der Microarray Analyse zeigten, konnte in der Real Time PCR diese Regulation bestätigt werden.

Gen	Fold Change	Standardabweichung	P-Wert
Af 3	114,61	36,15	0,03
CYTL1	1615,51	467,94	0,03
FLT3	83,01	19,98	0,02

**Tab. 9: Ergebnisse der Expressionsanalyse der unabhängig von der Translokation untersuchten Gene**

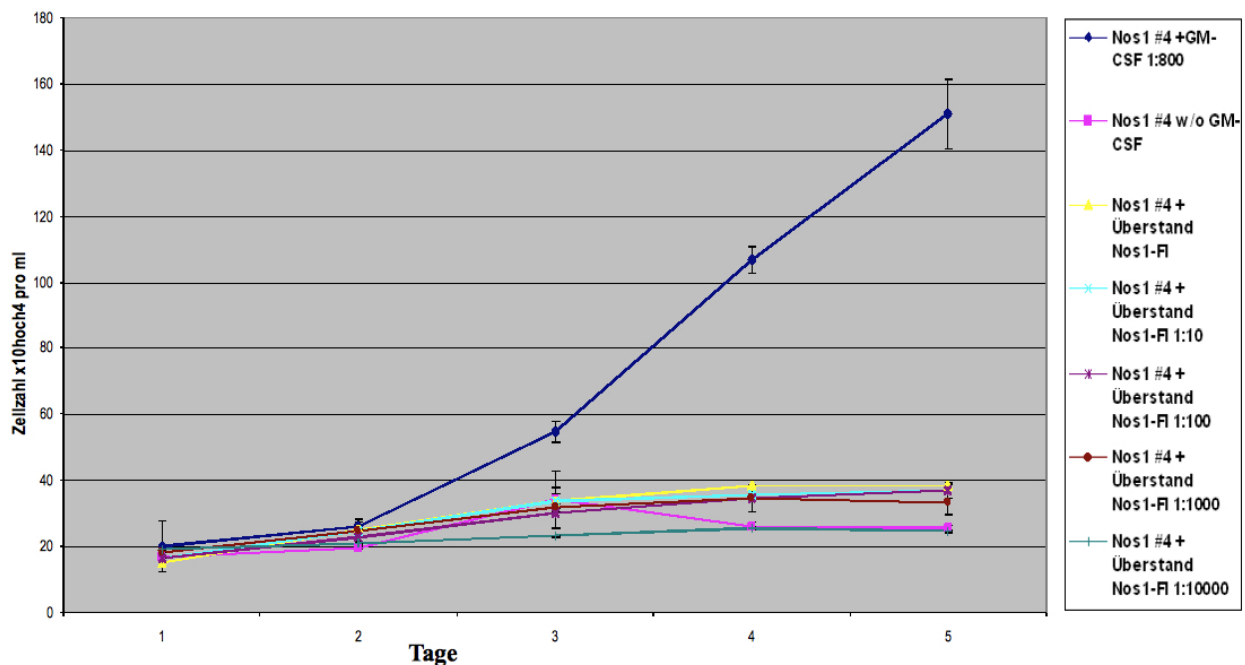
Hierbei zeigen alle drei Gene eine statistisch signifikante Hochregulation in der faktorunabhängigen Mutante. Insbesondere bemerkenswert ist hier die 1615-fache Hochregulation des CYTL1-Gens.

### 4.3 Proliferationsversuche

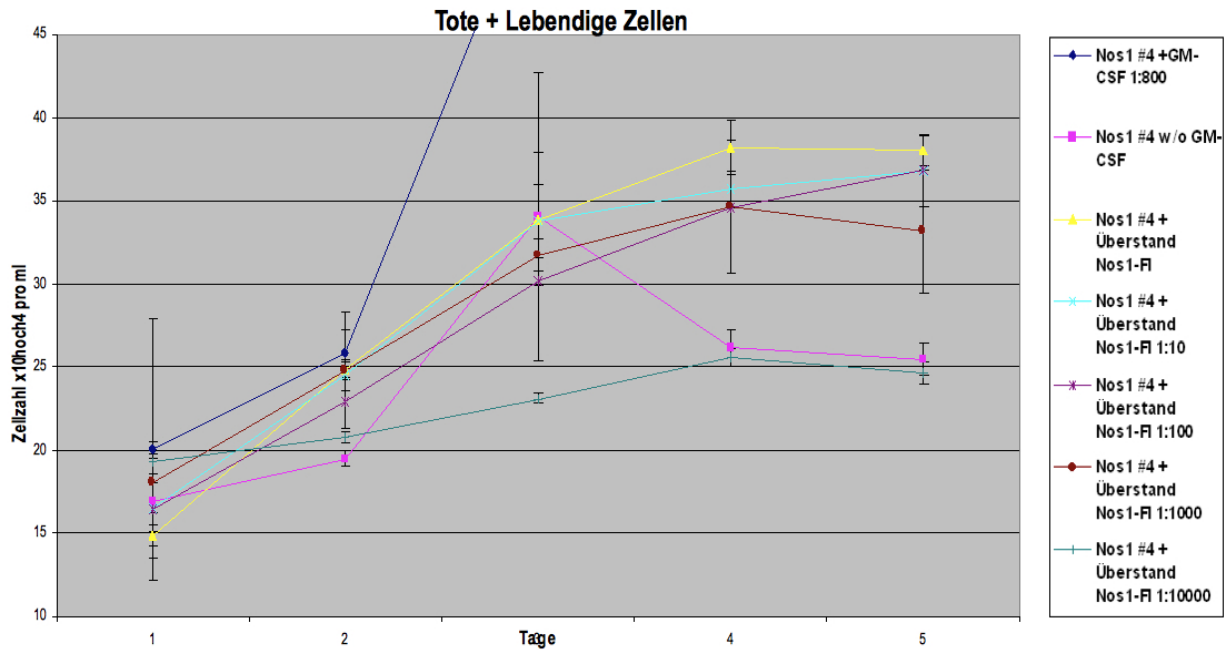
Ziel dieser Versuche war es zu untersuchen, ob sich die faktorunabhängige Zelllinie NOS1-FI durch die Produktion eines Wachstumsfaktors autokrin stimuliert, und über diesen Mechanismus auf den Wachstumsstimulus des GM-CSF verzichten kann. Zudem sollte mittels Zugabe eines FLT3-Inhibitors überprüft werden, inwiefern das in der NOS1-FI deutlich hochregulierte Gen FLT3 zur Wachstumsfaktorunabhängigkeit beiträgt bzw. ob sich das faktorunabhängige Wachstum mittels FLT3-Inhibitor hemmen lässt.

### 4.3.1 Zellproliferation der NOS1-Zellen mit Überstand der NOS1-FI-Zellen

Die fünftägige Kultivierung der NOS1-Zellen (NOS1-#4) mit Überstand, bzw. in Zehnerpotenzen verdünntem Überstand von Kulturmedium der faktorunabhängigen Mutante, zeigte insgesamt nur einen geringen Effekt auf das Wachstum der Zelllinie, verglichen mit Wachstumsstimulation mittels GM-CSF (Abb. 10). Bei genauerer Betrachtung (Abb. 11) lässt sich jedoch ein mit zunehmender Verdünnung graduell abnehmender Effekt ablesen.



**Abb. 10: Kultivierung der NOS1-#4 mit dem Überstandsmedium der NOS1-FI:** Die Grafik zeigt die Gesamtzellzahl der NOS1-#4 (tote und lebendige Zellen) nach fünftägiger Kultivierung mit Überstandsmedium. Als Positivkontrolle wurde eine Kontrolle mit Zugabe von GM-CSF in der Verdünnung 1:800 verwendet. Negativkontrolle Medium ohne GM-CSF Zugabe.

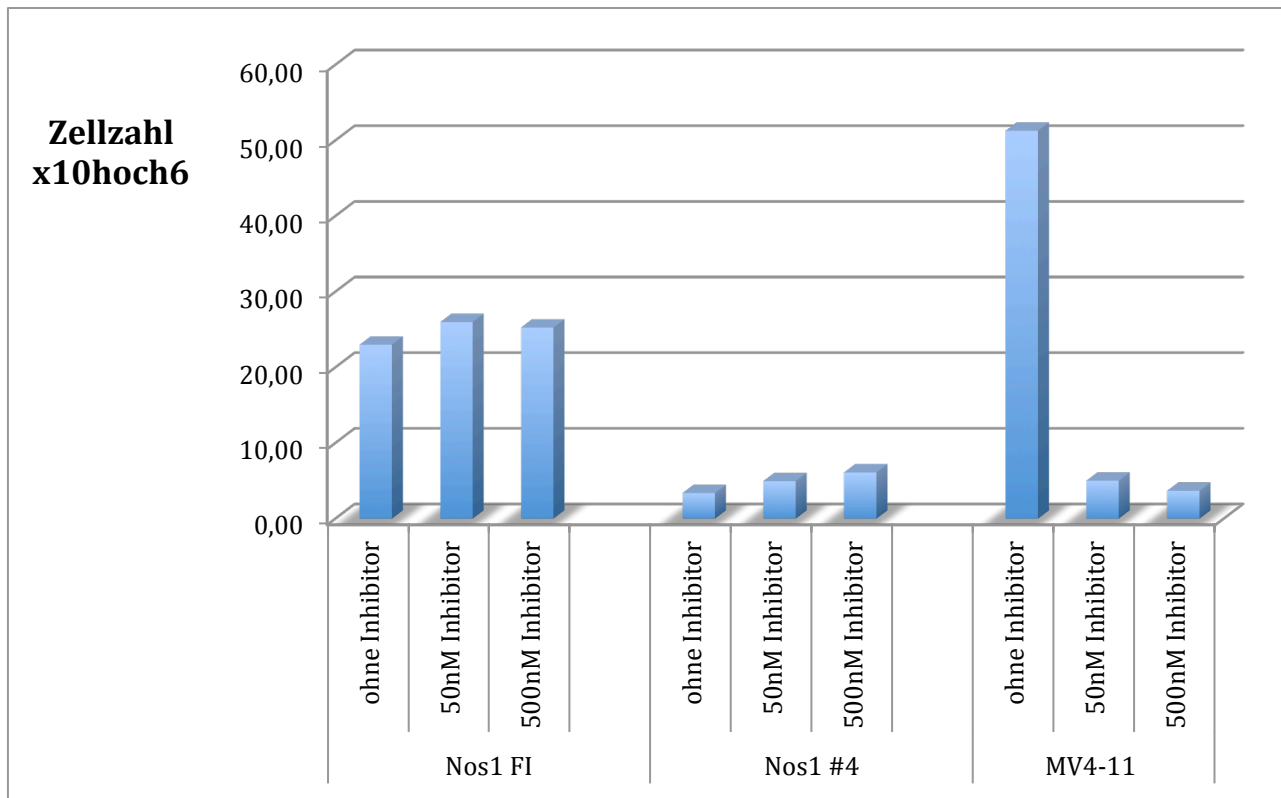


**Abb. 11: Genauere Betrachtung der Kultivierung der NOS1-#4 mit dem Überstandsmedium der NOS1-FI:** Die Grafik zeigt die Gesamtzellzahl der NOS1-#4 (tote und lebendige Zellen) nach fünftägiger Kultivierung mit Überstandsmedium, wobei der Messbereich der Positivkontrolle ausgeblendet wurde, mit dem Effekt einer exakteren Betrachtung der Verdünnungsreihe des Überstandes. Hierbei ist durchaus ein, wenn auch schwacher, titrierbarer Effekt erkennbar. Als Positivkontrolle wurde eine Kontrolle mit Zugabe von GM-CSF in der Verdünnung 1:800 verwendet. Negativkontrolle Medium ohne GM-CSF Zugabe.

#### 4.3.2 Proliferationsversuch mit einem Flt3-Tyrosinkinaseinhibitor

Hierbei wurden die Zelllinien NOS1 (NOS1-#4), NOS1-FI sowie als Positivkontrolle die durch Flt3-Inhibitor hemmbare Zelllinie MV4-11 mit unterschiedlichen Konzentrationen eines Flt3-Tyrosinkinaseinhibitors über 6 Tage kultiviert.





Y-Achse: Wachstum ( $\times 10^6$ )

**Abb. 12: Versuch der Wachstumsinhibition mittels Flt3-Tyrosinkinaseinhibitor:**  
 Dargestellt ist die Zellzahl nach 6 Tagen Inkubation ohne Flt3-Inhibitor, mit 50nM Inhibitor und 500 nM Inhibitor. Es ist keinerlei inhibitorischer Effekt zu erkennen, wobei die Inhibition der Kontrollzelllinie gut zu erkennen ist.

Es zeigt sich keinerlei wachstumshemmender Effekt bei den NOS1-Zelllinien, wobei die Kontrollzelllinie MV4-11 eine deutliche Inhibition sowohl in der 50 nM als auch in der 500 nM Konzentration aufweist.

#### 4.4 Klonierung des CYTL1-Gens in den SF91 Vektor

Der Abschluss der Klonierung des CYTL1-Gens in den SF91 Vektor wurde mittels DNA-Sequenzierung geprüft. Dabei zeigte sich in einem der vier untersuchten Bakterienklone, dass das CYTL1-Insert in korrekter Orientierung in den Vektor eingefügt wurde. Von diesem Klon wurden Glycerolstocks für weiterführende Experimente angelegt.

## 5. Diskussion

### 5.1 Einleitung

Chromosomale Aberrationen, insbesondere Translokationen, sind ein wichtiger Mechanismus in der Entstehung maligner Erkrankungen. Die Identifikation der involvierten Gene und die Entschlüsselung ihrer Rolle in der Kanzerogenese und Leukämogenese ist dabei nicht nur ein entscheidender Faktor für das Verständnis der Krebsentstehung, die involvierten Gene bzw. die Genprodukte bieten einen hervorragenden Ansatz für die Behandlung dieser Erkrankungen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Zusammenhang von wachstumsfaktorunabhängigem Wachstum und der häufig in Leukämien vorkommenden, mit einer schlechten Prognose einhergehenden, chromosomalen Translokation 3q21 zu untersuchen. Als Modellsystem hierfür wurde die GM-CSF abhängig wachsende humane Leukämiezelllinie (NOS1) in Kombination mit einer hieraus etablierten, wachstumsfaktorunabhängigen Sublinie (NOS1-FI) verwendet. Die faktorunabhängige Sublinie NOS1-FI weist im Vergleich zur parentalen, faktorabhängigen Linie NOS1 eine 3q21-Aberration auf (der(12)t(3;12)(q21;p13)). Somit konnte durch eine vergleichende Analyse beider Zelllinien die mögliche Auswirkung der chromosomalen 3q21-Aberration auf die Genexpression untersucht werden. Hierzu wurde die differenzielle Expression von Genen untersucht, welche nahe des Bruchpunktes auf dem translozierten Teilstück 3q21 liegen. Des Weiteren wurde die Expression von Genen, welche auf dem angeschlossenen Anteil von Chromosom 12 lokalisiert sind, untersucht. Zudem wurde die differenzielle Expression ausgewählter Gene, unabhängig vom Bruchpunkt untersucht. Diese Gene wurden aufgrund ihrer bekannten oder postulierten proliferationsfördernden Eigenschaften ausgewählt. Die Ergebnisse dieser Arbeit führten zur Identifizierung von Genen, deren Expression in der faktorunabhängigen Zelllinie reguliert wird. Ihre mögliche Regulation durch die chromosomale 3q21-Aberration sowie ihre mögliche biologische Funktion im Zusammenhang mit der Wachstumsfaktorunabhängigkeit wird im Folgenden diskutiert.

## **5.2 Diskussion der untersuchten Gene mit proliferationsfördernden Eigenschaften unabhängig von der 3q21-Translokation**

### **5.2.1 Cytokine like 1 (CYTL1)**

Cytokine-like 1 ist ein auf Chromosom 4 (4p16.2) lokalisiertes, aus vier Exons bestehendes Gen, welches für das gleichnamige, synonym auch C17 genannte Protein kodiert. Das Protein besteht aus 136 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 15577 Da. Das Gen wurde im Jahr 2000 zunächst auf CD34+ Stammzellen aus Knochenmark und Nabelschnurblut entdeckt (Liu et al. 2000). Das resultierende Polypeptid weist eine für hämatopoetische Chemokine typische Sekundärstruktur mit vier Alpha-Helices sowie einem sekretorischen N-terminalen Ende auf (Liu et al. 2000). Neuere Analysen der dreidimensionalen Peptidstruktur weisen darauf hin, dass CYTL1 eine dem Chemokin IL8 bzw. CCL2 ähnliche Struktur aufweist und möglicherweise an den Chemokinrezeptor CCR2 binden kann (Tomczak & Teresa Pisabarro 2011). Des Weiteren spielt CYTL1 eine wichtige Rolle bei der Chondrogenese mesenchymaler Zellen sowie zur Aufrechterhaltung der Homöostase im Gelenkknorpel (Kim et al. 2007). Dies konnte mittels exogener Zugabe sowie mittels lentiviraler Überexpression in Zellkulturen mesenchymaler Stammzellen nachgewiesen werden. Die Effekte wurden hierbei unter anderem über eine erhöhte transkriptionale Aktivität von Sox9 vermittelt. Außerdem wurde gezeigt, dass CYTL1 zu einer erhöhten Produktion des insulin-like growth factor-1 (IGF-1) führt. Hierbei wird von einem auto- und parakrinen Mechanismus der Signalübermittlung ausgegangen (Kim et al. 2007).

Ein Knockout des Gens in Mäusen führte zu arthritischer Zerstörung des Gelenkknorpels (Jeon et al. 2011), umgekehrt schützt eine erhöhte Expression des Gens vor einer Gelenkdestruktion, was auf immunmodulatorische Eigenschaften bei struktureller Ähnlichkeit zu Interleukin-2 zurückzuführen sein könnte (Chao et al. 2011).

Kwon et al. haben eine Hypermethylierung des CYTL1-Gens in bronchopulmonalen Plattenepithelkarzinomen nachgewiesen und hierbei auf eine mögliche Rolle in der epithelial-mesenchymalen Transition bei der Tumorentstehung hingewiesen (Kwon et al. 2012). Ebenfalls wurde eine erhöhte CYTL1 Genexpression in Zusammenhang mit benigner Prostatahyperplasie nachgewiesen (Begley et al. 2008). Wen et al. konnten 2012 erstmals

einen starken Hinweis für eine Rolle des Gens in der Entstehung und Ausbreitung eines malignen Tumors, des Neuroblastoms, finden (Wen et al. 2012).

Sämtliche bis heute zu diesem Gen vorliegenden Erkenntnisse lassen den Schluss zu, dass CYTL1 eine wichtige Rolle in der Proliferation von Zellen spielt, sei es bei der Aufrechterhaltung des Gelenkknorpels, der Prostatahyperplasie oder der Entstehung maligner Tumore wie des Plattenepithelkarzinoms oder des Glioblastoms. Der genaue Mechanismus hierbei ist jedoch noch nicht geklärt.

In der wachstumsfaktorunabhängigen Mutante NOS1-FI war die gemessene Menge an mRNA des CYTL1 Gens um den Faktor 1616 höher als in der ursprünglichen Zelllinie NOS1#4, das Ergebnis ist statistisch signifikant. Diese starke Überexpression des Gens in Zusammenschau mit den bekannten proliferationsfördernden Eigenschaften von CYTL1 legt die Vermutung nahe, dass CYTL1 in der Entstehung der Faktorunabhängigkeit der mutanten Zelllinie eine wichtige Rolle spielen könnte. Die Lage des Gens auf Chromosom 4 ergibt keine Verbindung zu der in der faktorunabhängigen Zelllinie vorliegenden 3q21-Translokation, somit ist der Grund für die sehr starke Überexpression zunächst unklar, ein Überlebens- bzw. Wachstumsvorteil für die Zelle scheint aber nahe zu liegen.

Da es sich bei dem CYTL1-Protein um ein sekretorisches Protein handelt und nach heutigem Wissenstand eine cytokinartige Aktivität mehrfach nachgewiesen wurde, wäre eine autokrine bzw. parakrine Stimulation der NOS1-FI Zellen durch das Protein eine weiter zu verfolgende Hypothese.

Insgesamt bietet die hier vorgefundene Kombination der starken Überexpression eines noch relativ neuen cytokinartigen Gens in einer wachstumsfaktorunabhängigen Mutante einer Leukämiezelllinie eine sehr gute Möglichkeit, mehr über die möglichen proliferationsfördernden Eigenschaften von CYTL1 zu erfahren.

Zur weiteren Untersuchung der Rolle von CYTL1 in der Entstehung der Faktorunabhängigkeit sind weiterführende Experimente geplant. Eine Klonierung in den retroviralen Vektor SF91 ist bereits in dieser Arbeit erfolgreich durchgeführt worden, eine Überexpression des Gens in der GM-CSF abhängigen Zelllinie NOS1 mittels retroviraler Transduktion wäre der nächste Schritt, um zu sehen, ob hiermit möglicherweise ein GM-CSF-unabhängiges Wachstum der Nos#4 Zelllinie erreicht werden kann. Zudem ist ein Knockdown des CYTL1-Gens mittels siRNA in der wachstumsfaktorunabhängigen Mutante

in Planung, um zu sehen, ob das unabhängige Wachstum auch ohne CYTL1-Expression aufrechterhalten wird.

### **5.2.2 AF4/FMR2 Family, Member (AFF3)**

AFF3 ist ein auf Chromosom 2 (2q11) gelegenes, aus 28 Exons bestehendes, Gen. Es kodiert für das gleichnamige, je nach Isoform aus bis zu 1251 Aminosäuren bestehende, Protein, es sind multiple Spleißvarianten für dieses Gen bekannt (Ma & Staudt 1996). AFF3 gehört zur AF4/FMR2 Genfamilie, einer Reihe von nukleären Transkriptionsfaktoren, welche in der Entwicklung lymphoider Zellen sowie auch in der Entstehung von Leukämien eine Rolle spielen.

Die AF4/FMR2-Genfamilie im Allgemeinen und AFF3 im Speziellen spielen in der Entstehung von akuten Leukämien eine Rolle, da sie im Rahmen von diversen Translokationen, welche in der Regel Chromosom 11 involvieren, als Fusionsgen fungieren (Ma & Staudt 1996; Von Bergh et al. 2002; Hiwatari et al. 2003). AFF3 ist hierbei ein Fusionspartner des Mixed lineage leukemia-Gens (MLL), das MLL-AFF3 Fusionsgen ist das am meisten gefundene Fusionsgen bei 11q23 Translokation und mit einer äußerst schlechten Prognose verbunden (Von Bergh et al. 2002). Es konnte in Zelllinien gezeigt werden, dass dieses Fusionsprotein sowie auch andere Fusionsproteine von MLL und der AF4-Familie eine Elk1-Aktivierung über den Ras/MEK/ERK-Kinase-Signalweg auslöst und somit eine entscheidende Rolle in der Entstehung von 11q23 assoziierten Leukämien spielt (Ng et al. 2010).

Neben der Rolle in Leukämien ist AFF3 bei diversen anderen Krankheitsbildern Gegenstand der Forschung. So konnte z.B. eine aberrante AFF3 Expression in Mammakarzinomen nachgewiesen werden (To et al. 2005). Zudem scheint AFF3 eine Rolle bei der Hirnentwicklung und im Rahmen von Intelligenzstörungen zu spielen (Moore et al. 2014).

Aufgrund einer deutlich gesteigerten Expression in den Microarraydaten in Zusammenschau mit den möglichen proliferationsfördernden Eigenschaften von AFF3 sowie der Assoziation mit Leukämien wurde dieses Gen für die weitere Untersuchung mittels quantitativer Real Time PCR ausgewählt. Hierbei bestätigt sich eine deutliche Überexpression, es konnte eine starke Hochregulation in der faktorunabhängigen Mutante

gezeigt werden wobei die Menge an mRNA 115 mal höher war als in der ursprünglichen Zelllinie NOS1#4, das Ergebnis ist statistisch signifikant.

Diese sehr starke Überexpression kann als möglicher Hinweis auf eine Rolle dieses Gens in der Wachstumsfaktorunabhängigkeit der mutierten Zelllinie sein. Ob eine Überexpression einen primär proliferationsfördernden Effekt hat oder ob die vermehrte Expression dieses nukleären Transkriptionsfaktors ein sekundäres Phänomen im Rahmen einer pro-proliferativen Signalkaskade ist, lässt sich bisher nicht beantworten. Bislang sind keine Forschungsergebnisse zu den biologischen Folgen einer AFF3 Überexpression bekannt, die nachgewiesene aberrante Expression in Mammakarzinomen lässt jedoch den Schluss zu, dass auch eine Überexpression möglicherweise eine Rolle bei der malignen Entartung von Zellen spielen könnte.

Die bislang in zahlreichen Leukämiefällen nachgewiesenen Translokationen von AFF3, welche zu Fusionsproteinen führen und mit einer schlechten Prognose der Erkrankung verknüpft sind, spielen in der Wachstumsfaktorunabhängigkeit der NOS1-FI sicherlich keine Rolle, da der entsprechende Genlocus in der Karyotypisierung keine Translokation zeigte. Somit kommt weder ein AFF3 einschließendes Fusionsprotein, noch eine translokationsbedingte Überexpression durch eine Verlagerung in einen fremden Promotorbereich in Frage.

### **5.2.3 FMS-related tyrosine kinase 3 (FLT3)**

FLT3 ist ein auf Chromosom 13 (13q12) gelegenes, aus 24 Exons aufgebautes Gen, welches für ein aus 993 Aminosäuren bestehendes Protein aus der Familie der Rezeptortyrosinkinase Subtyp III kodiert (Rosnet O, Mattei MG, Marchetto S 1991). Physiologisch erfolgt eine Aktivierung des Rezeptors durch Bindung an den FLT3-Liganden (FL), dies hat eine Dimerisierung des Rezeptors zur Folge, und es kommt zu einer Konformationsänderung mit Freilegung der ATP-Bindungsstelle, welches letztlich zu einer Autophosphorylierung des Rezeptors durch die eigene Kinasedomäne führt. Der phosphorylierte FLT3-Rezeptor gibt schließlich über den Ras-Raf-MEK-ERK-MAP-Kinase-Signalweg, den JAK-STAT-Signalweg oder den PI3-Kinase-Signalweg der Zelle das Signal zu Proliferation und Überleben und stoppt die zelluläre Funktion der Apoptose (Weisberg et al. 2009).

FLT3 wird physiologisch in hämatopoetischen Stammzellen bzw. Progenitorzellen exprimiert und ist wichtig für die Proliferation und Ausreifung von B-Progenitorzellen, dendritischen Zellen sowie für natürliche Killerzellen (Small et al. 1994). Während des Ausreifungsprozesses der Progenitorzellen erfolgt ein sukzessiver Verlust der Expression, die ausgereiften hämatologischen Zellen zeigen keine FLT3 Expression mehr (Gary Gilliland & Griffin 2002). Ein experimentelles Ausschalten der FLT3-Funktion in Mäusen ergab zunächst zwar eine annähernd gesunde Population, jedoch wiesen diese einen Verlust von primitiven B-Progenitorzellen auf. In Knochenmarktransplantationsversuchen zeigte sich zudem ein Verlust der Fähigkeit in der Wiederherstellung sowohl von T-Zellen als auch von myelischen Zellen. Diese Experimente belegen die wichtige Funktion von FLT3 in der Entwicklung multipotenter Stammzellen und B-Zellen (Mackarechtschian et al. 1995).

Eine Expression von FLT3 konnte in den leukämischen Zellen von 70 bis 90 % der Patienten mit AML und B-Zell ALL nachgewiesen werden, Zellen einer chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) sowie die meisten Zellen der chronisch myelischen Leukämien (CML) zeigen keine FLT3 Expression (Mackarechtschian et al. 1995; Carow et al. 1996).

Eine starke Expression von FLT3 sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene findet sich in den meisten B-Zelleukämien und akuten myeloischen Leukämien sowie auf einigen Formen der akuten T-Zelleukämie. Zudem konnte eine erhöhte Expression in einigen Fällen der Blastenkrise einer chronisch myeloischen Leukämie gezeigt werden (Carow et al. 1996). Außerdem konnten Studien sowohl bei akuten myeloischen als auch bei akuten lymphatischen Leukämien eine Überexpression des FLT3-Liganden (FL) nachweisen. Diese Überexpression von FL führt möglicherweise über den Mechanismus der parakrinen und autokrinen Stimulation auch in Leukämien ohne FLT3 Mutation zu einer dauerhaften Aktivierung des Rezeptors und hat in Versuchen mit Zelllinien einen proliferationsfördernden sowie einen antiapoptotischen Effekt und bewirkt einen Differenzierungsstopp der Zellen (Zheng et al. 2004).

Die wichtigste und am besten untersuchte Rolle von FLT3 in der Leukämogenese ist die dauerhafte Aktivierung der Kinasedomäne durch Mutationen. Hierbei sind zwei grundlegende Mechanismen von Bedeutung, die interne Tandemduplikation (ITD) der Juxtamembrandomäne und die Punktmutation der Kinasedomäne, wobei die ITD die häufigste Mutationsform ist (Kiyoi et al. 2002). Die ITD hebt die autoinhibitorische Funktion

der Juxtamembrandomäne auf, dies führt zu einer ständigen Autophosphorylierung von FLT3 und somit zu einer fortwährenden Aktivierung der nachgeschalteten proliferationsfördernden und antiapoptotischen Kinasewege (Kiyoi et al. 1998; Griffith et al. 2004). Eine in Leukämiezellen eingebrachte ITD des FLT3-Rezeptors erzeugte eine wachstumsfaktorunabhängige Proliferation der Zellen. Im Maus-Modell erzeugte eine ITD ein zum Tode führendes myeloproliferatives Syndrom, eine ITD alleine konnte in diesen Versuchen jedoch nicht das Vollbild einer akuten Leukämie auslösen. Hierfür sind offenbar weitere proliferationsfördernde Mutationen notwendig (Kelly et al. 2002). Neben der ITD wurden in AML-Patienten auch aktivierende Punktmutationen der Kinasedomäne von FLT3 gefunden, die häufigste ist hierbei eine Mutation von Aspartam an Position 835 (D835). Punktmutationen von FLT3 konnten in etwa 7% der AML-Patienten nachgewiesen werden (Abu-Duhier et al. 2001; Yamamoto et al. 2001).

FLT3-Mutationen betreffen etwa 30% aller Patienten mit einer AML und sind in der Klinik mittlerweile auch ein wichtiger Prognosefaktor bei diesen Patienten. In zahlreichen klinischen Studien konnte belegt werden, dass FLT3-Mutationen, insbesondere die ITD, mit einer deutlich schlechteren Prognose verbunden sind. Gegenüber Patienten mit FLT3-Wildtyp haben AML-Patienten mit einer ITD ein deutlich höheres Risiko für ein Rezidiv nach Therapie, eine deutlich geringere 5-Jahres-Überlebensrate sowie eine geringere Zeit des ereignisfreien Überlebens (Kottaridis et al. 2015; Santos et al. 2011; Fröhling et al. 2002; Schnittger et al. 2002; Thiede et al. 2001; Ravandi et al. 2010; Fernandez et al. 2009). Unabhängig von einer mutationsbedingten Aktivierung von FLT3 scheint jedoch auch eine hohe Expression von FLT3-Wildtyp in akuten myeloischen Leukämien ein Marker für eine schlechtere Prognose zu sein (Ozeki et al. 2008).

FLT3-Mutationen sind insgesamt die häufigste genetische Veränderung in AML-Patienten und erwiesenermaßen eine wichtige Treibermutation in malignen myeloischen Erkrankungen. In Zusammenschau mit der insgesamt schlechten Prognose einer AML im Allgemeinen und der nochmal schlechteren Prognose einer FLT3-mutierten AML, stellt die gezielte Therapie mittels FLT3-Kinaseinhibitoren einen sehr vielversprechenden Ansatz dar. Bis heute wurden zahlreiche, zum Teil FLT3-spezifische, teilweise auch gegen multiple Tyrosinkinase gerichtete, Inhibitoren in unterschiedlichsten klinischen Studien getestet. Aufgrund bislang eingeschränkter Wirksamkeit, starker unerwünschter Arzneimittelwirkungen und Ausbildung von Resistenzmechanismen steht ein endgültiger



Durchbruch der Substanzen in der klinischen Behandlung jedoch noch aus, bis heute konnte für keine Substanz eine FDA-Zulassung erreicht werden (Kiyoi 2015).

Aufgrund einer deutlich gesteigerten Expression in den Microarraydaten in Zusammenschau mit den proliferationsfördernden Eigenschaften und der Wichtigkeit in der Entstehung von myeloischen Erkrankungen wurde das FLT3-Gen für die weitere Untersuchung mittels quantitativer Real Time PCR ausgewählt. Hierbei bestätigte sich eine starke Hochregulation der Genexpression in der faktorunabhängigen Mutante, wobei die Menge an mRNA in den NOS1-FI Zellen 83 mal höher war als in der ursprünglichen Zelllinie NOS1#4, das Ergebnis ist statistisch signifikant.

Die deutlich stärkere Expression von FLT3 in der wachstumsfaktorunabhängigen Zelllinie kann als Hinweis auf eine mögliche Rolle des Gens in der Entstehung der Faktorunabhängigkeit gesehen werden. Unabhängig von Mutationen wird eine stärkere Expression des Rezeptors auch klinisch mit einer schlechteren Prognose und einem insgesamt aggressiveren Wachstum der Zellen assoziiert (Ozeki et al. 2008). In diesem Zusammenhang wäre als eine mögliche Erklärung eine autokrine oder parakrine Aktivierung des vermehrt exprimierten Rezeptors zu diskutieren. Der Versuch einer Kultivierung der faktorunabhängigen Zelllinie mit dem Überstand der faktorunabhängigen Mutante zeigte einen geringen positiven Einfluss des Überstandes auf die Proliferation der NOS1#4-Zellen. Dies lässt an die Möglichkeit einer Sekretion von Wachstumsfaktoren mit möglicher auto- und parakriner Stimulation denken. Hierbei käme in Zusammenschau mit der vermehrten Expression des FLT3-Rezeptors der entsprechende FLT3-Ligand in Betracht, wobei hierfür auch eine vermehrte Expression des FL notwendig wäre. In den Microarraydaten zeigte sich jedoch keine vermehrte Expression des FL, so dass auf eine weitere Untersuchung mittels Real-time-PCR verzichtet wurde.

Zur Klärung der Frage, ob FLT3 eine entscheidende Rolle in Entstehung der Faktorunabhängigkeit spielt, wurde ein Proliferationsversuch mit einem FLT3-Kinaseinhibitor durchgeführt. Hierbei zeigten sich weder in der faktorunabhängigen noch in der faktorunabhängigen NOS1-Zelllinie antiproliferative Effekte. Die Kontrollzelllinie MV4-11, mit bekannter aktivierender FLT3-Mutation, konnte jedoch mit beiden gewählten Hemmstoffkonzentrationen deutlich inhibiert werden. Insbesondere die Ergebnisse dieses Proliferationsversuches sprechen, trotz der deutlichen Überexpression von FLT3 in der

faktorunabhängigen Zelllinie, gegen eine entscheidende Rolle des FLT3-Gens in der Entstehung der Faktorunabhängigkeit.

### **5.3 Diskussion der untersuchten Gene im Bereich des Bruchpunktes der 3q21-Translokation**

#### **5.3.1 Transmembrane and coiled-coil domain family 1 (TMCC1)**

TMCC1 ist ein auf Chromosom 3 lokalisiertes, dort an Position 3q22.1 gelegenes Gen, welches für ein 72 kDa schweres, aus 653 Aminosäuren bestehendes Protein codiert (Nagase et al. 1998). Das Gen besteht aus 16 Exons. Es gehört zusammen mit TMCC2 und TMCC3 zur transmembrane and coiled-coil domain-Genfamilie. Der entsprechende Abschnitt von Chromosom 3 ist bei der in der NOS1-FI Zelllinie nachgewiesenen Translokation involviert, das Gen liegt weniger als einer Million Basenpaare vom Bruchpunkt entfernt.

Über die Funktion des Gens ist bisher sehr wenig bekannt. Eine mögliche Rolle in der Entstehung der hereditären kongenitalen Facialisparesie wurde untersucht, hierbei konnte eine Expression des Gens im Gehirn, im Rückenmark und in den Ganglien nachgewiesen werden (Michielse et al. 2006). Mittlerweile konnte nachgewiesen werden, dass das TMCC1-Protein in der Membran des rauen endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert ist. Der zytosolische Anteil des TMCC1 kann hierbei Dimere oder Oligomere mit den anderen Transmembranproteinen aus der TMCC-Familie bilden und spielt möglicherweise eine Rolle in der Organisation des ER (Zhang et al. 2014).

Aufgrund der Nähe des Gens zum Bruchpunkt und einer in den Microarraydaten erkennbaren stärkeren Expression in der faktorunabhängigen Zelllinie wurde das Gen zur weiteren Expressionsanalyse mittels Real-Time PCR ausgewählt. Hierbei konnte eine verstärkte Expression in der faktorunabhängigen Zelllinie bestätigt werden, die gemessene Menge an mRNA für TMCC1 war in den Nos-FI Zellen 2,05fach so hoch wie in den NOS-#4 Zellen. Das Ergebnis ist statistisch signifikant.

Da es bislang keinerlei Hinweise auf eine proliferationsfördernde oder antiapoptotische Funktion des TMCC1-Gens gibt und bislang auch keine Zusammenhänge

mit malignen Erkrankungen belegt wurden, ergibt sich zunächst kein Anhalt für eine Rolle des TMCC1-Gens in der Entstehung der Wachstumsfaktorunabhängigkeit.

### **5.3.2 KIAA1257**

Das KIAA1257-Gen ist ein auf Chromosom 3 gelegenes, dort an Position 3q21.3 lokalisiertes Gen (Nagase et al. 1998). Es besteht aus 17 Exons und kodiert für ein aus 409 Aminosäuren aufgebautes gleichnamiges Protein mit einer molekularen Masse von 47 kDa. Über die Funktion des Gens ist bislang nichts bekannt, es konnte lediglich in einer Arbeit gezeigt werden, dass KIAA1257 die Expression von Nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1 (NR5A1) in HEK293 Zellen aktiviert (Sakai et al. 2008).

Aufgrund der nahen Lage des Gens zum Bruchpunkt und einer gezeigten veränderten Expression in den Microarraydaten wurde das Gen KIAA1257 zur weiteren Expressionsanalyse mittels Real-Time PCR ausgewählt. Hierbei konnte eine statistisch signifikante, 2,43fach niedrigere Expression in den NOS1-FI Zellen gegenüber den NOS1-#4 Zellen nachgewiesen werden, die Genexpression ist also deutlich reguliert.

Angesichts der fehlenden Information bezüglich der Funktion des KIAA1257-Gens kann über die Rolle des Gens in der Entstehung der Wachstumsfaktorunabhängigkeit nur spekuliert werden. Sollten in der Zukunft Erkenntnisse gewonnen werden, welche auf wachstumsfördernde oder wachstumshemmende Eigenschaften des Gens hinweisen, könnte KIAA1257 ein weiter zu untersuchendes Gen im Zusammenhang mit 3q21-Translokationen sein.

### **5.3.3 Ninjurin 2 (NINJ2)**

NINJ2 ist ein auf Position 12p13.33 des Chromosom 12 gelegenes Gen. Es besteht aus 6 Exons und kodiert für ein aus 142 Aminosäuren bestehendes Protein mit einer molekularen Masse von 16 kDa. Es gehört zur Ninjurin (nerve injury induced)-Genfamilie. Das NINJ2-Protein ist ein Zelladhäsionsmolekül und zeigt eine vermehrte Expression in Schwanzzellen nach einer Nervenverletzung, es stimuliert das neuronale Wachstum nach Verletzung über

homophile zelluläre Interaktion. Neben der Expression im zentralen und peripheren Nervensystem wird NINJ2 in zahlreichen weiteren adulten Organen exprimiert, eine besonders starke Expression konnte in lymphatischen Zellen sowie im Knochenmark nachgewiesen werden (Araki & Milbrandt 2000). Zudem wurde in zahlreichen Studien ein Zusammenhang zwischen Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) in unmittelbarer Nähe des NINJ2-Gens und einem erhöhte Schlaganfallrisiko untersucht (Wang et al. 2014; Ding et al. 2011; Kim et al. 2012; Li et al. 2012; Yoneyama et al. 2014; Bis et al. 2014; Araki & Milbrandt 2000).

Aufgrund der Nähe des Gens zum Bruchpunkt der 3q21-Translokation und des Hinweises auf eine gesteigerte Expression in den Daten der Microarrayanalyse wurde das Gen zur weiteren Expressionsanalyse mittels quantitativer Real-Time PCR ausgewählt. Hierbei konnte die in den Microarraydaten erkennbare Hochregulation bestätigt werden, die quantitative Real-Time PCR zeigte eine 3,32fach höhere Expression des NINJ2-Gens in der wachstumsfaktorunabhängigen Zelllinie gegenüber der ursprünglichen Zelllinie, welche GM-CSF für ihr Wachstum benötigt. Das Ergebnis ist statistisch signifikant.

Die deutliche Hochregulation des Gens kann als Hinweis auf eine mögliche Rolle von NINJ2 in der Entstehung der Wachstumsfaktorunabhängigkeit angesehen werden. In neuronalen Zellen konnte ein positiver Einfluss des Gens auf die Proliferation nach einem Wachstumsstimulus nach Verletzung gezeigt werden. Dieser positive Einfluss auf das Wachstum wird über zellkontaktvermittelte Interaktion der NINJ2-Membranproteine untereinander induziert. Zudem kann die belegte starke Expression des Gens im Knochenmark als Zeichen für eine mögliche Rolle in der Entwicklung und Proliferation myeloischer Zellen gedeutet werden, hierzu liegen bis heute jedoch keine näheren Erkenntnisse vor. Während der Arbeit mit den NOS1-FI Zellen hat sich außerdem gezeigt, dass eine gewisse Zelldichte für die erfolgreiche Kultivierung notwendig ist. Dies legt den Schluss nahe, dass eine Zell-Zell-Kommunikation eine Rolle für das Überleben der wachstumsfaktorunabhängigen Zellen spielt. Ein hochreguliertes Zelladhäsionsprotein mit proliferationsfördernden Eigenschaften wie NINJ2 wäre somit ein Kandidat für weiterführende Untersuchungen.

### 5.3.4 WNK lysine deficient protein kinase 1 (WNK1)

WNK1 ist ein auf Chromosom 12 an Position 12p13.33 gelegenes Gen aus der WNK-Subfamilie der Serin/Threonin-Proteinkinasen. Es besteht aus 28 Exons und kodiert für ein aus 2.382 Aminosäuren aufgebautes Protein mit einem Molekulargewicht von 251 kDa. Es wird ubiquitär exprimiert und es sind zahlreiche Spleißvarianten bekannt (Xu et al. 2000).

Die Funktionen von WNK-Kinasen sind vielfältig, komplex und bis heute nur teilweise verstanden. Eine wichtige Rolle spielen diese Kinasen, insbesondere WNK1, unter anderem in der Entstehung von Bluthochdruck. Mutationen in WNK1 und WNK4 verursachen im Menschen einen Pseudohypoaldosteronismus Typ II, eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung, charakterisiert durch Hypertonus und Hyperkaliämie (Wilson et al. 2001). Der Phänotyp dieser Erkrankung resultiert aus einer fehlgesteuerten Natriumaufnahme im distalen Konvolut der Henleschleife in der Niere, die genauen Mechanismen, wie die mutierten WNK-Kinasen hierzu führen, sind komplex und bislang nicht sicher geklärt (McCormick & Ellison 2011). Außerdem wurde eine spezifische WNK1-Mutation als Auslöser für die autosomal rezessive hereditäre sensible und autonome Neuropathie Typ 2 beschrieben (Shekarabi et al. 2008).

Die Rolle von WNK-Kinasen in der Entstehung von malignen Erkrankungen wird zunehmend diskutiert und ist Gegenstand der aktuellen Forschung. WNK-Kinasen interagieren auf mehreren Wegen mit MAP-Kinase-Signalwegen, welche in etwa einem Drittel aller humanen malignen Erkrankungen fehlreguliert sind (Dhillon et al. 2007). WNK1 spielt unter anderem eine Rolle in der Aktivierung von Mitogen-Activated Protein Kinase 7 (MAPK7/ERK5) in der Signalkaskade des EGF-Rezeptors (Xu et al. 2004). Zudem scheint WNK1 auch in dem Signalweg des Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF1) involviert zu sein, hierbei kommt WNK1 offenbar eine Rolle als negativer Regulator einer durch Insulin vermittelten Proliferation zu (Jiang et al. 2005). WNK1 zeigt außerdem positiv regulatorische Effekte im Wnt/ $\beta$ -catenin Signalweg (Serysheva et al. 2013).

Neben dem Einfluss auf proliferationsfördernde Signalwege wird auch der positive Einfluss von WNK1 auf die metabolische Adaptation von Tumorzellen, eine Beteiligung an der Entwicklung von Tumorinvasion und Metastasierung sowie eine Rolle in der Steuerung der Apoptose diskutiert (Moniz & Jordan 2010). Somatische Mutationen von WNK1 konnten zudem in Karzinomen der Mamma, der Lunge, des Colons und des Ovars nachgewiesen werden (Stephens et al. 2005; Sjöblom et al. 2006; Greenman et al. 2007). Auch wenn es sich

nach jetzigem Erkenntnisstand nicht um sogenannte Treibermutationen in diesen Tumoren handelt, könnten diese Mutationen zumindest eine additive Rolle in der Kanzerogenese spielen. Eine Kopienzahlvariation von WNK1 konnte außerdem in mehreren kolorektalen Adenokarzinomen nachgewiesen werden (Xie et al. 2012).

Das Gen WNK1 wurde aufgrund der Nähe zum Bruchpunkt und einer vermehrten Expression in der Microarrayanalyse zur weiteren Untersuchung mittels quantitativer Real-Time PCR ausgewählt. Es zeigt sich hierbei eine 1,97fach höhere Expression in der wachstumsfaktorunabhängigen Zelllinie gegenüber der NOS1-#4, das Ergebnis ist statistisch signifikant.

Die in etwa doppelt so starke Expression dieser Proteinkinase in der GM-CSF unabhängig wachsenden Mutante in Kombination mit der Nähe zu dem Bruchpunkt der 3q21 Translokation macht das WNK1-Gen zu einem interessanten Kandidaten für weiterführende Untersuchungen. Aufgrund der multiplen, bislang bekannten Möglichkeiten, mit denen WNK-Kinasen im Allgemeinen und WNK1 im Speziellen das Wachstum von Zellen beeinflussen können, ist eine spezifische Hypothese zum Beitrag zur Wachstumsfaktorunabhängigkeit schwierig. Da WNK1 an diversen proliferationsfördernden Signalwegen, wie z.B. dem des EGF-Rezeptors und des IGF1-Rezeptors, beteiligt ist, wäre eine vermehrte Stimulation dieser Signalkaskaden durch eine verstärkte Expression der WNK1-Kinase möglich. Diese Möglichkeit, in Kombination mit der vermuteten antiapoptischen Wirkung von WNK1 und der postulierten Möglichkeit einer WNK1-vermittelten besseren Adaptation von Tumorzellen auf schwierige Umgebungsbedingungen, erhärten weiter den Verdacht, dass diese Proteinkinase beim Überleben der Zellen, ohne den eigentlich benötigten Wachstumsfaktor GM-CSF, behilflich sein könnte.

Zur Klärung, ob WNK1 wesentlich zur Wachstumsfaktorunabhängigkeit beiträgt, sind weiterführende Experimente notwendig. Ein Ausschalten des Gens, z.B. mittels siRNA in den NOS1-FI Zellen und anschließendem Proliferationsversuch, könnte Aufschluss geben, ob eine Beteiligung des Gens besteht. Ein weiterer Ansatz könnte eine Induktion einer Überexpression in den NOS1-#4 Zellen, z.B. mittels lenti- oder retroviraler Transfektion, sein. Hierbei könnte getestet werden, ob eine vermehrte Expression des Gens einen proliferationsfördernden Effekt hat oder sogar zu einer Wachstumsfaktorunabhängigkeit führt.

### 5.3.5 GATA Binding Protein 2 (GATA2)

GATA2 ist ein auf Chromosom 3 an Position 3q21.3 gelegenes Gen. Es besteht aus 8 Exons und kodiert für ein aus 480 Aminosäuren bestehendes Protein aus der Familie der Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren mit einem Molekulargewicht von 51 kDa. Die Mitglieder der GATA-Familie der Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren regulieren die Genexpression in zahlreichen verschiedenen Organsystemen über die Erkennung der Basenpaarabfolge T/AGATAG/A in der Promoterregion der entsprechenden Zielgene (Orkin 2000). Die ersten drei Mitglieder der Genfamilie, GATA1, GATA2 und GATA3 werden überwiegend in hämatopoetischen Zellen exprimiert, eine starke GATA2 Expression wird hierbei vorwiegend in myeloischen Progenitorzellen, hämatopoetischen Stammzellen sowie in Mastzellen beobachtet, die Expression von GATA2 nimmt dabei mit zunehmender Ausreifung der Zellen ab (Tsai & Orkin 1997; Tsai et al. 1994; Rodrigues et al. 2008; Orlic et al. 1995). GATA2 spielt dabei eine essentielle Rolle in der Proliferation, Differenzierung sowie auch in der Apoptose hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen (Tsai et al. 1994; Tsai & Orkin 1997; Ling et al. 2004).

Wie aufgrund der wichtigen Funktion von GATA2 in der Entwicklung hämatopoetischer Zellen zu vermuten ist, führt eine gestörte GATA2-Funktion zu diversen Fehlfunktionen dieser Zellen, so z.B. können aktivierende Mutationen des Gens zur Blastenkrise einer CML führen (Zhang et al. 2008). Mutationen mit Verlust der GATA2 Funktion führen zu Syndromen mit gestörter Immundefunktion und erhöhtem Risiko eines myelodysplastischen Syndroms oder einer AML (Dickinson et al. 2011; Hahn et al. 2011; Hsu et al. 2011). Eine Überexpression von GATA2 wird zudem in einigen akuten myeloischen Leukämien nachgewiesen und ist in diesen Fällen mit einer schlechten Prognose und einem schlechten Ansprechen auf eine Chemotherapie assoziiert (Vicente et al. 2012). Neben der wichtigen Rolle in der Regulation hämatopoetischer Zellen scheint GATA2 auch eine Rolle in der Entwicklung von epithelialen malignen Tumoren zu spielen. So konnte eine Rolle von GATA2 in kleinzelligen Bronchialkarzinomen nachgewiesen werden, zudem wird eine Rolle bei besonders aggressiven und therapieresistenten Prostatakarzinomen diskutiert (Kumar et al. 2012; Chiang et al. 2014; Vidal et al. 2015).

Die Lage des GATA2-Gens in der unmittelbaren Nähe des Bruchpunktes von 3q21 Aberrationen, die wichtigen Funktionen des Gens in der Hämatopoese sowie eine nachgewiesene Überexpressionen in Leukämien haben dazu geführt, dass GATA2 als

mögliches 3q21 assoziiertes Onkogen diskutiert wird (Wieser et al. 2000). Es konnte eine Überexpression von GATA2 in zahlreichen Patienten mit 3q21-Aberrationen gezeigt werden, was die Hypothese einer Rolle von GATA2 im Zusammenhang mit diesen Translokationen stützt (Wieser et al. 2000; Lahortiga et al. 2004).

Das GATA2-Gen wurde aufgrund dieser Hypothesen zur Untersuchung mittels quantitativer Real-Time PCR ausgewählt, obwohl sich in der Bruchpunktanalyse (Prof. Kerstin Kutsche, Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf) zeigte, dass in der vorliegenden 3q21-Aberration das Gen nicht transloziert wurde. In den Microarraydaten zeigte sich eine geringere Expression in den NOS1-FI gegenüber den NOS1#4 Zellen. Dies konnte mittels quantitativer Real-Time PCR bestätigt werden, hier konnte eine 77fach geringere Menge an mRNA in der wachstumsfaktorunabhängigen Zelllinie gegenüber den GM-CSF abhängig wachsenden Zellen nachgewiesen werden. Die Messwerte zeigen jedoch eine erhebliche Streuung mit einer Standardabweichung von 54, das Ergebnis ist statistisch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

Der Fakt, dass GATA2 in den NOS1-FI Zellen nicht transloziert ist und die deutlich geringere Expression sprechen erheblich gegen eine Beteiligung des Gens an der Entstehung der Wachstumsfaktorunabhängigkeit. Wenn GATA2 mit 3q21-Translokationen in Verbindung gebracht wurde, dann immer im Rahmen einer Überexpression, ein Zusammenhang einer verminderten GATA2-Expression und 3q21-Aberrationen wurde bislang nicht gezeigt. Somit sind auch weiterführende Experimente in den NOS1-Zellen bezüglich dieses Gens nicht angezeigt.

### **5.3.6 Ribophorin 1 (RPN1)**

RPN1 ist ein auf Chromosom 3 an Position 3q21.3 gelegenes Gen. Es besteht aus 10 Exons und kodiert für ein aus 607 Aminosäuren aufgebautes Protein mit dem Namen Dolichyl-diphosphooligosaccharid-Protein glycosyltransferase subunit 1 (synonym: RPN1) und einem Molekulargewicht von 69 kDa. Das Protein ist ein klassisches Transmembranprotein des endoplasmatischen Retikulums und ein essentieller Bestandteil des N-oligosaccharyl transferase (OST) Komplex (Crimaudo et al. 1987; Kelleher et al. 1992). Es spielt eine wichtige Rolle in der Glykosylierung und der Modifikation von Proteinen im Rahmen des Ubiquitin-gesteuerten Proteinabbaus (Rosenzweig et al. 2012; Elsasser et al.



2002). Es wird stark und ubiquitär exprimiert und wurde aufgrund dessen z.B. als House-Keeping Gen bei der Analyse der Genexpression von Bronchialkarzinomen verwendet (Al. 2011).

In der Literatur wird das RPN1-Gen häufig im Rahmen von 3q21-Translokationen diskutiert. Bei einer reziproken 3q21q26 Translokation, welche zum sogenannten 3q21q26-Syndrom führt, kommt es zu einer Fusion von RPN1 mit dem EVI1-Gen oder zu einer Verlagerung von EVI1 in den Promoterbereich von RPN1, beides führt zu EVI1-Aktivierung (Shearer et al. 2010; Lee et al. 2010; Martinelli et al. 2003). Zudem wird in einem Fall einer chronischen idiopathischen Myelofibrose mit einer t(3;9)(q21;p24) Translokation eine vermehrte Aktivität von Jak2 infolge einer translokationsbedingten Verlagerung des Jak2-Gens in den Promoterbereich von RPN1 diskutiert (Mark et al. 2006). Insgesamt sind die Bruchpunkte von 3q21-Translokationen jedoch sehr heterogen, und die Rolle von RPN1 in dem komplexen Prozess der Leukämogenese ist bislang nicht sicher geklärt (Braekeleer et al. 2011).

Aufgrund der in der Literatur beschriebenen möglichen Funktion von RPN1 in 3q21-Aberrationen wurde das Gen zur Untersuchung mittels quantitativer Real-Time PCR ausgewählt, obwohl in den Microarraydaten keine signifikante Regulation der Genexpression zu erkennen war. Die ermittelte Expression von RPN1 ist in den NOS1-FI Zellen etwas geringer als in den NOS1#4 Zellen, mittels Real-Time PCR wurde eine um den Faktor 1,43 geringere Menge an RNA nachgewiesen. Das Ergebnis war jedoch statistisch nicht signifikant.

Das Ergebnis ist nicht überraschend, da eine Überexpression von RPN1 alleine bislang im Zusammenhang mit 3q21-Aberrationen auch nicht beschrieben worden ist. Lediglich eine vermehrte Expression von anderen Genen durch Fusion mit RPN1 oder durch Verlagerung in den stark aktiven RPN1-Promoter ist bekannt. Ob dies bei der in der NOS1-FI vorliegenden Translokation der Fall ist, lässt sich nicht sicher sagen, eine Rolle des RPN1-Promoters in der nachgewiesenen vermehrten Expression der oben bereits diskutierten Gene wäre theoretisch möglich.

## 5.4 Ausblick

Die Frage, wie es zur Wachstumsfaktorunabhängigkeit der NOS1-FI Zelllinie gekommen ist, und ob die 3q21-Translokation hierzu geführt oder beigetragen hat, konnte mit den bisherigen Ergebnissen nicht abschließend geklärt werden. Es sind jedoch zahlreiche Ansätze für weiterführende Experimente und Analysen entstanden.

In der Umgebung der 3q21-Translokation konnte eine Regulation mehrerer Gene gezeigt werden, wobei über die Funktion dieser Gene zum Teil noch sehr wenig bekannt ist. Ebenso konnten unabhängig von der Translokation drei Gene mit starker Regulation der Expression identifiziert werden.

Der nächste Schritt in der weiteren Analyse der Bedeutung der gefundenen Gene, wäre eine Bestätigung der veränderten Expression auf Proteinebene. Die Analyse mittels Westernblot wäre hierfür die Methode der Wahl. Sollten sich die quantitativen Veränderungen auf Proteinebene bestätigen, wäre zur Klärung der Bedeutung der Gene, eine aktive Veränderung der Genexpression in den NOS1-Zellen herbei zu führen. Dies könnte für hochregulierte Gene in der wachstumsfaktorunabhängigen Zelllinie, z.B. mittels siRNA, durchgeführt werden. Im Anschluss hierzu könnten die Effekte auf die Proliferation bzw. das Überleben der Zellen untersucht werden. Umgekehrt könnte eine vermehrte Expression dieser Gene in der wachstumsfaktorabhängigen Zelllinie induziert werden, dies könnte über einen retro- oder lentiviralen Vektor erfolgen. Nach anschließender induzierter Überexpression des Zielgens kann überprüft werden, ob dies zu einem GM-CSF-unabhängigen Wachstum der NOS1 Zelllinie führt, oder aber ob zumindest ein proliferationsfördernder Effekt zu belegen ist. Für das sehr stark regulierte und bislang wenig untersuchte CYTL1-Gen ist bereits eine Klonierung in einen retroviralen Vektor erfolgt, die Transduktion der NOS1 Zellen ist in Planung. Außerdem wäre eine Hemmung der Funktion der Proteine mittels Inhibitoren eine weitere Möglichkeit zu prüfen, ob diese eine entscheidende Funktion in der wachstumsfaktorunabhängigen Zelllinie haben. Dies ist für FLT3 bereits erfolgt, eine mögliche Hemmung mit Hilfe eines Kinaseinhibitors wäre jedoch auch für die Serin/Threonin-Kinase WNK1 möglich.

Ein weiterer Ansatzpunkt zur Klärung der Frage nach der Rolle der gefundenen Gene bei 3q21-Translokationen könnte eine Analyse der Genexpression in weiteren Leukämiezellen mit solchen Aberrationen sein, hierzu kämen sowohl Zelllinien als auch direkt aus Patienten gewonnene Leukämiezellen in Frage.

Aufgrund des in den Verdünnungsreihen zu erkennenden positiven Effekts des Überstandes der NOS1-FI Zelllinie auf die NOS1 Zellen nach GM-CSF Entzug sollte zudem über eine weitere Untersuchung des Überstandes auf sezernierte Zytokine oder Zytokin-ähnliche Stoffe erfolgen.

## 6. Zusammenfassung

### 6.1 Zusammenfassung

Chromosomale Aberrationen spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung von malignen Erkrankungen und sind häufig ein besonders wichtiges Ereignis in der Entstehung von Leukämien. Chromosomale Veränderungen, welche speziell die Bruchpunktregion 21 auf dem langen Arm des Chromosom 3 (3q21) betreffen, sind hierbei kein seltenes Phänomen, insgesamt sind mehr als 1000 Fälle bösartiger Erkrankungen mit Assoziation zu diesem Bruchpunkt bekannt. Ein Großteil dieser Erkrankungen sind akute Leukämien, wobei 3q21-Translokationen mit einer schlechten Prognose assoziiert sind. Die wachstumsfaktorunabhängige Zelllinie NOS1-FI, welche aus der GM-CSF abhängig wachsenden AML-Zelllinie NOS1 etabliert wurde und eine 3q21-Translokation aufweist, wurde als Modellsystem für die Untersuchung der Auswirkung der Translokation verwendet.

In dieser Arbeit erfolgte eine vergleichende Untersuchung der Genexpression beider Zelllinien, wobei mehrere signifikant regulierte Gene im Bereich des Bruchpunkts identifiziert wurden. Diese Gene sind TMCC1 und KIAA1257 auf Chromosom 3 sowie NINJ2 und WNK1 auf Chromosom 12. Über die Funktion dieser Gene, insbesondere in Hinsicht auf mögliche proliferationsfördernde Eigenschaften, ist bislang wenig bekannt. Ihre Bedeutung hinsichtlich einer möglichen Rolle bei der Entstehung der Wachstumsfaktorunabhängigkeit bedarf weiterer Untersuchungen.

Des Weiteren wurde untersucht, ob in der faktorunabhängigen Mutante NOS1-FI die Gene GATA2 und RPN1 eine Regulation der Expression zeigen. Diese beiden Gene wurden mehrfach im Zusammenhang mit 3q21-Aberrationen diskutiert. Beide Gene wiesen eine geringere Expression in der faktorunabhängigen Zelllinie auf, wobei beide Ergebnisse nicht statistisch signifikant waren.

Unabhängig von der 3q21-Translokation wurden außerdem Gene untersucht, welche aufgrund ihrer bekannten proliferationsfördernden Eigenschaften bzw. wegen möglicher zytokinartiger Eigenschaften einen Einfluss auf die Wachstumsfaktorunabhängigkeit der NOS1-FI-Zellen haben könnten. Hierbei wurde für die Gene FLT3, AFF3 und CYTL1 eine starke Hochregulation ihrer Expression in der faktorunabhängigen Zelllinie nachgewiesen.

Eine wichtige Rolle des FLT3-Proteins für das Wachstum der NOS1-FI Zellen konnte mittels eines Proliferationsversuches unter Zugabe eines FLT3-Inhibitors weitgehend ausgeschlossen werden. Unter Berücksichtigung der Datenlage zu den Funktionen von AFF3 ist eine Rolle dieses Gens bei der Entstehung der Wachstumsfaktorunabhängigkeit nicht zu belegen und muss daher in weiteren Experimenten untersucht werden. Aufgrund der äußerst starken Überexpression in den NOS1-FI-Zellen und der postulierten, jedoch bislang nicht bewiesenen, zytokinartigen Eigenschaften von CYTL1, ist dieses Gen der interessanteste Kandidat für eine mögliche Beteiligung am wachstumsfaktorunabhängigen Wachstum der NOS1-FI-Zellen. Weiterführende Untersuchungen mittels retroviraler Überexpression des Gens in den NOS1-Zellen, und ein Knockdown des CYTL1-Gens mittels siRNA in den NOS1-FI-Zellen sollten Aufschluss über die Funktion von CYTL1 für das wachstumsfaktorunabhängige Wachstum ergeben. Transgene Mausmodelle könnten zeigen, ob die Expression von CYTL1 in hämatopoetischen Stammzellen zur Leukämieentstehung *in vivo* beitragen kann.

## 6.1 Abstract

Chromosomal aberrations are a key factor in the development of malignancies and are an important event in the emergency of leukemogenesis. Chromosomal abnormalities which involve the break point region 21 on the long arm of chromosome 3 (3q21) are thereby not a rare occurrence. In total there are more than 1,000 reported cases of malignant diseases which are associated to this chromosomal region. The majority of these cases are acute leukaemia where this particular chromosomal aberration goes along with a poor prognosis. The growth factor independent cell line NOS1-FI was established out of the GM-CSF dependent cell line NOS1. Moreover, NOS1-FI shows a 3q21 translocation, which was used as a model system for research on the effects of this specific chromosomal aberration.

The thesis is focussing on a comparative analysis of gene expressions, which was performed on both cell lines. Thereby several regulated genes which were showing significant regulation were found. Those genes are TMCC1 and KIAA1257 on chromosome 3 and NINJ2 as well as WNK1 on chromosome 12. So far there is little known about the function and impact in cellular proliferation of the mentioned genes. Thus, more research is required to evaluate whether they are critical for the development of growth factor independence.

Furthermore, it had been investigated whether the genes GATA2 and RPN1 have shown a regulation of expression in the NOS1-FI compared to the NOS1 cells. The role of the genes in the 3q21 translocation has been discussed several times in scientific literature. The analysis showed a slight decrease of expression in the NOS1-FI. However, these findings have not been statistically significant.

Regardless of the 3q21 translocation, it was investigated if there were other genes that have the ability to enhance cell proliferation or have cytokine like characteristics and which are significantly regulated in their expression. Therefore, those genes would have the ability to induce factor independent growth. The genes FLT3, AFF3 and CYTL1 have been identified and were showing a strong and significantly higher expression in the factor independent cell line NOS1-FI.

Since the FLT3-inhibitor was not showing a significant effect, a major role of FLT3 for the proliferation of the NOS1-FI could be widely excluded. In regards to the known data situation on AFF3, it could not yet be verified whether the gene takes an important part in the growth factor independent proliferation. Therefore, further research needs to take place. Due to the strong overexpression of CYTL1 and its postulated cytokine like abilities this gene is considered to be the most interesting candidate in the process of growth factor independence in the NOS1-FI cells. Additional information on the role of CYTL1 in growth factor independence could be generated by retroviral overexpression of the gene in the original NOS1 cells or a knockdown of the expression using siRNA in the NOS1-FI cells. Moreover, transgenic mouse models could show whether the expression of CYTL1 can induce or contribute to leukemogenesis in vivo.

## 7. Literaturverzeichnis

- Abu-Duhier, F.M. et al., 2001. Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*, 113(4), pp.983–988.
- Al., K.G. et, 2011. Novel reference gene RPN1 for normalization of quantitative data in lung and kidney cancer. *Journal of Molecular Biology*, 45(2), pp.238–48.
- Araki, T. & Milbrandt, J., 2000. Ninjurin2, a novel homophilic adhesion molecule, is expressed in mature sensory and enteric neurons and promotes neurite outgrowth. *The Journal of neuroscience*, 20(1), pp.187–195.
- Barjesteh Waalwijk, V. et al., 2003. Low expression of MDS1-EV11-like-1 (MEL1) and EV11-like-1 (EL1) genes in favorable-risk acute myeloid leukemia. *Experimental Hematology*, 31(11), pp.1066–1072.
- Begley, L. a. et al., 2008. The inflammatory microenvironment of the aging prostate facilitates cellular proliferation and hypertrophy. *Cytokine*, 43(2), pp.194–199.
- Bendall, A., Kortlepel & Gottlieb, K., 1994. Bone marrow adherent layers inhibit apoptosis of acute myeloid leukemia cells. *Experimental hematology*, 22(13), pp.1252–1260.  
Available at:  
[http://sfx.gbv.de/sfx\\_subhh?sid=Entrez%3APubMed&id=pmid%3A7957711](http://sfx.gbv.de/sfx_subhh?sid=Entrez%3APubMed&id=pmid%3A7957711).
- Bennett, J.M. et al., 1976. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *British Journal of Haematology*, 33(451-458).
- Bennett, J.M. et al., 1985. Proposed Revised Criteria for the Classification of Acute Myeloid Leukemia A Report of the French-American-British Cooperative Group. *Annals of Internal Medicine*, 103(4), pp.620–625. Available at: <http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-103-4-620>.
- Von Bergh, a. R.M. et al., 2002. LAF4, an AF4-related gene, is fused to MLL in infant acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes and Cancer*, 35(1), pp.92–96.
- Bis, J.C. et al., 2014. Associations of NINJ2 sequence variants with incident ischemic stroke in the Cohorts for Heart and Aging in Genomic Epidemiology (CHARGE) consortium. *PLoS ONE*, 9(6).
- Boveri, T., 1914. *Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren*,
- Braekeleer, E.D.E. et al., 2011. Conventional Cytogenetics and Breakpoint Distribution by Fluorescent In Situ Hybridization in Patients with Malignant Hemopathies Associated with inv ( 3 )( q21 ; q26 ) and t ( 3 ; 3 )( q21 ; q26 ). *Anticancer Research*, 3448, pp.3441–3448.
- Büchner et al., 2010. Leitlinie AML. Available at:  
<https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-myeloische-leukaemie-aml/@@view/html/index.html> [Accessed September 20, 2015].
- Bundes, G., 2012. *Krebs in Deutschland Krebs in Deutschland*, Available at:

[http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/KID2012.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/KID2012.pdf?__blob=publicationFile).

- Burnett, A.K. et al., 2012. Addition of Gemtuzumab Ozogamicin to Induction Chemotherapy Improves Survival in Older Patients With Acute Myeloid Leukemia. , pp.1–9.
- Carow, C.E. et al., 1996. Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias. *Blood*, 87(3), pp.1089–1096.
- Caspersson, T., Lindsten, J. & Zech, L., 1970. The QM-fluorescence pattern was ana-. *Exptl cell research*, (1965), pp.240–243.
- Chalandon, Y. et al., 2004. Growth autonomy and lineage switching in BCR-ABL-transduced human cord blood cells depend on different functional domains of BCR-ABL. *Leukemia*, 18(5), pp.1006–1012.
- Chang, J.M. et al., 1989. Nonneoplastic hematopoietic myeloproliferative syndrome induced by dysregulated multi-CSF (IL-3) expression. *Blood*, 73(6), pp.1487–1497. Available at: <http://www.bloodjournal.org/content/73/6/1487.abstract>.
- Chao, C. et al., 2011. C17 prevents inflammatory arthritis and associated joint destruction in mice. *PLoS ONE*, 6(7).
- Chiang, Y.T. et al., 2014. GATA2 as a potential metastasis-driving gene in prostate cancer. *Oncotarget*, 5(2), pp.451–61. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3964220&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Crimaudo, C. et al., 1987. Human ribophorins I and II: the primary structure and membrane topology of two highly conserved rough endoplasmic reticulum-specific glycoproteins. *The EMBO journal*, 6(1), pp.75–82.
- Daley, G.Q. & Baltimore, D., 1988. Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210bcr/abl protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(23), pp.9312–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=282729&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Dhillon, a S. et al., 2007. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*, 26(22), pp.3279–3290.
- Dickinson, R.E. et al., 2011. Exome sequencing identifies GATA-2 mutation as the cause of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *Blood*, 118(10), pp.2656–2658.
- Ding, H. et al., 2011. No evidence for association of 12p13 SNPs rs11833579 and rs12425791 within NINJ2 gene with ischemic stroke in Chinese Han population. *2015*, 216(2), pp.381–382. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.02.005>.
- Döhner, H. et al., 2010. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, 115(3), pp.453–474. Available at:



<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/115/3/453.short>.

- Elsasser, S. et al., 2002. Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains. *Nat Cell Biol.*, 4(9), pp.725–730.
- Fernandez, H.F. et al., 2009. Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, 361(13), pp.1249–1259.
- Fialkow, P.J. et al., 1987. Clonal Development, Stem-Cell Differentiation, and Clinical Remissions in Acute Nonlymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 317(8), pp.468–473. Available at: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM198708203170802>.
- Fröhling, S. et al., 2002. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: A study of the AML study group Ulm. *Blood*, 100(13), pp.4372–4380.
- Futreal, P.A. et al., 2004. A census of human cancer genes. *Nature reviews. Cancer*, 4(3), pp.177–183.
- Gary Gilliland, D. & Griffin, J.D., 2002. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*, 100(5), pp.1532–1542.
- Gasparini, P., Sozzi, G. & Pierotti, M. a., 2007. The role of chromosomal alterations in human cancer development. *Journal of Cellular Biochemistry*, 102(2), pp.320–331.
- Greenman, C. et al., 2007. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*, 446(7132), pp.153–158.
- Griffith, J. et al., 2004. The Structural Basis for Autoinhibition of FLT3 by the Juxtamembrane Domain. *Molecular Cell*, 13(2), pp.169–178.
- Hahn, C.N. et al., 2011. Heritable GATA2 mutations associated with familial myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Journal of Haematologic Oncology*, 43(10), pp.1012–1017.
- Hannemann, J. et al., 1995. Sequential mutations in the interleukin-3 (IL3)/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/IL5 receptor beta-subunit genes are necessary for the complete conversion to growth autonomy mediated by a truncated beta C subunit. *Molecular and cellular biology*, 15(5), pp.2402–2412.
- Hansson, M. & Söderström, T., 1993. The colony stimulating factors. *Medical oncology and tumor pharmacotherapy*, 10(1-2), pp.5–12.
- Hiwatari, M. et al., 2003. Fusion of an AF4-related gene, LAF4, to MLL in childhood acute lymphoblastic leukemia with t(2;11)(q11;q23). *Oncogene*, 22(18), pp.2851–2855.
- Holley, R.W., 1975. Control of growth of mammalian cells in cell culture. *Nature*, 258(5535), pp.487–490. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/258487a0>.
- Hsu, A.P. et al., 2011. Mutations in GATA2 are associated with the autosomal dominant and sporadic monocytopenia and mycobacterial infection (MonoMAC) syndrome. *Blood*, 118(10), pp.2653–2655.

- Jeon, J. et al., 2011. Cytokine-like 1 knock-out mice (Cyt11  $-/-$ ) show normal cartilage and bone development but exhibit augmented osteoarthritic cartilage destruction. *Journal of Biological Chemistry*, 286(31), pp.27206–27213.
- Jiang, Z.Y. et al., 2005. Identification of WNK1 as a substrate of Akt/protein kinase B and a negative regulator of insulin-stimulated mitogenesis in 3T3-L1 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(22), pp.21622–21628.
- JW, V., Thiele J, A. Da & Al., E., 2009. The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 114(5), pp.937–952. Available at: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/114/5/937.full.pdf>.
- Kelleher, D.J., Kreibich, G. & Gilmore, R., 1992. Oligosaccharyltransferase activity is associated with a protein complex composed of ribophorins I and II and a 48 kd protein. *Cell*, 69(1), pp.55–65.
- Kelly, L., Liu, Q. & Kutok, J., 2002. Internal Tandem Duplication Mutations Associated With Human Acute Myeloid Leukemias Induce Myeloproliferative Disease in a Murine Bone Marrow Transplant Model. *Blood*, 3(3), pp.181–189. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21459884> \n <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/99/1/310.short>.
- Kim, D.-E. et al., 2012. NINJ2 SNP may affect the onset age of first-ever ischemic stroke without increasing silent cerebrovascular lesions. *BMC Research Notes*, 5(1), p.155. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/5/155>.
- Kim, J.S., Zae, Y.R. & Chun, J.S., 2007. Cytokine-like 1 (CYTL1) regulates the chondrogenesis of mesenchymal cells. *Journal of Biological Chemistry*, 282(40), pp.29359–29367.
- Kiyoi, H., 2015. Flt3 Inhibitors: Recent Advances and Problems for Clinical Application. *Nagoya Journal of Medical Science*, pp.7–17. Available at: [http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medlib/nagoya\\_j\\_med\\_sci/7712/02\\_Kiyoi.pdf](http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medlib/nagoya_j_med_sci/7712/02_Kiyoi.pdf).
- Kiyoi, H. et al., 1998. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia*, 12(9), pp.1333–1337.
- Kiyoi, H. et al., 2002. Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain. *Oncogene*, 21(16), pp.2555–2563.
- Konopka, J.B., Watanabe, S.M. & Witte, O.N., 1984. An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell*, 37(3), pp.1035–1042.
- Kottaridis, P.D. et al., 2015. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic patients from the United Kingdom Medical Research Council. , 98(6), pp.1752–1760.
- Kumar, M.S. et al., 2012. The GATA2 transcriptional network is requisite for RAS oncogene-driven non-small cell lung cancer. *Cell*, 149(3), pp.642–655.

- Kurzrock, R. et al., 2003. Review Philadelphia Chromosome – Positive Leukemias : From Basic Mechanisms to Molecular Therapeutics. *Ann Intern Med*, 138(10), pp.819–31.
- Kwon, Y.-J. et al., 2012. Genome-Wide Analysis of DNA Methylation and the Gene Expression Change in Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 7(1), pp.20–33.
- Lahortiga, I. et al., 2004. Molecular heterogeneity in AML/MDS patients with 3q21q26 rearrangements. *Genes Chromosomes and Cancer*, 40(3), pp.179–189.
- Laker, C. et al., 1987. Autocrine stimulation after transfer of the granulocyte/macrophage colony-stimulating factor gene and autonomous growth are distinct but interdependent steps in the oncogenic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(23), pp.8458–8462.
- Lang, R.A. et al., 1985. Expression of a hemopoietic growth factor cDNA in a factor-dependent cell line results in autonomous growth and tumorigenicity. *Cell*, 43(2 Pt 1), pp.531–542.
- Lee, S.A. et al., 2010. A Case of t(3;3)(q21;q26.2) associated with severe multilineage dysplasia and multi-drug resistance in blastic crisis of chronic myelogenous leukemia. *Korean Journal of Laboratory Medicine*, 30(6), pp.595–599.
- Li, W. et al., 2012. Heterozygote Genotypes at rs2222823 and rs2811712 SNP Loci are Associated with Cerebral Small Vessel Disease in Han Chinese Population. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 18(7), pp.558–565.
- Ling, K.-W. et al., 2004. GATA-2 plays two functionally distinct roles during the ontogeny of hematopoietic stem cells. *The Journal of experimental medicine*, 200(7), pp.871–882.
- Liu, X. et al., 2000. Molecular cloning and chromosomal mapping of a candidate cytokine gene selectively expressed in human CD34+ cells. *Genomics*, 65(3), pp.283–292.
- Lugo, T.G., Pendergast, A. & Muller, A.J., 1989. Tyrosine Kinase Activity and Transformation. *International Journal of Oncology*, 12(October), pp.1269–1345.
- Ma, C. & Staudt, L.M., 1996. LAF-4 encodes a lymphoid nuclear protein with transactivation potential that is homologous to AF-4, the gene fused to MLL in t(4;11) leukemias. *Blood*, 87(2), pp.734–745.
- Mackarechtschian, K. et al., 1995. Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity*, 3(1), pp.147–161.
- Mackintosh, N.A. & Investigations, D., 1945. The natural history. , (1904).
- Mark, H.F.L. et al., 2006. Chronic idiopathic myelofibrosis (CIMF) resulting from a unique 3;9 translocation disrupting the janus kinase 2 (JAK2) gene. *Experimental and Molecular Pathology*, 81(3), pp.217–223.
- Martinelli, G. et al., 2003. Association of 3q21q26 syndrome with different RPN1/EVI1 fusion transcripts. *Haematologica*, 88(11), pp.1221–1228.

- McCormack, M.P. & Gonda, T.J., 1997. Expression of Activated Mutants of the Human Interleukin-3/Interleukin-5/Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor Common  $\beta$  Subunit in Primary Hematopoietic Cells Induces Factor-Independent Proliferation and Differentiation. *Blood*, 90(4), pp.1471–1481. Available at: <http://www.bloodjournal.org/content/90/4/1471.abstract>.
- McCormick, J. a & Ellison, D.H., 2011. The WNKs: atypical protein kinases with pleiotropic actions. *Physiological reviews*, 91(1), pp.177–219.
- McCulloch, E.A., 1979. Abnormal Myelopoietic Cloes in Man. *Bulletin of the Medical Library Association*, 49(3), p.466.
- Metcalf, D., 1988. The Molecular Control of Blood Cells. *The MoleculCambridge, MA: Harvard UP, 1988. Print.ar Control of Blood Cells*.
- Michielse, C.B. et al., 2006. Refinement of the locus for hereditary congenital facial palsy on chromosome 3q21 in two unrelated families and screening of positional candidate genes. *European journal of human genetics*, 14(12), pp.1306–1312.
- Mitelman, F., Johansson, B. & Mertens, F., 2013. Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer.
- Mitelman, F., Johansson, B. & Mertens, F., 2015. Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer. Available at: <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>.
- Mitelman, F., Johansson, B. & Mertens, F., 2007. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nature reviews. Cancer*, 7(4), pp.233–245.
- Moniz, S. & Jordan, P., 2010. Emerging roles for WNK kinases in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(8), pp.1265–1276.
- Moore, J.M. et al., 2014. Laf4/Aff3, a Gene Involved in Intellectual Disability, Is Required for Cellular Migration in the Mouse Cerebral Cortex. *PLoS ONE*, 9(8), p.e105933. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0105933>.
- Mrózek, K., Heerema, N. a. & Bloomfield, C.D., 2004. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Reviews*, 18(2), pp.115–136.
- Nagase, T. et al., 1998. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XI. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA research*, 5(5), pp.277–286.
- National Center for Biotechnology Information, U.S.N.L. of M., 2015a. Entrez Gene: ABL1 ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/25> [Accessed September 21, 2015].
- National Center for Biotechnology Information, U.S.N.L. of M., 2015b. Entrez Gene: Breakpoin Cluster Region. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/613> [Accessed September 22, 2015].
- Ng, M.H.J. et al., 2010. Activation of Ras-dependent Elk-1 activity by MLL-AF4 family fusion oncoproteins. *Experimental Hematology*, 38(6), pp.481–488. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exphem.2010.03.014>.

- Nowell, P.C. & Hungerford, D.A., 1960. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*, (132), p.1497.
- Nowell, P.C. & Hungerford, D.A., 1960. Chromosome Studies on Normal and Leukemic Human Leukocytes. *Journal of the National Cancer Institute*, 25(1), pp.85–109.
- Orkin, S.H., 2000. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nature Reviews Genetics*, 1(1), pp.57–64.
- Orlic, D. et al., 1995. Pluripotent hematopoietic stem cells contain high levels of mRNA for c-kit, GATA-2, p45 NF-E2, and c-myb and low levels or no mRNA for c-fms and the receptors for granulocyte colony-stimulating factor and interleukins 5 and 7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(10), pp.4601–4605.
- Ozeki, K. et al., 2008. Biologic and clinical significance of the FLT3 transcript level in acute myeloid leukemia. *Blood*, 103(5), pp.1901–1908.
- Pfeifer, D. et al., 1999. Campomelic dysplasia translocation breakpoints are scattered over 1 Mb proximal to SOX9: evidence for an extended control region. *American journal of human genetics*, 65(1), pp.111–124.
- Prassolov, V., Meyer, J. & Brandenburg, G., 2001. Functional identification of secondary mutations inducing autonomous growth in synergy with a truncated interleukin-3 receptor: Implications for multi-step oncogenesis. *Experimental Hematology*, 29(6), pp.756–765.
- Ravandi, F. et al., 2010. Outcome of patients with FLT3-mutated acute myeloid leukemia in first relapse. *Leukemia Research*, 34(6), pp.752–756. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2009.10.001>.
- Rodrigues, N.P. et al., 2008. GATA-2 regulates granulocyte-macrophage progenitor cell function. *Blood*, 112(13), pp.4862–4873.
- Rosenzweig, R. et al., 2012. Rpn1 and Rpn2 coordinate ubiquitin processing factors at proteasome. *Journal of Biological Chemistry*, 287(18), pp.14659–14671.
- Rosnet O, Mattei MG, Marchetto S, B.D., 1991. Isolation and Chromosomal Localization of a Novel FMS-like Tyrosine Kinase Gene. *Genomics*, 385(2), pp.380–385.
- Sakai, N. et al., 2008. Identification of NR5A1 (SF-1/AD4BP) gene expression modulators by large-scale gain and loss of function studies. *Journal of Endocrinology*, 198(3), pp.489–497.
- Santos, F.P.S. et al., 2011. Prognostic value of FLT3 mutations among different cytogenetic subgroups in acute myeloid leukemia. *Cancer*, 117(10), pp.2145–2155.
- Schnittger, S. et al., 2002. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: Correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood*, 100(1), pp.59–66.

- Schrader, J.W. & Crapper, R.M., 1983. Autogenous -production of a hemopoietic growth factor, persisting cell-stimulating factor, as a mechanism for transformation of bone marrow-derived cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(November), pp.6892–6896.
- Sekeres, M.A. et al., 2009. Time from diagnosis to treatment initiation predicts survival in younger, but not older, acute myeloid leukemia patients. *Survival*, 113(1), pp.28–36.
- Serysheva, E. et al., 2013. Wnk kinases are positive regulators of canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signalling. *EMBO Reports*, 14(8), pp.718–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23797875>.
- Sewastianik, T. et al., 2014. MYC deregulation in lymphoid tumors: molecular mechanisms, clinical consequences and therapeutic implications. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1846(2), pp.457–467. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304419X14000808>.
- Shearer, B.M. et al., 2010. Development of a dual-color, double fusion FISH assay to detect RPN1/EVI1 gene fusion associated with inv(3), t(3;3), and ins(3;3) in patients with myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *American Journal of Hematology*, 85(8), pp.569–574.
- Shekarabi, M. et al., 2008. Mutations in the nervous system-specific HSN2 exon of WNK1 cause hereditary sensory neuropathy type II. *Journal of Clinical Investigation*, 118(7), pp.2496–2505.
- Sjöblom, T. et al., 2006. The Consensus Coding Sequences of Human Breast and Colorectal Cancers. *Science*, 314(October), pp.268–274.
- Small, D. et al., 1994. STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(2), pp.459–463.
- Stam, K. et al., 1985. Evidence of a New Chimeric bcr/c-abl mRNA in Patients with Chronic Myelocytic Leukemia and the Philadelphia Chromosome. *New England Journal of Medicine*, 313(23), pp.1429–1433.
- Steelman et al., 1996. Oncogenic effects of overexpression of the interleukin-3 receptor on hematopoietic cells. *Leukemia*, 10(3), pp.528–542. Available at: [http://sfx.gbv.de/sfx\\_subhh?sid=Entrez%3APubMed&id=pmid%3A8642872](http://sfx.gbv.de/sfx_subhh?sid=Entrez%3APubMed&id=pmid%3A8642872).
- Stephens, P. et al., 2005. A screen of the complete protein kinase gene family identifies diverse patterns of somatic mutations in human breast cancer. *Nature Genetics*, 37(6), pp.590–592.
- Stocking, C. et al., 1993. Distinct classes of factor-independent mutants can be isolated after retroviral mutagenesis of a human myeloid stem cell line. *Growth Factors*, 8(3), pp.197–209. Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8391284](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8391284).

- Stocking, C. et al., 1988. Identification of genes involved in growth autonomy of hematopoietic cells by analysis of factor-independent mutants. *Cell*, 53(6), pp.869–879.
- Thiede, C. et al., 2001. Analysis of FLT3-activating mutations in 713 patients with acute myelogenous leukemia (AML): High prevalence in FAB-subtype M5 and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*, 98(11, Part 1), p.2994.
- To, M.D. et al., 2005. LAF-4 is aberrantly expressed in human breast cancer. *International Journal of Cancer*, 115(4), pp.568–574.
- Tomczak, A. & Teresa Pisabarro, M., 2011. Identification of CCR2-binding features in Cyt11 by a CCL2-like chemokine model. *Proteins*, 79(4), pp.1277–1292.
- Tsai, F.Y. et al., 1994. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature*, 371(6494), pp.221–226.
- Tsai, F.Y. & Orkin, S.H., 1997. Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood*, 89(10), pp.3636–3643.
- Vardiman, J.W., Harris, N.L. & Brunning, R.D., 2002. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*, 100(7), pp.2292–2302.
- Vicente, C. et al., 2012. Overexpression of GATA2 predicts an adverse prognosis for patients with acute myeloid leukemia and it is associated with distinct molecular abnormalities. *Leukemia*, 26(3), pp.550–554.
- Vidal, S.J. et al., 2015. A Targetable GATA2-IGF2 Axis Confers Aggressiveness in Lethal Prostate Cancer. *Cancer Cell*, 27(2), pp.223–239. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610814004644>.
- Wang, L. et al., 2014. Association between 12p13 SNP rs11833579 and ischemic stroke in Asian population: An updated meta-analysis. *Journal of the Neurological Sciences*, 345(1-2), pp.198–201. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022510X14004936>.
- Weisberg, E. et al., 2009. FLT3 inhibition and mechanisms of drug resistance in mutant FLT3-positive AML. *Drug Resistance Updates*, 12(3), pp.81–89.
- Wen, M. et al., 2012. Cytokine-like 1 is involved in the growth and metastasis of neuroblastoma cells. *International Journal of Oncology*, 41(4), pp.1419–1424.
- Wieser, R. et al., 2000. Transcription factor GATA-2 gene is located near 3q21 breakpoints in myeloid leukemia. *Biochemical and biophysical research communications*, 273(1), pp.239–245.
- Wilson, F. et al., 2001. Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science*, 293(August), pp.1107–1113. Available at: <http://discovery.ucl.ac.uk/8592/>.
- Xie, T. et al., 2012. A comprehensive characterization of genome-wide copy number aberrations in colorectal cancer reveals novel oncogenes and patterns of alterations. *PLoS ONE*, 7(7), pp.1–9.

- Xu, B. et al., 2000. WNK1, a novel mammalian serine/threonine protein kinase lacking the catalytic lysine in subdomain II. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(22), pp.16795–16801.
- Xu, B.E. et al., 2004. WNK1 Activates ERK5 by an MEKK2/3-dependent Mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 279(9), pp.7826–7831.
- Yamamoto, Y. et al., 2001. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*, 97(8), pp.2434–2439.
- Yoneyama, S. et al., 2014. Gene-centric meta-analyses for central adiposity traits in up to 57 412 individuals of european descent confirm known loci and reveal several novel associations. *Human Molecular Genetics*, 23(9), pp.2498–2510.
- Young, D.C. & Griffin, J.D., 1986. Autocrine secretion of GM-CSF in acute myeloblastic leukemia. *Blood*, 68(5), pp.1178–1181. Available at: <http://www.bloodjournal.org/content/68/5/1178.abstract>.
- Zhang, C. et al., 2014. Transmembrane and coiled-coil domain family 1 is a novel protein of the endoplasmic reticulum. *PLoS ONE*, 9(1).
- Zhang, S.-J. et al., 2008. Gain-of-function mutation of GATA-2 in acute myeloid transformation of chronic myeloid leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(6), pp.2076–2081.
- Zheng, R. et al., 2004. FLT3 ligand causes autocrine signaling in acute myeloid leukemia cells. *Blood*, 103(1), pp.267–274.



## 8. Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

ABL1	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
aCGH	Array Comparative genomic hybridization
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
ATP	Adenosintri-phosphat
BCR	Breakpoint cluster region
Bis	Bisacrylamid (N,N'-methylen-bisacrylamid)
bp	Basenpaare
cDNA	complementary Deoxyribonucleic acid
CLL	Chronische Lymphatische Leukämie
CML	Chronische Myeloische Leukämie
CSF	Kolonie-stimulierender Faktor
CTP	Cytosintri-phosphat
CYTL1	Cytokine like 1
ddH <sub>2</sub> O	doppelt deionisiertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbeccos Minimalmedium (Dulbeccos minimal essential medium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
EtOH	Ethanol
FAB	French-American-British
FCS	Fötales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration

FISH	Fluorescence in situ hybridization
Flt3	Fsm like tyrosin kinase 3
g	Erdbeschleunigung
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GATA2	GATA binding protein 2
GM-CSF	Granulocyten/Makrophagen-Kolonien-stimulierender Faktor
GTP	Guanosintriphosphat
H1FX	H1 Histone Family, Member X
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IL	Interleukin
IRES	Internal ribosomal entry site
ITD	Internal tandem duplication
Jak2	Janus Kinase 2
Kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
M	Molar
M-CSF	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
MAP	Mitogen-Activated Protein
MeOH	Methanol
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MPS	Myeloproliferatives Syndrom
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
Myc	V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog
Na-Ac	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NINJ2	Ninjurin 2
NP40	Nonylphenylpolyethylenglykol

NR5A1	Nuclear Receptor Subfamily 5, Group A, Member 1
OMF	Osteomyelofibrose
OST	N-oligosaccharyl transferase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PCV	Polycythaemia vera
PI3	Phosphoinositid-3
PMSF	Phenylmethansulfonyl fluorid
PRE	Posttranskriptionelles regulatorisches Element
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute-Kulturmedium
RPN1	Ribophorin I
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
siRNA	Small interfering RNA
SLC6A13	Solute Carrier Family 6 (Neurotransmitter Transporter), Member 13
SNP	Single Nucleotide P olymorphism
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-buffered saline
TCA	Trichloressigsäure (trichlor acid)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMCC1	Transmembrane And Coiled-Coil Domain Family 1
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
U	Einheit (unit)
UV	Ultraviolett
WNK1	WNK lysine deficient protein kinase 1
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromolar

## 8.2 Danksagung

Ich möchte mich vor allem bei Prof. Dr. M. Jücker für die Anleitung und Betreuung der Arbeit sowie seine große Geduld bedanken. Prof. Dr. G. W. Mayr möchte ich für die Möglichkeit danken, meine Arbeit am Institut für Biochemie und Signaltransduktion durchführen zu können. Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Lizet Garcia-Palma für ihre herzliche Betreuung und die kompetente Einarbeitung in die Methodik bedanken. Ein großer Dank gebührt auch der gesamten Arbeitsgruppe für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und dafür, dass mir jeder in der Gruppe mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Ferner möchte ich mich bei Dr. Stefan Horn für die Etablierung der Zelllinie NOS-1 bedanken. Frau Prof. Kerstin Kutsche aus dem Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf gebührt mein Dank für die Chromosomenanalyse. Ein großer Dank gebührt Dr. Streichert aus dem Institut für Klinische Chemie, UKE für die Bereitstellung der Expressionsanalyse mittels Microarray. Frau Dr. Carol Stocking, Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie, danke ich für die Bereitstellung des Retroviralen Vektors.

Ein besonderer Dank geht an meine Mutter Renate Brauroth, an meinen Stiefvater Reiner Brauroth, und an meinen Vater Horst Gelbert. Sie haben mir ein sorgenfreies Studium ermöglicht und standen mir in jeder Lebenslage zur Seite.

## 8.3 Lebenslauf

### PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum: 16.09.1980  
Geburtsort: Bad Hersfeld  
Eltern: Renate Brauroth, Kfm. Angestellte  
Horst Gelbert, Rentner

### AUSBILDUNGSDATEN

1987 - 1991 Grundschole Heringen/Werra  
1991 - 1993 Gesamtschole Heringen  
1993 - 1998 Gesamtschole Schenklengsfeld, Gymnasialzweig  
1998 - 1999 Wichita High School East, USA  
1999 - 2002 Modellschole Obersberg, Leistungskurse Englisch und Chemie  
2002 Allgemeine Hochschulreife  
08/2002 - 05/2003 Zivildienst am Institut für Pathologie des Klinikums Kassel  
10/2003 Beginn des Studiums der Humanmedizin, Universität Hamburg  
10/2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
12/2009 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung / Approbation  
02/2010 – 09/2015 Assistenzarzt am MVZ Hanse Histologicum Hamburg/Institut für Hämatopathologie Hamburg  
ab 10/2015 Assistenzarzt für Pathologie am Städtischen Klinikum Lüneburg  
09/2016 Facharzt für Pathologie

Hamburg, den 23.03.2017

Unterschrift: .....

#### **8.4 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.

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

Unterschrift: .....