

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin A  
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. W. E. Berdel –

**G-Protein-vermittelte Signalwege  
in der Akuten Myeloischen Leukämie:  
Eine quantitative Genexpressionsanalyse**

INAUGURAL - DISSERTATION  
zur Erlangung des doctor medicinae  
der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von  
Annika Rudat  
aus Bielefeld  
2003

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-  
Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Heribert Jürgens

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. H. L. Serve

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. H. Bürger

Tag der mündlichen Prüfung: 04.08.2003

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin A  
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. W. E. Berdel –  
Referent: Univ.-Prof. Dr. H. L. Serve  
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. H. Bürger

## **Zusammenfassung**

G-Protein-vermittelte Signalwege in der Akuten Myeloischen Leukämie:

Eine quantitative Genexpressionsanalyse

Rudat, Annika

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, nähere Informationen zur Regulation von G-Protein-vermittelten Signalwegen in der Akuten Myeloischen Leukämie zu erlangen.

Dazu wurde mittels quantitativer Real-Time PCR die Expression der G-Proteine G $\beta$  12 und G $\beta$  13 sowie der RGS-Proteine RGS2, RGS16 und p115<sup>Rho-GEF</sup> im Knochenmark von Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie untersucht.

Die Höhe der Genexpression in den Patientenproben wurde mit der in gesunden Kontrollen verglichen. Es wurde untersucht, ob die Höhe der Genexpression mit bekannten Patientendaten und mit der Prognose korreliert.

Beim Vergleich mit gesundem Knochenmark zeigte sich in den Patientenproben eine signifikant erniedrigte RGS2-Expression und eine signifikant erhöhte G $\beta$  12- und G $\beta$  13-Expression.

Für vier Gene konnte eine Korrelation der Genexpression mit dem FAB-Typ gezeigt werden: RGS2 war signifikant erhöht in den monozytoid differenzierten Leukämien AML-M4 und -M5, RGS16 zeigte eine signifikante Erhöhung in der AML-M3 und p115<sup>Rho-GEF</sup> und G $\beta$  12 waren signifikant erhöht in den unreifzelligen Leukämien AML-M0 und-M1.

Beim Vergleich der Genexpressionshöhe zwischen Patienten mit und ohne ITD-Mutationen von Flt3 konnte für die Gruppe mit Mutationen eine signifikant erniedrigte RGS2-Expression gezeigt werden.

Für die Höhe der RGS2- und der RGS16-Expression ergaben sich signifikante Unterschiede in der Prognose der Patienten: Patienten mit hoher RGS2-Expression zeigten ein vermindertes Gesamtüberleben, Patienten mit hoher RGS16-Expression ein vermindertes rezidivfreies Überleben. Diese Ergebnisse zeigen, dass G-Proteine und RGS-Proteine, über deren Rolle in der Hämatopoese bislang wenig bekannt war, in Leukämien vielfältig reguliert sind. Das weist darauf hin, dass sie auch in der malignen Hämatopoese wichtige Funktionen innehaben. Insbesondere die RGS-Proteine RGS2 und RGS16 erscheinen interessant, und ihre Rolle bei der Pathogenese von Leukämien sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Tag der mündlichen Prüfung: 04.08.2003

## Inhaltsverzeichnis

|  |     |
|--|-----|
| <b>INHALTSVERZEICHNIS</b>                            | I   |
| <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>                         | III |
| <b>1. EINLEITUNG</b>                                 | 1   |
| 1.1 Die Akute Myeloische Leukämie                    | 1   |
| 1.1.1 Allgemeines                                    | 1   |
| 1.1.2 Epidemiologie                                  | 1   |
| 1.1.3 Ätiologie                                      | 2   |
| 1.1.4 Pathogenese                                    | 2   |
| 1.1.5 Klinisches Bild                                | 2   |
| 1.1.6 Diagnose und Klassifikation                    | 3   |
| 1.1.7 Therapie                                       | 7   |
| 1.1.8 Ausblick                                       | 10  |
| 1.2 G-Protein-vermittelte Signaltransduktion         | 12  |
| 1.2.1 G-Proteine                                     | 12  |
| 1.2.2 RGS-Proteine                                   | 13  |
| 1.3 Aufgabenstellung                                 | 17  |
| <b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>                      | 18  |
| 2.1 Geräte, Kunststoffmaterialien, Chemikalien       | 18  |
| 2.1.1 Geräte   | 18  |
| 2.1.2 Kunststoffmaterialien                          | 18  |
| 2.1.3 Chemikalien                                    | 19  |
| 2.2 Zelllinie und Patientenproben                    | 20  |
| 2.2.1 Zelllinie                                      | 20  |
| 2.2.2 Patientenproben                                | 20  |
| 2.3 Isolierung der RNA                               | 22  |
| 2.4 Herstellung der cDNA durch Reverse Transkription | 23  |
| 2.5 TaqMan PCR                                       | 25  |
| 2.5.1 Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR)     | 25  |
| 2.5.2 Prinzip der TaqMan PCR                         | 25  |

---

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| 2.5.3     | Quantifizierungsstrategien  | 26 |
| 2.5.4     | Verwendete PCR-Primer und Sonden  | 27 |
| 2.5.5     | Vorgehen  | 29 |
| 2.6       | Statistische Datenanalyse   | 30 |
| <b>3.</b> | <b>ERGEBNISSE</b>   | 32 |
| 3.1       | Allgemeines   | 32 |
| 3.2       | Vergleich der Genexpression zwischen AML-Patienten und Gesunden                   | 33 |
| 3.2.1     | RGS2  | 34 |
| 3.2.2     | G? 12   | 35 |
| 3.2.3     | G? 13   | 36 |
| 3.3       | Genexpression und FAB-Typ   | 37 |
| 3.3.1     | RGS2  | 37 |
| 3.3.2     | RGS16   | 40 |
| 3.3.3     | p115 <sup>Rho-GEF</sup>   | 41 |
| 3.3.4     | G? 12   | 42 |
| 3.4       | Genexpression und ITD-Mutationen  | 44 |
| 3.5       | Korrelation der Genexpression mit sonstigen Patientenmerkmalen                    | 46 |
| 3.6       | Genexpression und Prognose  | 47 |
| 3.6.1     | RGS2  | 47 |
| 3.6.2     | RGS16   | 48 |
| <b>4.</b> | <b>DISKUSSION</b>   | 50 |
| 4.1       | Vergleich der Genexpression zwischen Patienten mit AML und<br>gesunden Kontrollen | 51 |
| 4.2       | Genexpression und FAB-Typ   | 53 |
| 4.3       | Genexpression und ITD-Mutationen  | 54 |
| 4.4       | Genexpression und Prognose  | 54 |
| <b>5.</b> | <b>ZUSAMMENFASSUNG</b>  | 57 |
|           | <b>LITERATURVERZEICHNIS</b>   | 59 |
|           | <b>LEBENS LAUF</b>  | 68 |
|           | <b>DANKSAGUNG</b>   | 69 |

**Abkürzungsverzeichnis**

|                    |   |
|--------------------|---|
| µM                 | Mikromolar  |
| AML                | Akute Myeloische Leukämie                             |
| AMLCG              | AML Cooperative Group                                 |
| ALL                | Akute Lymphatische Leukämie                           |
| ATRA               | All-trans-Retinsäure                                  |
| CD                 | Cluster of Differentiation (Differenzierungsantigen)# |
| cDNA               | komplementäre Desoxyribonukleinsäure                  |
| CML                | Chronische Myeloische Leukämie                        |
| CLL                | Chronische Lymphatische Leukämie                      |
| CR                 | komplette Remission                                   |
| dATP               | Desoxyadenosintriphosphat                             |
| dCTP               | Desoxycytidintriphosphat                              |
| DEPC               | Diethylpyrocarbonat                                   |
| dGTP               | Desoxyguanosintriphosphat                             |
| DMSO               | Dimethylsulfoxid                                      |
| DNA                | Desoxyribonukleinsäure                                |
| dNTP               | Desoxynukleotidtriphosphat                            |
| dTTP               | Desoxythymidintriphosphat                             |
| etc.               | et cetera   |
| evtl.              | eventuell   |
| FAB-Klassifikation | French-American-British-Klassifikation                |
| GAPDH              | Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase                 |
| GDP                | Guanosindiphosphat                                    |
| GPCR               | G-Protein-gekoppelte Rezeptoren                       |
| GTP                | Guanosintriphosphat                                   |
| Hb                 | Hämoglobin  |
| HLA                | Humane Leukozyten Antigene                            |
| ITD                | interne Tandemduplikation                             |
| LDH                | Laktatdehydrogenase                                   |

|             |  |
|-------------|--|
| MAP-Kinasen | Mitogen-aktivierte-Proteinkinasen                            |
| Mg          | Magnesium  |
| mRNA        | messenger Ribonukleinsäure                                   |
| PCR         | Polymerasekettenreaktion                                     |
| PML/RAR?    | Fusionsprotein (Promyelozytenleukämie/Retinsäurerezeptor ? ) |
| RGS         | Regulators of G-Protein Signaling                            |
| RNA         | Ribonukleinsäure   |
| rRNA        | ribosomale Ribonukleinsäure                                  |
| RT-PCR      | Polymerase Kettenreaktion mit Reverser Transkription         |
| tRNA        | Transfer-Ribonukleinsäure                                    |
| z.B.        | zum Beispiel   |



## **1 Einleitung**

### 1.1 Die Akute Myeloische Leukämie

#### 1.1.1 Allgemeines

Die Bezeichnung „Leukämie“ (= weißes Blut) wurde 1844 von Rudolf Virchow auf Grund der Entdeckung einer erheblichen Vermehrung von weißen Zellen im Blut einer Patientin geprägt. Heute werden mit diesem Begriff die bösartigen Erkrankungen der weißen Blutkörperchen (Leukozyten) bezeichnet.

Nach den Differenzierungsmerkmalen der malignen Zellen wird zwischen myeloischen und lymphatischen Leukämien und nach der Verlaufsform zwischen akuten und chronischen Leukämien unterschieden. So wird die Akute Lymphatische Leukämie (ALL) von der Chronischen Lymphatischen Leukämie (CLL) und die Akute Myeloische Leukämie (AML) von der Chronischen Myeloischen Leukämie (CML) unterschieden.

#### 1.1.2 Epidemiologie

Weltweit tritt die AML mit Inzidenzraten um 2,5 auf 100.000 Einwohnern auf, wobei das mittlere Erkrankungsalter 65 Jahre beträgt. Die Inzidenz steigt proportional zum Lebensalter von 1 pro 100.000 bei 40jährigen auf 15 pro 100.000 bei 75jährigen.

(74)

### 1.1.3 Ätiologie

Die Ätiologie der AML ist bei der überwiegenden Zahl der Erkrankungsfälle ungeklärt. Allerdings konnten in den letzten Jahren in epidemiologischen Untersuchungen eine Reihe von Faktoren herausgearbeitet werden, die für die Entstehung von einem kleinen Teil der Leukämien von Bedeutung sein können. Zu diesen Faktoren gehören radioaktive Strahlenexposition (30), Röntgenstrahlenexposition (41), Chemikalien wie z.B. Benzole (1), Zytostatika wie z.B. Alkylanzien (durchschnittlich 4-6 Jahre nach Exposition) oder Topoisomerase II-Inhibitoren (durchschnittlich 1-3 Jahre nach Exposition) und auch langjähriges Zigarettenrauchen (61).

Geschwister von AML-Patienten tragen ein überdurchschnittlich hohes Risiko, ebenfalls an einer AML zu erkranken. Dieses Risiko ist bei eineiigen Zwillingen nochmals deutlich erhöht (57).

Mehrere angeborene genetische Erkrankungen wie z. B. Trisomie 21 (73) und Bloom-Syndrom (56) gehen mit einer erhöhten Leukämieinzidenz einher.

### 1.1.4 Pathogenese

Die AML entsteht durch die maligne Transformation einer hämatopoetischen Stammzelle des Knochenmarks und die anschließende Proliferation des neoplastischen Zellklons. Es kommt zur Überschwemmung des Knochenmarks mit unreifen Vorläuferzellen der Granulopoese und konsekutiver Verdrängung der normalen Hämatopoese mit den klinischen Folgeerscheinungen der progredienten Knochenmarkinsuffizienz.

### 1.1.5 Klinisches Bild

Die AML zeichnet sich durch einen plötzlichen Beginn und schnellen Verlauf aus. Typischerweise berichten die Patienten über unspezifische Allgemeinsymptome wie

Mattigkeit, Abgeschlagenheit, leichten Gewichtsverlust, Fieber, Knochenschmerzen über eine Dauer von 1-3 Monaten bei Diagnosestellung.

Das Beschwerdebild ist Folge der hämatopoetischen Insuffizienz, also der Anämie, Granulozytopenie und Thrombozytopenie. Es besteht vorrangig aus Müdigkeit, Blässe, Schwindel, Kopfschmerz (Anämie), Blutungsneigung mit petechialen Blutungen und Schleimhautblutungen (Thrombozytopenie) und Infektneigung (Granulozytopenie).

Im Blutaussstrich sieht man eine deutliche Anisozytose und Poikilozytose der Erythrozyten. Das weiße Blutbild zeichnet sich durch ein Fehlen der mittleren Entwicklungsstufen innerhalb der Granulopoese aus (Hiatus leucaemicus).

Das Knochenmark ist hyperzellulär mit mehr als 30% leukämischen Blasten. Im Zytoplasma der myeloischen Vorstufen finden sich manchmal stäbchenförmige Einschlüsse, die Auer-Stäbchen genannt werden und ausschließlich bei der AML auftreten. Reife Granulozyten und erythrozytopoetische Vorstufen treten ganz in den Hintergrund.

#### 1.1.6 Diagnose und Klassifikation

Zur Diagnose und Klassifikation der AML werden mehrere sich ergänzende Verfahren genutzt. Den gemeinsamen Anfang macht die Knochenmarkspunktion. Das so gewonnene Material wird dann den unterschiedlichen Verfahren zugeleitet:

##### *Morphologie und Zytochemie*

Die weit verbreitete FAB-(French-American-British-)Klassifikation (2, 3) schlägt eine Einteilung der AML in acht verschiedene Typen (M0 bis M7) vor. Sie basiert auf zytomorphologischen und zytochemischen Methoden (siehe Tabelle 1).

Primär wichtig ist die Unterscheidung zwischen Zellen der myeloischen und der lymphatischen Reihen. Innerhalb der myeloischen Leukämien ist die Identifikation einer

AML-M3 (Akute Promyelozytenleukämie) wichtig, da sich aus dieser Diagnose eine spezifische Therapie ableitet (s.1.1.7).

Bei undifferenzierten Leukämien kann häufig durch Morphologie und Zytochemie alleine keine genaue Diagnose erfolgen. In solchen Fällen leistet die Immunphänotypisierung eine wichtige Hilfe.

**Tabelle 1: FAB-Klassifikation der AML**

| FAB-Klassifikation | Erkrankung                     | Zelltyp                             | Zytochemie          | Häufigkeit |
|--------------------|--------------------------------|-------------------------------------|---------------------|------------|
| AML-M0             | akute unreifzellige Leukämie   | myeloblastär, minimal differenziert |                     | 2-10%      |
| AML-M1             | AML ohne Reifezeichen          | myeloblastär, wenig differenziert   | POX+                | 15-20%     |
| AML-M2             | AML mit Reifezeichen           | myeloblastär, differenziert         | POX+                | 30%        |
| AML-M3             | akute Promyelozytenleukämie    | promyelozytär                       | POX+                | 5-10%      |
| AML-M4             | akute myelomonozytäre Leukämie | myeloblastär, monozytär             | POX+ und Esterase+  | 15-25%     |
| AML-M4Eo           | akute myelomonozytäre Leukämie | wie M4 mit Eosinophilie (>5%)       | POX+ und Esterase + |            |
| AML-M5a            | akute Monoblastenleukämie      | monoblastär                         | POX+ und Esterase+  | 10-15%     |
| AML-M5b            | akute Monozytenleukämie        | monozytär                           | POX+ und Esterase + |            |
| AML-M6             | akute Erythroleukämie          | myeloblastär, erythroblastär        | PAS+                | 3-4%       |
| AML-M7             | akute Megakaryozyten-Leukämie  | megakaryoblastär                    | Esterase+           | 2-4%       |

POX = Myeloperoxidase; PAS = Perjodsäure-Schiff-Reaktion

Esterase = ? -Naphthylacetatesterase

### *Immunphänotypisierung*

Bei der Immunphänotypisierung werden an der Zelloberfläche liegende Antigengruppen (Clusters of Differentiation, CD) mit monoklonalen Antikörpern spezifisch nachgewiesen. An der Oberfläche von Zellen der Hämatopoese konnten annähernd 160 verschiedene Antigengruppen identifiziert werden. Typische myeloische Marker sind

CD13, CD15, CD33 und bei monozytoider Differenzierung CD14. Durch die Auswahl geeigneter Antikörperkombinationen kann die Differenzierung einer Zelle sowie deren Reife mit großer Sicherheit bestimmt werden. Abnormal exprimierte Marker, die nicht mit der Zellherkunft übereinstimmen, können helfen, die neoplastischen Zellen von den normalen Zellen zu differenzieren. So kann eine Leukämiezelle aus bis zu 10 000 gesunden Zellen detektiert werden, was bei Patienten mit morphologisch unauffälligem Knochenmark bei der Diagnose der Minimalen Resterkrankung genutzt wird.

### *Zytogenetik*

Chromosomale Veränderungen können in annähernd 80% der Patienten mit AML nachgewiesen werden (47). Dazu gehören Deletionen (5q-, 7q-), Inversionen (inv(3), inv(16)) und spezifische Translokationen (t(8;21) oder t(15;17)). An der Stelle des chromosomalen Bruchs kommt es zur Deregulation von spezifischen Genen durch Genfusion, was zur Leukämieentstehung beiträgt (59). Oft sind Gene betroffen, die auch in der Entwicklung der normalen Hämatopoese eine Rolle spielen. Weitere genetische Veränderungen in der AML sind numerische Aberrationen wie +8 oder -7. Komplex aberrante Karyotypen werden in 15% der Fälle beobachtet.

Die unterschiedlichen chromosomalen Veränderungen können zum Teil den verschiedenen AML-Subtypen zugeordnet werden:

Bei der Promyelozytenleukämie (AML-M3) findet sich in 90% die Translokation t(15;17). Dabei ist das Gen für den Alpharezeptor der Retinsäure (RAR-?) von Chromosom 17 auf Chromosom 15 transferiert, wo es das Fusionsgen PML/RAR-? bildet. Es resultiert ein Stillstand der myeloischen Differenzierung auf der Stufe des Promyelozyten. Dies wird verursacht durch den Verlust der Wildtyp RAR-? - Funktion und durch die Fähigkeit des Fusionsproteins PML/RAR-?, DNA zu binden und Komplexe zu bilden, die die Chromatinkonformation derartig verändern, dass die Transkription von Genen, die die myeloische Differenzierung kodieren, unterdrückt wird (22, 63).

Mit All-trans-Retinsäure (ATRA) kann diese Hemmung spezifisch aufgehoben werden. Somit besteht die Möglichkeit einer gezielten Therapie.

Die Translokation t(8;21), die zur Produktion des Fusionsgenes AML1/ETO führt, findet sich in 18% der Fälle von AML-M2.

Die Inversion (16) findet sich gehäuft bei der AML-M4 mit Eosinophilie.

Die Translokation t(1;22) ist assoziiert mit der AML-M7.

In zahlreichen Studien wurde die prognostische Bedeutung der verschiedenen zytogenetischen Aberrationen in der AML-Therapie untersucht (11, 60, 64, 70). Dabei werden üblicherweise drei Prognosegruppen unterschieden: Zur Hochrisikogruppe mit niedriger Remissionsrate und kurzer medianer Überlebenszeit gehören Patienten mit Veränderungen am langen Arm der Chromosomen 3, 5, 7 oder 11 sowie Patienten mit komplex aberranten Karyotypen. Als prognostisch günstig gelten die Translokationen t(15;17) und t(8;21) sowie die Inversion 16. Patienten mit einem normalen Karyotyp oder mit anderen Aberrationen als den zuvor genannten zählen zur intermediären Prognosegruppe.

Im Rahmen von Studien werden derzeit risikoadaptierte Therapiekonzepte geprüft, bei denen sich diese unterschiedlichen Prognosegruppen in einer unterschiedlich intensiven Therapie widerspiegeln.

### *Molekularbiologie*

Auch Veränderungen auf molekularbiologischer Ebene können Hinweise zur Prognoseeinschätzung geben:

Bei etwa 30% aller AML-Patienten kann eine Aktivierung der Flt3-Rezeptortyrosinkinase durch interne Tandemduplikationen (ITD) der juxtamembranären Region gezeigt werden (46, 49, 78). Damit ist Flt3 das am häufigsten mutierte Gen in der AML.

Flt3, dessen Gen auf Chromosom 13q12 lokalisiert ist, wird auf frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert und vermittelt bedeutende Funktionen in Proliferation, Differenzierung und Überleben (42, 62). Auch AML-Zellen exprimieren Flt3 und können durch den Flt3-Liganden FL zu gesteigerter Proliferation und Überleben angeregt werden (38).

---

In Zelllinienmodellen führen ITD-Mutationen von Flt3 (Flt3-ITD) zu ligandenunabhängiger Flt3-Aktivierung und Zelltransformation (18, 25, 45, 68). Das Vorliegen von Flt3-ITD ist assoziiert mit einer signifikant schlechteren Prognose im Vergleich zu Patienten ohne diesen Defekt (43, 46, 58).

### 1.1.7 Therapie

Die Behandlung der AML besteht aus antileukämischer und supportiver Therapie.

#### *Antileukämische Therapie*

Ziel ist die Eradikation des malignen Zellklons und die Wiederherstellung der normalen Hämatopoese. Dieses wird erreicht durch eine myelosuppressive Chemotherapie. Diese sollte möglichst früh nach Diagnosestellung beginnen, um Komplikationen der AML zuvorkommen. Eine Chemotherapie der AML sollte im Rahmen von Studien erfolgen.

Die initiale Therapie wird als Induktionstherapie bezeichnet. Ihr Ziel ist das Erreichen einer kompletten Remission (CR). Zur Definition der kompletten Remission der AML siehe Tabelle 2. Die Induktionstherapie basiert auf der Kombination von Cytarabin, einem Pyrimidin-Analagon, mit einem Anthrazyklin. Es bestehen verschiedene Studienprotokolle, die zum Teil auch eine Doppelinduktion vorsehen.

Tabelle 2: Kriterien der CR in AML (nach (14))

---

|                 |   |
|-----------------|---|
| Knochenmark     | < 5% Blasten<br>Zellularität > 20%  |
| Peripheres Blut | ? 1500 neutrophile Granulozyten / $\mu$ l<br>? 100 000 Thrombozyten / $\mu$ l<br>0% Blasten |

---

Diese Kriterien müssen für eine Dauer von mindesten 4 Wochen erfüllt sein.

Im Rahmen der Primärtherapie werden Remissionen in etwa 70 % der Patienten erreicht, anhaltende Remissionen von mehr als fünf Jahren und damit mögliche Heilung in etwa 30 % .

Die nachfolgende Therapie wird als Postremissionstherapie bezeichnet. Sie dient der Elimination der Minimalen Resterkrankung (verbliebene maligne Zellen unterhalb der morphologischen Nachweisgrenze) und somit der Rezidivprävention bzw.

Remissionserhaltung (8).

Die Postremissionstherapie unterteilt sich in eine intensive Konsolidierungschemotherapie und eine Erhaltungstherapie.

Ein weiteres Therapieelement in der Postremissionsphase für Patienten <60 Jahre ist die allogene Stammzell- oder Knochenmarktransplantation. Dabei wird durch hochdosierte Chemotherapie und evtl. Ganzkörperbestrahlung eine totale Myeloablation und somit eine maximale Reduktion der Leukämiezellen erreicht. Im Anschluss erfolgt die Infusion der Stamm- bzw. Knochenmarkzellen eines HLA-kompatiblen Spenders, aus denen das hämatopoetische System wiederhergestellt wird.

Eine Hauptkomplikation dieser Therapie ist die Graft-versus-host-Reaktion, bei der das Spender-Immunsystem Empfängergewebe abstößt, was zu hoher Morbidität und Mortalität führt, gleichzeitig aber auch mit einem Graft-versus-leukemia-Effekt und somit einer verminderten Rezidivquote einhergeht (28). Weitere Komplikationen können sich aus der hohen Toxizität der Konditionierungstherapie und aus der langen immunsuppressiven Phase nach der Transplantation ergeben.

Ein fünfjähriges krankheitsfreies Überleben von bis zu 50 % bei einer Rezidivhäufigkeit von unter 20 % bei Transplantation in erster CR mit einem HLA-kompatiblen Familienspender macht die allogene Transplantation zu einer effektiven Therapie. Vor der Planung einer Transplantation sollte dieser Vorteil jedoch individuell gegen die oben genannten Risiken abgewogen werden.

Der Stellenwert der autologen Stammzelltransplantation, bei der in Vollremission gewonnene eigene Stammzellen des Patienten nach einer Hochdosischemotherapie reinfundiert werden, ist derzeit Gegenstand klinischer Studien.



Die Mehrheit der Patienten mit AML erleidet ein Rezidiv nach der ersten Vollremission. Mit dem Ziel, eine erneute Remission zu erreichen, erfolgt eine Reinduktionstherapie, deren Erfolg stark von der Dauer der ersten Remission abhängt. Die zweite Remission dauert oft nur sehr kurz an mit Überlebensraten von wenigen Monaten. Hier konnten Studien ein verlängertes krankheitsfreies Überleben sowohl für die allogene als auch die autologe Stammzelltransplantation zeigen.

Einen besonderen Stellenwert unter den Leukämien nimmt die Promyelozytenleukämie (AML-M3) mit der Translokation t (15;17) ein, da leukämische Blasten, die diese Translokation aufweisen, durch Retinoide zur terminalen Differenzierung gebracht werden können. Mit all-trans-Retinsäure (ATRA) lässt sich bei nahezu allen Patienten eine komplette Remission induzieren (29), die allerdings nicht dauerhaft ist. Deshalb wird zusätzlich eine anthrazyklinhaltige Chemotherapie notwendig, die zeitgleich oder nach Erreichen der Remission erfolgt. In dieser Kombination konnte für die Patienten mit Promyelozytenleukämie eine deutliche Verbesserung des krankheitsfreien Überlebens erzielt werden.

### *Supportivtherapie*

Zur Bekämpfung von leukämie- und chemotherapiebedingten Komplikationen ist eine intensive Supportivtherapie lebenswichtig. Insbesondere während der Phase der chemotherapieinduzierten Knochenmarksaplasie mit Panzytopenie, die mehrere Wochen andauern kann, besteht die Gefahr von lebensgefährlichen Komplikationen, in erster Linie durch Blutungen und Infektionen. Besonders wichtige Maßnahmen in dieser Zeit sind:

1. Substitution von Blutzellen

Eine Erythrozytensubstitution sollte durchgeführt werden bei anämiebedingter Symptomatik, spätestens aber bei einem Abfall des Hb-Wertes auf < 8g/dl.

Eine Thrombozytensubstitution sollte bei Thrombozytenzahlen  $< 10\,000/\mu\text{l}$  bzw. beim klinischen Nachweis von Blutungszeichen erfolgen.

## 2. Antiinfektiöse Maßnahmen

Infolge der leukämie- und therapiebedingten Neutropenie (neutrophile Granulozyten  $< 500/\mu\text{l}$ ) über mehrere Wochen sind AML-Patienten sehr infektionsgefährdet, vor allem durch Pilzinfektionen und bakterielle Infektionen. Zur antiinfektiösen Prophylaxe dient die Patientenisolierung in Einzelzimmern mit Umkehrisolierung. Zur Vermeidung opportunistischer Infektionen erfolgt eine selektive Darmdekontamination, eine *Pneumocystis carinii*-Prophylaxe und eine *Candida*-Prophylaxe.

Infektionen in Neutropenie müssen umgehend und konsequent behandelt werden. Schon der Infektionsverdacht auch ohne klinisch nachweisbaren Fokus oder mikrobiologischen Erregernachweis erfordert den sofortigen Beginn einer empirischen Breitbandantibiose mit sofortiger Umstellung auf eine gezielte Antibiotikatherapie nach vorliegendem Resistogramm.

## 3. Hydrierung

Die therapie- und/oder leukämiebedingte Zytolyse führt zur Erhöhung der Harnsäurespiegel (Hyperurikämie) mit der Gefahr des Nierenversagens und der Hyperkaliämie. Daher sind unter der Chemotherapie eine ausreichende Hydrierung mit 3-4 l Flüssigkeit pro Tag, sowie eine Harnalkalisierung und die Gabe eines Urikostatikums dringend notwendig, insbesondere bei initial deutlich erhöhten Leukozytenwerten.

### 1.1.8 Ausblick

Die akuten Leukämien gehören zu den am besten erforschten und charakterisierten Neoplasien. In den letzten Jahren wurden große Fortschritte im Verständnis der Pathogenese der akuten Leukämien gemacht. An der Leukämieentstehung beteiligte

Gene wurden und werden identifiziert, und das Wissen um Faktoren, die Wachstum und Funktion der Leukämiezellen beeinflussen, steigt permanent. Es stehen eine Reihe hoch wirksamer Chemotherapeutika zur Therapie zur Verfügung, mit denen bei den meisten Patienten eine erste Remission induziert werden kann.

Dennoch bleibt die AML für die Mehrheit der Patienten eine unheilbare Erkrankung.

## 1.2 G-Protein vermittelte Signaltransduktion

### 1.2.1 G-Proteine

G-Proteine (Guanin-Nukleotid-bindende Proteine) regulieren eine Vielzahl von physiologischen Prozessen. Sie können in zwei Gruppen unterteilt werden: die kleinen monomeren G-Proteine der Ras-Familie und die großen heterotrimeren G-Proteine, mit denen sich diese Arbeit befasst.

Heterotrimere G-Proteine sind ubiquitär. Sie stellen die Grundlage dar für die Signaltransduktion über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) (66).

Dazu gehören unter anderem Rezeptoren für Chemokine, Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter, Hormone, Phospholipide etc.

G-Proteine bestehen aus den drei Untereinheiten  $G\alpha$ ,  $G\beta$  und  $G\gamma$ . Im inaktiven Zustand befinden sie sich als GDP-bindende Heterotrimere intrazellulär an der Plasmamembran. Die Aktivierung eines GPCR durch ein extrazelluläres Signal führt zur Assoziation des Heterotrimers an den Rezeptor und durch Konformationsänderung der  $G\alpha$ -Untereinheit zum Austausch des gebundenen GDPs gegen GTP. Daraufhin zerfällt das G-Protein in  $G\alpha$ - und  $G\beta\gamma$ -Untereinheit, die beide an vielfältige Effektoren binden und so eine Signalkaskade in der Zelle auslösen (6).

Die intrinsische GTPase-Aktivität von  $G\alpha$  führt zur Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP. Daraufhin assoziieren die drei Untereinheiten des Proteins wieder, und das Rezeptorsignal ist beendet.

Bisher wurden 17  $G\alpha$ -, 5  $G\beta$ - und 12  $G\gamma$ -Untereinheiten beschrieben, was über 800 Kombinationsmöglichkeiten zulässt (16). Auf der Basis von Aminosäuresequenz und Funktion werden G-Proteine nach ihren  $G\alpha$ -Untereinheiten in vier Gruppen aufgeteilt:  $G_s$ ,  $G_{i/o}$ ,  $G_q$  und  $G_{12}$ , zu der die hier untersuchten Proteine  $G_{12}$  und  $G_{13}$  gehören (65).

Historisch wurden G-Proteine als Schalter für Hormonrezeptoren und Regulatoren von Second-messenger Systemen betrachtet (20, 50, 66). Sie spielen aber auch eine Rolle bei der zellulären Proliferation:

Zehn der 17 bekannten G $\alpha$ -Untereinheiten konnten in einen Zusammenhang mit der Kontrolle zellulärer Proliferation gebracht werden, darunter auch die hier untersuchten Untereinheiten G $\alpha$ <sub>12</sub> und G $\alpha$ <sub>13</sub>, deren aktivierte Mutationen als sehr starke Onkogene in Fibroblasten wirken (33, 71, 76). G $\alpha$ <sub>12</sub> und G $\alpha$ <sub>13</sub> werden auch als gep-Onkogene bezeichnet .

Auch die Frizzled-Rezeptoren des Wnt-Signalings sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Wnt-Signaling spielt unter anderem eine bedeutende Rolle bei der Zellproliferation. Es konnte gezeigt werden, dass Wnt-Signalwege mit Entwicklung und Progression von Tumoren assoziiert sind (4, 55). Bei verschiedenen soliden menschlichen Krebsarten wie z. B. dem kolorektalen Karzinom, dem Ovarialkarzinom, dem hepatozellulären Karzinom etc. liegt eine aberrante Aktivierung des Wnt-Signalweges vor (44).

Daten über die transformierende Wirkung von G $\alpha$ -Untereinheiten auf die Hämatopoese liegen bislang nicht vor.

### 1.2.2 RGS-Proteine

#### *Allgemeines*

RGS-Proteine verfügen über eine ca. 120 Aminosäuren lange Region mit hoher Homologie (35). Die biochemische Funktionsweise dieser Region liegt in der Aktivierung der GTPase-Aktivität von G $\alpha$ -Untereinheiten mit der Folge der schnelleren Hydrolyse von GTP zu GDP. Dies führt zu einer schnelleren Reassoziaton von G $\alpha\beta\gamma$ -Komplexen und somit zu schnelleren Beendigung des Rezeptorsignals. Dieser Einfluss auf die Kinetik G-Protein-abhängiger Signale gab den Proteinen den Namen „Regulators of G-Protein Signaling“ (RGS-Proteine).

Das erste Mitglied dieser Proteinfamilie wurde 1982 mit der Beschreibung von Sst2 in *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt (13).

Das erste bei Säugetieren beschriebene RGS-Protein ist BL34/1R20 (RGS1). Es wurde 1993 auf Grund seiner erhöhten Expression in ALL-Zellen identifiziert (27).

Mittlerweile sind 26 Mitglieder der Familie der RGS-Proteine bekannt, die aus mindestens sechs verschiedenen Subfamilien besteht:

- (A) RGS-GAIP, Ret-RGS1, RGSZ1, RGS17
- (B) RGS1, RGS2, RGS3, RGS4, RGS5, RGS8, RGS13, RGS16, RGS18
- (C) RGS6, RGS7, RGS9, RGS11
- (D) RGS12, RGS14
- (E) Axin, Conductin
- (F) P115<sup>Rho-GEF</sup>, PDZ<sup>Rho-GEF</sup>, LARG

Die RGS-Proteine RGS10 und D-AKAP2 werden wegen ihrer andersartigen Struktur in keine der genannten Subfamilien eingeordnet.

Die verschiedenen RGS-Proteine zeigen deutliche Unterschiede in ihrer Affinität zu den verschiedenen G $\beta$ -Untereinheiten, wobei auch Überlappungen existieren. Die in dieser Arbeit untersuchten RGS-Proteine zeigen folgende Affinität:

RGS2 reguliert G $\beta_i$  und G $\beta_s$  (32, 69), RGS16 reguliert G $\beta_i$ , G $\beta_o$ , G $\beta_t$  und G $\beta_q$  (15, 77, 80) und p115<sup>Rho-GEF</sup> G $\beta_{12}$  und G $\beta_{13}$  (37).

### *Gewebeverteilung*

Es konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl von RGS-Proteinen im Gehirn (21) und im Herzmuskel (67) vorkommen.

Die Expression von RGS-Proteinen in Zellen der myeloischen Reihe ist bisher wenig untersucht worden. In einer der Publikationen, die sich mit diesem Thema befasst, wurde die Expression von RGS2 mittels RT-PCR in gesunden und malignen Zellen der

Hämatopoese untersucht. Die Expression von RGS2 war dabei weder in CD 34-positiven Vorläuferzellen, noch im Knochenmark von gesunden Spendern oder von Patienten mit CML in chronischer Phase nachweisbar. Die mRNA fand sich jedoch in einem Großteil der Proben von Patienten mit AML, ALL und CML im Blastenschub (75).

Quantitative Untersuchungen zur Expression von RGS2 und anderen RGS-Proteinen in der normalen oder malignen Hämatopoese liegen bislang nicht vor.

### *Regulation*

Verschiedene Möglichkeiten der Regulation der Expression von RGS-Proteinen sind bekannt:

Einige RGS-Proteine werden durch Signale von GPCR induziert, deren Signaltransduktion sie dann hemmen. Dieses Prinzip der negativen Rückkopplung ist für Sst 2 und eine Reihe der RGS-Proteine in Säugetierzellen beschrieben (10, 17, 26). Auch kann das Signal eines G $\beta$ -Proteins (z.B. G $\beta$ <sub>s</sub>) die Expression eines RGS-Proteins (beispielsweise RGS2) induzieren, das dann das Signal eines anderen G-Proteins inhibiert (z.B. G $\beta$ <sub>q</sub>) (54).

Aber auch Signale, deren Steuerung nicht primär von GPCR ausgeht, beeinflussen die Expression von RGS-Proteinen. So ist beschrieben, dass p53, bekannt als Tumorsuppressorgen und Mediator von Zellzyklusarrest und Apoptose, die Expression von RGS16 induziert. Die Überexpression von RGS16 inhibiert die G-Protein-vermittelte Aktivierung von MAP-Kinasen. MAP-Kinasen (= Mitogen-aktivierte-Proteinkinasen) haben eine zentrale Bedeutung in der Steuerung von Proliferation und Überleben. Es ist somit denkbar, dass die tumorsuppressive Wirkung von p53 durch die p53-induzierte Expression von RGS16 über eine Hemmung der MAPK-Aktivierung verstärkt wird (9).

*Zusätzliche Funktionen*

Neben der „RGS-Domäne“ verfügen einige RGS-Proteine über weitere Protein-Interaktionsregionen. Dazu gehört auch das hier untersuchte RGS-Protein p115<sup>Rho-GEF</sup>, das neben der RGS-Region auch eine sogenannte „dbl-homology domain“ (DH-Region) aufweist, mit der es kleine GTPasen vom Ras- oder Rho-Typ binden kann.

Durch Bindung an G $\gamma$ <sub>12</sub> oder G $\gamma$ <sub>13</sub> mit seiner RGS-Region und an Rho-Proteine mit seiner DH-Region wird p115<sup>Rho-GEF</sup> aktiv und führt zur Aktivierung von Rho (23, 24).

G-Proteine der Rho-Familie spielen eine wichtige Rolle in zahlreichen zellulären Prozessen wie z. B. Regulation von Genexpression, Zellwachstum, Zelltransformation oder Induktion von Apoptose. Darüberhinaus sind einige Mitglieder dieser Proteinfamilie an Ras-vermittelter maligner Zelltransformation beteiligt (81).

Ein weiteres Beispiel ist die RGS-Region von Axin. Diese bindet neben G $\gamma$ -Untereinheiten der G-Protein-gekoppelten Frizzled-Rezeptoren des Wnt-Signalweges (s. 1.2.1) auch den Tumorsuppressor APC. Wnt-Stimulation führt zu einer Erhöhung von  $\beta$ -Catenin im Zytosol während APC die Stabilität von  $\beta$ -Catenin vermindert.  $\beta$ -Catenin ist der intrazelluläre Vermittler des Wnt-Signalweges. Eine Aktivierung des Wnt-Signalweges in verschiedenen Tumoren ist bekannt (s.1.2.1). Axin und seine RGS-Region stehen somit im Zentrum eines wichtigen Transformationsprozesses (79).

RGS-Proteine erfüllen also neben ihrer katalytischen Aktivität auch die Aufgabe eines Bindegliedes zwischen heterotrimeren G-Proteinen und anderen Signalwegen.



### 1.3 Aufgabenstellung

G-Protein vermittelte Signaltransduktionswege sind an grundlegenden Prozessen von Proliferation und Überleben beteiligt. Es ist davon auszugehen, dass eine Störung oder Enthemmung dieser Wege auch bei der Entstehung von Leukämien eine Rolle spielen. Dennoch ist die Expression von G-Proteinen und RGS-Proteinen in leukämischen Zellen noch weitgehend unbekannt.

In dieser Arbeit soll die Expression der G-Proteine G $\alpha$ <sub>12</sub> und G $\alpha$ <sub>13</sub> sowie der RGS-Proteine RGS 2, RGS 16 und p115<sup>Rho-GEF</sup> im Knochenmark von Patienten mit AML sowie in gesundem Knochenmark quantitativ bestimmt werden. Ziel dieser Arbeit ist die Beantwortung der folgende Fragen:

1. Gibt es Unterschiede im Genexpressionsniveau zwischen gesunden und malignen hämatopoetischen Zellen?
2. Korreliert die Höhe der Genexpression mit klinischen Patientendaten oder bekannten Prognosefaktoren?
3. Beeinflusst das Genexpressionsniveau die Prognose der AML?

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Geräte, Kunststoffmaterialien, Chemikalien**

#### 2.1.1 Geräte

Sterile Werkbank Hera Safe, Heraeus Sepatech, Deutschland

Begasungsbrutschrank Cytoperm, Heraeus Sepatech, Deutschland

Microcellcounter F-300 von Sysmex Medical Electronics, Deutschland

Zentrifuge 5417R von Eppendorf, Hamburg

Cryofuge M 7000, Heraeus Sepatech, Deutschland

Vortex VF2 von Janke und Kunkel, IKA-Labortechnik, Deutschland

UV-1202 Spectrophotometer von Shimadzu

Blockthermostat BT200, Kleinfeld Labortechnik, Deutschland

ABI PRISM 7700 Sequence Detector, PE Applied Biosystems, Foster City, USA

Primer Express Software, PE Applied Biosystems, Foster City, USA

Power Macintosh 4400

Pipetus-akku von Hirschmann, Deutschland

Eppendorf Research Pipetten, Hamburg

#### 2.1.2 Kunststoffmaterialien

Pipettenspitzen von ART Molecular BioProducts, San Diego, USA

Falcon Serologische Pipetten, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA

Falcon Blue Max Tubes (15 ml und 50 ml), Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA

Zellkulturflaschen Nunclon Surface, NUNC Brand Products, Dänemark

Probengefäße (0,5 ml, 1 ml und 2 ml) von Eppendorf, Hamburg

MicroAmp Optical Tubes, PE Applied Biosystems, USA

MicroAmp Optical Caps, PE Applied Biosystems, USA

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate, PE Applied Biosystems, USA

### 2.1.3 Chemikalien

RPMI 1640 Medium, Biochrom AG, Berlin

Fetales Kälberserum FCS, Biochrom AG, Berlin

Penicillin / Streptomycin, PAA Laboratories, Linz, Österreich

L-Glutamin, Bio Whittaker Europe, Verviers, Belgien

DMSO, Sigma, St. Louis, USA

Ethanol 99,8%, Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe

TRIzol Reagent, GIBCO Life Technologies, Gaithersburg, USA

Chloroform, Merck KGaA, Darmstadt

Isopropanol, Apotheke der Universitätskliniken Münster

TaqMan PCR Mastermix 2x, PE Applied Biosystems, USA

TaqMan Primer und Sonden, PE Applied Biosystems, USA

MMLV-RT 5x Reaction Buffer, Promega, Madison, USA

MMLV-RT 200, Promega, Madison, USA

Oligo-d(T)-Primer, GIBCO BRL, Gaithersburg, USA

RNAse OUT Ribonuklease Inhibitor, Invitrogen life technologies

dNTP 10mM, Invitrogen life technologies

Pyrokohlensäurediethylester (DEPC), Sigma, St. Louis, USA

## 2.2 Zelllinie und Patientenproben

### 2.2.1 Zelllinie

Zur Erstellung von Standardkurven für die quantitative Auswertung der TaqMan PCR wird die Zelllinie K-562 genutzt, eine humane Zelllinie aus dem Pleuraerguß einer Patientin mit CML in terminaler Blastenkrise. Die Zelllinie wurde von Lozzio und Lozzio 1975 etabliert (39). Sie wird für die vorliegende Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt von dem KMT-Labor der Unklinik Münster.

Es ist bekannt, dass K-562-Zellen RGS 2 exprimieren (75).

Die Zelllinie wird in Kultur gebracht und vermehrt bis ausreichend Zellmaterial für die RNA-Isolierung vorliegt. Als Kulturmedium wird RPMI 1640 Medium verwendet.

Hinzugefügt werden 10% FCS, 2% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin.

Die K-562-Zellen wachsen als große runde Einzelzellen in Suspension. Sie werden bei 37°C in 5% CO<sub>2</sub> im Begasungsbrutschrank inkubiert und alle zwei bis drei Tage 1:5 geteilt und neu ausgesät. Die Zellkonzentration sollte bei 0,1 - 0,5 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml liegen.

Zum Einfrieren der Zellen wird ein Medium aus 70 % RPMI 1640, 20 % FCS und 10 % DMSO verwendet. Die Zellen werden zunächst 24 Stunden bei -70°C und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert bis zur weiteren Verarbeitung.

### 2.2.2 Patientenproben

Es werden 78 Patientenproben analysiert. Bei den Proben handelt es sich um Knochenmarksaspirate von AML-Patienten, die in der 1992er Therapieoptimierungsstudie der AMLCG Studiengruppe in Deutschland behandelt wurden. Die Knochenmarksaspirate wurden zum Zeitpunkt der Erstdiagnose gewonnen. Die wesentlichen Patientenmerkmale sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Patientenmerkmale

|                            |                           |                 |                |
|----------------------------|---------------------------|-----------------|----------------|
| Patienten                  | n = 78                    |                 |                |
| Geschlecht                 | 36 männlich / 42 weiblich |                 |                |
| FAB                        | M0                        | 4/77            | (5,1 %)        |
|                            | M1                        | 15/77           | (19,2 %)       |
|                            | M2                        | 21/77           | (26,9 %)       |
|                            | M3                        | 4/77            | (5,1 %)        |
|                            | M4                        | 22/77           | (28,2 %)       |
|                            | M5                        | 9/77            | (11,5 %)       |
|                            | M6                        | 2/77            | (2,6 %)        |
|                            | M7                        | 0/77            | (0 %)          |
| Komplexer Karyotyp         | 6/59                      | (11,9%)         |                |
| ITD-Mutationen             | 15/78                     | (19,2%)         |                |
| Ergebnis der Induktion     | unbekannt                 | 19/78           | (24,3 %)       |
|                            | CR                        | 43/59           | (72,9 %)       |
|                            | Tod durch AML             | 6/59            | (10,1 %)       |
|                            | persistierende AML        | 7/59            | (11,9 %)       |
|                            | Hypoplasie                | 3/59            | (5,1 %)        |
|                            | Median                    | Mittelwert ? SD | Reichweite     |
| Leukozytenzahl / $\mu$ l   | 36200                     | 83347 ? 163244  | 1100 - 1017000 |
| Thrombozytenzahl / $\mu$ l | 47000                     | 70534 ? 64133   | 1700 - 325000  |
| Blasten im Knochenmark (%) | 89,5                      | 78,7 ? 19,7     | 20-100         |
| LDH (U / ml)               | 443                       | 651 ? 500       | 88 - 2949      |

Die vier Kontrollproben stammen von Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen ohne histologischen und zytologischen Nachweis einer Knochenmarksinfiltration. Die Punktion erfolgte zu diagnostischen Zwecken.

Von allen Patienten liegt eine schriftliche Einverständniserklärung zur Knochenmarkspunktion vor.

### 2.3 Isolierung der RNA

Die RNA der Zelllinie K-562 und die RNA des Knochenmarks werden mit TRIzol isoliert, einer monophasischen Lösung von Phenol und Guanidin-Isothiocyanat.

#### *1. Homogenisierung*

Mit 1 ml TRIzol werden  $5-10 \times 10^6$  Zellen durch mehrfaches Pipettieren lysiert. Anschließend werden die Proben 5 min bei Raumtemperatur belassen, um eine vollständige Dissoziation der Kernproteine zu ermöglichen.

#### *2. Phasenseparation*

Nach Hinzufügen von 0,2 ml Chloroform werden die Reaktionsgefäße 15 sec kräftig mit der Hand geschüttelt und dann für 3 min bei Raumtemperatur belassen. Anschließend werden die Proben 15 min bei 12 000 g bei 4°C zentrifugiert. Es erfolgt eine Auftrennung in eine untere rote Chloroform-Phenol-Phase, eine die denaturierten Proteine enthaltende weißliche Zwischenphase und eine obere wässrige Phase, die die Nukleinsäuren enthält.

#### *3. Präzipitation der RNA*

Die wässrige Phase wird vorsichtig abgehoben und in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Es folgt die Fällung der RNA mit 0,5 ml Isopropanol. Die Proben werden 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach 10 min bei 12 000 g bei 4°C zentrifugiert. Es bildet sich eine sichtbare RNA-Ansammlung am Boden des Reaktionsgefäßes.

#### 4. Waschen der RNA

Die folgenden Schritte finden auf Eis statt.

Der Überstand wird entfernt. Die Nukleinsäuren werden mit 1 ml Ethanol 75% suspendiert und durch erneutes Zentrifugieren bei 7500 g bei 4°C wieder ausgefällt. Dieses Waschen wird zweimal durchgeführt. Anschließend wird die RNA für 10 min luftgetrocknet.

#### 5. Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

RNA besitzt ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Bei dieser Wellenlänge entspricht eine optische Dichte (OD) von 1,0 definitionsgemäß einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Daraus ergibt sich für die Berechnung der RNA-Konzentration in den Proben folgende Formel:

$$E_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{RNA } (\mu\text{g/ml})$$

Neben der Messung bei 260 nm erfolgt eine weitere Messung bei einer Wellenlänge von 280 nm. So kann über die Bildung des Quotienten  $E_{260}/E_{280}$  die Reinheit der RNA ermittelt werden: Werte größer als 2,0 weisen auf eine hohe Reinheit hin, während Werte kleiner als 1,8 für eine Kontamination der Probe mit Proteinen sprechen. Bis zur weiteren Verwendung werden die Proben bei -70°C gelagert.

### 2.4 Herstellung der cDNA durch Reverse Transkription

Als Ausgangsmaterial dient die (wie in 2.3 beschrieben) zuvor isolierte RNA. Mit dem Enzym Reverse Transkriptase, einer aus Retroviren stammenden RNA-abhängigen DNA-Polymerase, wird ein DNA-Strang hergestellt, der zur RNA komplementär ist und als cDNA (complementary DNA) bezeichnet wird.

Die hier verwendete Reverse Transkriptase entstammt dem Moloney murine leukemia-Virus (MMLV) und wird aus transfizierten E. coli Bakterien gewonnen. Als Substrat

der Reversen Transkriptase dienen die Desoxynukleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP, die zusammen als dNTPs bezeichnet werden. Diese werden unter Abspaltung von Pyrophosphat an das 3'-Ende des neu geschriebenen Strangs angehängt. Für die Substraterkennung durch die Reverse Transkriptase ist die Anwesenheit von  $Mg^{2+}$ -Ionen erforderlich. Als Primer dient ein Oligonukleotid, das nur aus Thymidinnukleotiden besteht und so spezifisch mit dem für mRNA charakteristischen PolyA-Schwanz am 3'-Ende hybridisiert, nicht aber mit der rRNA und tRNA.

Die genaue Versuchsanordnung erfolgt wie im Folgenden beschrieben:

---

**Reaktionsansatz 1:**

---

1 µg RNA in 15,75µl DEPC-Wasser

1 µl Random Primer

1 µl RNase out

---

Der Reaktionsansatz wird für fünf Minuten bei 70°C inkubiert (Denaturierung der mRNA), dann einige Sekunden auf Eis gelegt und schließlich zehn Minuten bei Raumtemperatur belassen.

**Reaktionsansatz 2** wird dazugegeben:

---

5 µl M-MLV-5x-Reaction Buffer (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM  $MgCl_2$ , 50 mM DTT)

1,25 µl dNTP (10mM)

1 µl M-MLV-RT

---

Es folgt eine Inkubation von einer Stunde bei 42°C und anschließendes Erhitzen auf 70°C über 15 Minuten. Schließlich wird die so gewonnene cDNA auf ein Endvolumen von 200µl mit DEPC-Wasser verdünnt.

Bis zur weiteren Verwendung wird die cDNA bei -20°C gelagert.



## 2.5 TaqMan PCR

### 2.5.1 Prinzip der Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerase Kettenreaktion (PCR) kann ein zwischen zwei bekannten Basensequenzen liegender DNA-Abschnitt durch sich wiederholende Zyklen annähernd exponentiell amplifiziert werden.

Im ersten Schritt eines PCR-Zyklus führt eine Temperatur von 92°C zur Aufspaltung der DNA-Doppelstränge in Einzelstränge (Denaturierung). Anschließend kommt es bei Temperaturen um 52-56°C zur Anlagerung von spezifischen Oligonukleotiden (Primer), die komplementär zu den 5'-Enden des zu amplifizierenden Bereiches auf den DNA-Strängen sind (Annealing). Die Primer dienen als Ansatzstellen für die Taq-Polymerase, eine hitzestabile DNA-Polymerase, die aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert wird und im dritten Schritt bei 72°C den DNA-Abschnitt zwischen den Primern synthetisiert (Extension). Mit jedem Zyklus verdoppelt sich so die Anzahl der Kopien des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes.

### 2.5.2 Prinzip der TaqMan PCR

Durch die TaqMan PCR ist gleichzeitig zu einer Amplifikation auch ein spezifischer Nachweis des PCR-Produktes möglich. Außerdem lässt die TaqMan PCR zuverlässige Rückschlüsse auf die Menge an eingesetzter cDNA zu.

Die TaqMan PCR macht sich die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase zu Nutze. Eine spezielle Sonde, deren 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff markiert ist und deren 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff trägt, hybridisiert während der PCR zunächst zwischen den Primern an den Matrizen-cDNA-Strang. Die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes wird dabei durch die räumliche Nähe zum Quencher unterdrückt. In der Extensionsphase trifft dann die Taq-Polymerase auf die Sonde, wodurch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase aktiviert und die Sonde geschnitten wird. Die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher wird unterbrochen, und es kommt zu einem Fluoreszenzsignal, das mit dem ABI PRISM

7700 Sequence Detector erfasst wird. Das detektierte Signal ist sequenzspezifisch, da nicht vollständig bindende Sonden vor der Aktivierung der Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase vom DNA-Strang verdrängt werden, es also nicht zu einem Signal kommt.

Entsprechend der Anreicherung des PCR-Produktes nimmt die Fluoreszenz mit jedem PCR-Zyklus zu. Der ABI PRISM 7700 Sequence Detector misst die Fluoreszenzsignale in Echtzeit und erstellt für jede Probe eine Amplifikationskurve, die die Signalintensität ( $R_n$ ) in Relation zur Zykluszahl zeigt. Der sogenannte Threshold Cycle (Ct-Wert) entspricht dabei der Zykluszahl, bei der erstmals ein exponentieller Anstieg der Reporterfluoreszenz erfolgt. Der Ct-Wert ist abhängig von der eingesetzten Startkopienzahl; in einem PCR-System mit 100% Effizienz führt eine Verdopplung der Startkopienzahl zu einer Abnahme des Ct-Wertes um einen Zyklus.

Da die verwendete Polymerase AmpliTaq Gold eine signifikante Aktivität schon bei Temperaturen von  $> 55^\circ\text{C}$  zeigt, können bei dem TaqMan PCR Programm die Einzelschritte Annealing und Extension zu einem Schritt zusammengefasst werden. Es kann also auf eine separate Extension bei  $72^\circ\text{C}$  (s. 2.5.1) verzichtet werden.

### 2.5.3 Quantifizierungsstrategien

In Verdünnungsreihen aus K562-Zelllinien-cDNA (zweifache Verdünnungsschritte über fünf Verdünnungsstufen, siehe auch Abbildung 1) wird die Expression der Zielsequenz und der endogenen Referenz GAPDH gemessen. Daraus werden Standardkurven für die Zielsequenz und für die endogene Referenz GAPDH erstellt. Für jede einzelne Probe wird über den jeweiligen Ct-Wert die diesem Wert entsprechende Menge an Zielsequenz bzw. an endogener Referenz berechnet. Dann werden die Zielsequenzwerte durch Division auf die endogene Referenz normalisiert. Die Ergebnisse drücken somit ein relatives Expressionsniveau aus.

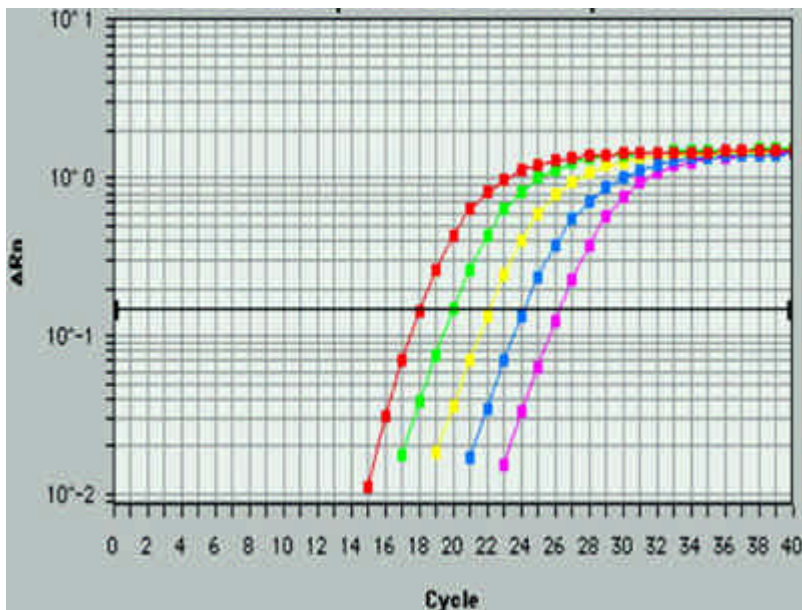


Abbildung 1: Beispiel für eine Verdünnungsreihe in einfacher Ausführung

#### 2.5.4 Verwendete PCR-Primer und Sonden

Die PCR-Primer und Sonden werden mit der Primer Express Software von Perkin Elmer/Applied Biosystems (Foster City, USA) ausgesucht.

Bei der Auswahl der Primer sollte berücksichtigt werden:

- Länge 18-30 Basen
- G+C-Gehalt: ca. 20-80%
- Möglichst keine Poly(T)-Bereiche (unspezifische Bindungen)
- Möglichst keine palindromischen Sequenzabschnitte
- Keine 3'-Komplementarität (Primer-Dimer-Gefährdung)
- Amplicon-Länge: optimal ca. 75-150 bp

|         |              |                                      |
|---------|--------------|--------------------------------------|
| Primer: | GAPDH forw.: | 5'GAA GGT GAA GGT CGG AGT C 3'       |
|         | GAPDH rev.:  | 5'GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC 3'      |
|         | RGS2 forw.:  | 5'CAG GCA GTG GCC ACA AGA GCG A 3'   |
|         | RGS2 rev.:   | 5'TTT GTA AGA AGT AGC TCA AAC GGG 3' |

|                                |                                      |
|--------------------------------|--------------------------------------|
| RGS16 forw.:                   | 5' ATG TGC CGC ACC CTG GC 3'         |
| RGS16 rev.:                    | 5' GTG AAG AAA GAT CCC CAG ACG T 3'  |
| p115 <sup>Rho-GEF</sup> forw.: | 5' TGC CGG GAA ATT CTA CAC CA 3'     |
| p115 <sup>Rho-GEF</sup> rev.:  | 5' ATA GTC CTT GAG CCT CAG CAG G 3'  |
| G? 12 forw.:                   | 5' AGA CGG AAC CGC AGC AAG 3'        |
| G? 12 rev.:                    | 5' ACG AAG CGG ACG TTC TCG 3'        |
| G? 13 forw.:                   | 5' CCC TTA TAC CAC CAC TTC ACC AC 3' |
| G? 13 rev.:                    | 5' TCC TTC ACG TCG CGG AAA 3'        |

Eine TaqMan PCR-Sonde besitzt die folgenden Charakteristika:

- 5'-Reporter-Farbstoff (FAM oder VIC)
- 3'-Quencher-Farbstoff (TAMRA)
- 3'-OH-blockierendes Phosphat

Der fluoreszierende Reporter-Farbstoff FAM (6-Carboxy-Fluorescein) ist kovalent an das 5'-Ende der Sonde geknüpft. Der Quencher-Farbstoff TAMRA (6-Carboxy-Tetramethylrhodamin) wird über ein Linker-Arm-Nukleotid an das 3'-Ende der Sonde gebunden. Schließlich wird die Sonde noch phosphoryliert, um eine Extension des 3'-Endes während der PCR zu vermeiden.

Bei der Sondenauswahl sollte berücksichtigt werden:

- Das 5'-Ende der Sonde sollte nah beim 3'-Ende des Primers liegen (<60 Basen).
- Die Sondenlänge sollte 20-30 Basen betragen.
- GC-Gehalt: 40-60%, keine Poly-Gs

- Am 5'-Ende der Sonde sollte kein G liegen (Gefahr des Autoquenchings).
- Es sollte keine Komplementarität zu den Primern bestehen.

|         |                           |   |
|---------|---------------------------|---|
| Sonden: | GAPDH:                    | 5' CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC 3'                |
|         | RGS2:                     | 5' AGA AGC GAG AAA AGA TGA AAC GGA CCC<br>TT 3' |
|         | RGS16:                    | 5' CCT TCC CCA CCA CCT GCC TGG 3'               |
|         | p115 <sup>Rho-GEF</sup> : | 5' TCA ACC AAG CCG TGC GTG ACA TG 3'            |
|         | G? 12:                    | 5' CTT CCA CCA CTT CAC CAC CGC CA 3'            |
|         | G? 13:                    | 5' CTA TCA ACA CGG AGA ACA TCC GCC 3'           |

Die Kombinationen von Primern und Sonden werden so gewählt, dass eine Exon-Exon-Grenze überbrückt wird, um die Vervielfältigung von genomischer DNA zu vermeiden.

### 2.5.5 Vorgehen

Als Ausgangsmaterial dient die zuvor mittels Reverser Transkription hergestellte cDNA.

Der Reaktionsansatz für die TaqMan PCR setzt sich aus den folgenden Bestandteilen zusammen:

| Komponenten         | Volumen      |
|---------------------|--------------|
| TaqMan Mastermix 2x | 12,5 µl      |
| Forw Primer (10 µM) | 0,125 µl     |
| Rev Primer (10 µM)  | 0,125µl      |
| Sonde (10 µM)       | 0,25 µl      |
| DEPC-Wasser         | 7 µl         |
|                     | <u>20 µl</u> |

Dazugegeben werden 5 µl cDNA. Das entspricht der cDNA aus 25 ng RNA.

Die PCR wird in dem ABI PRISM 7700 Sequence Detector nach folgendem Programm durchgeführt:

- |   |                 |
|---|-----------------|
| 1. UNG-Verdau   | 50°C für 2 min  |
| 2. AmpliTaq Gold-Aktivierung                                      | 95°C für 10 min |
| 3. Denaturierung der DNA  | 95°C für 15 sec |
| 4. Primeranlagerung und DNA-Synthese<br>(Annealing und Extension) | 60°C für 1 min  |

Die Schritte 3. und 4. werden entsprechend der PCR-Zykluszahl 40 mal wiederholt.

Alle Patientenproben werden stets simultan gemessen. Eine 96 well-Platte trägt also 78 Patientenproben, 4 Kontrollproben mit gesundem Knochenmark, 10 K-562-Proben mit der Verdünnungsreihe, die doppelt (2 x 5) gemessen wird, und 2 Leerproben.

Alle Messungen werden mindestens zweifach durchgeführt. Für die weiteren Berechnungen wird der Mittelwert der beiden Messungen verwendet.

## 2.6 Statistische Datenanalyse

Die statistische Datenanalyse erfolgt mit dem Programm SPSS 1.0 für Windows.

Zum Vergleich zweier Gruppen mit ungleicher Varianz dient der Mann-Whitney-U-Test (quantitative Variablen). Mittelwerte der einzelnen Gruppen werden mit der One-way-Analyses of Variance (ANOVA) verglichen. Vergleiche zwischen den verschiedenen Variablen werden mit der bivariaten Korrelation nach Pearson durchgeführt.

Die Kaplan-Meier-Überlebenskurven für die Endpunkte Rückfall, Tod und Letzter Kontakt werden durch den Log-Rank-Test verglichen. Patienten mit einer allogenen Knochenmarktransplantation werden zu deren Zeitpunkt zensiert.

Die Tests werden zweiseitig durchgeführt. P-Werte  $< 0,05$  werden als signifikant eingestuft.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Allgemeines

In bei Erstdiagnose gewonnenen Knochenmarkproben von Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie wurde die Expression von G-Proteinen und RGS-Proteinen untersucht. Die wichtigen Patientencharakteristika sind der Tabelle 3 (2.2.2) zu entnehmen. Nach der RNA-Isolierung und Reversen Transkription erfolgte die Messung der Genexpressionshöhe mittels quantitativer Real-time RT-PCR.

Die 78 Patientenproben wurden zusammen mit den vier gesunden Kontrollen und einer Standardkurve aus Zweifachbestimmungen von fünf seriellen Verdünnungsstufen der Zelllinie K-562 auf einer 96-well-Platte gemessen. Alle Proben wurden somit gleichzeitig analysiert. Jede Messung erfolgte mindestens zweimal. Der Vergleich der Ergebnisse aus den Doppelbestimmungen zeigte einen hohen Grad an Reproduzierbarkeit (siehe Abbildung 2).

Insgesamt wurden sechs Gene gemessen: Das Housekeeping-Gen GAPDH, die G-Proteine G $\alpha$ <sub>12</sub> und G $\alpha$ <sub>13</sub> und die RGS-Proteine RGS2, RGS16 und p115<sup>Rho-GEF</sup>.

Bei den im Folgenden dargestellten Messergebnissen handelt es sich um relative Werte in Bezug zur Genexpression der Zelllinie K-562, wie in Kapitel 2.5.3 beschrieben. Alle Messergebnisse wurden zudem auf GAPDH normalisiert, um Unterschiede in der Menge der einzelnen Patientenprobe zugrundeliegenden cDNA auszugleichen.



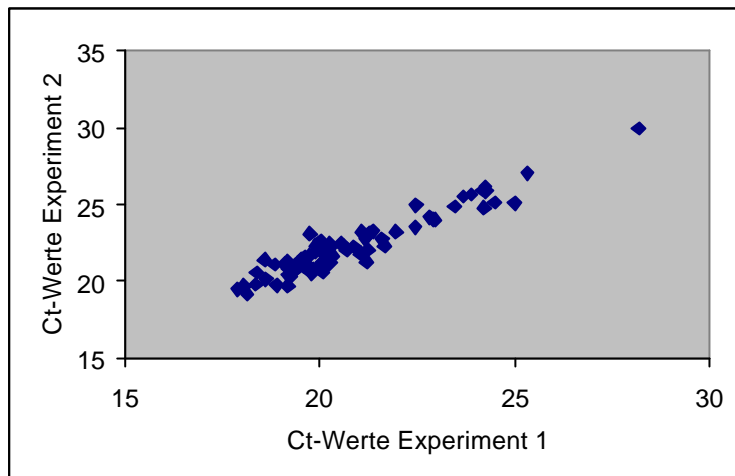


Abbildung 2: Ct-Werte zweier unabhängiger Analysen der GAPDH-Expression

### 3.2 Vergleich der Genexpression zwischen AML-Patienten und Gesunden

Zunächst sollte die Frage beantwortet werden, ob ein Unterschied im Expressionsniveau zwischen den AML-Patienten und den Kontrollen mit gesundem Knochenmark besteht. Dafür wurden die Messwerte der beiden Gruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test für quantitative Werte mit ungleicher Varianz verglichen. Ein signifikanter Unterschied wurde bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  angenommen.

Für die Expression der Gene RGS2, G $\beta$  12 und G $\beta$  13 konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den AML-Patienten und den gesunden Kontrollen gezeigt werden. RGS16 und p115<sup>Rho-GEF</sup> unterschieden sich nicht signifikant in den beiden Gruppen.

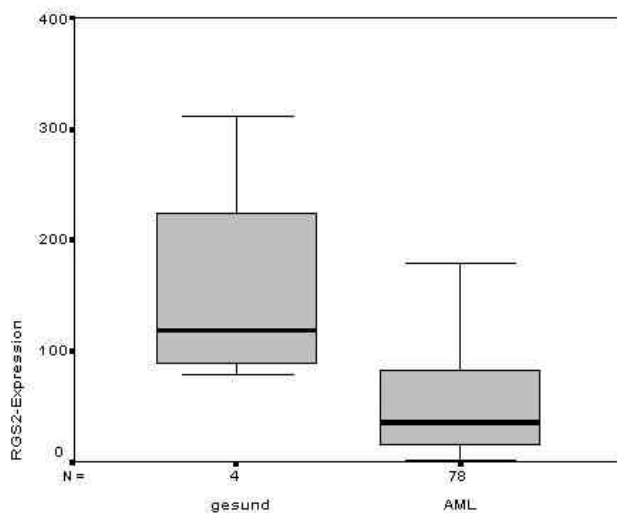
### 3.2.1 RGS2

Die Expression von RGS2 war in den Patientenproben niedriger als in den gesunden Kontrollen (siehe Tabelle 4 und Abbildung 3).

Dieser Unterschied war auf einem Niveau von  $p = 0,023$  signifikant.

**Tabelle 4:**

|            | AML   | Gesund |
|------------|-------|--------|
| N          | 78    | 4      |
| Mittelwert | 69,00 | 156,77 |
| Median     | 36,59 | 118,43 |



**Abbildung 3:** Vergleich der Expression von RGS2 im Knochenmark von AML-Patienten und gesunden Kontrollen.

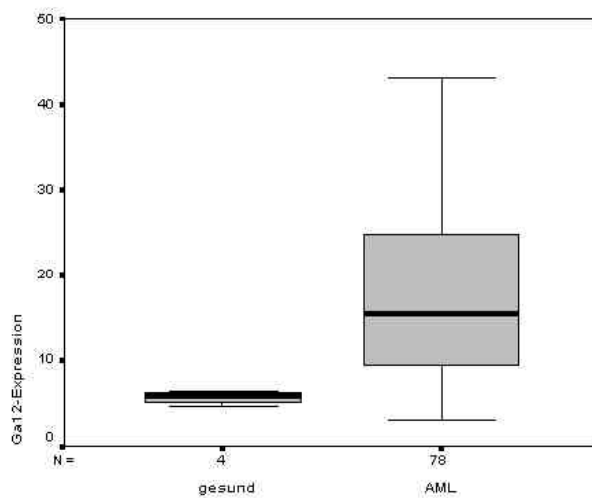
Der Boxplot zeigt die Interquartilbereiche mit 50 % der Werte, den Median und die höchsten/niedrigsten Werte ohne Ausreißer und Extremwerte

## 3.2.2 G? 12

Die Expression von G? 12 war in den Patientenproben im Vergleich zum gesunden Knochenmark erhöht (siehe Tabelle 5 und Abbildung 4). Dieser Unterschied ist signifikant auf einem Niveau von  $p = 0,002$ .

**Tabelle 5:**

|            | AML   | Gesund |
|------------|-------|--------|
| N          | 78    | 4      |
| Mittelwert | 20,83 | 5,78   |
| Median     | 15,56 | 5,89   |



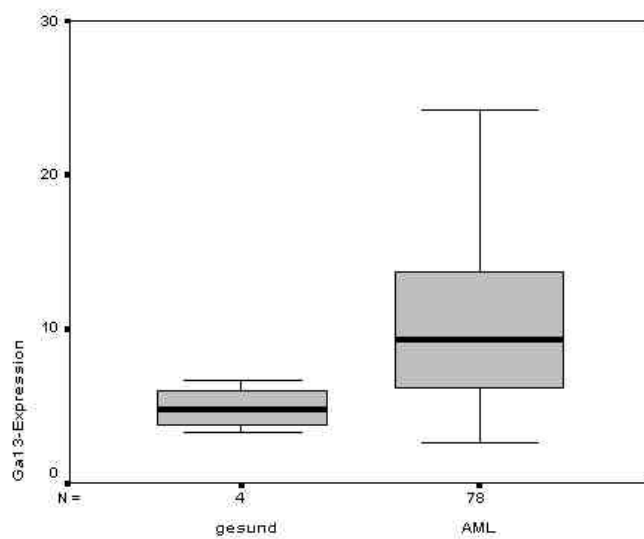
**Abbildung 4:** Vergleich der Expression von G? 12 im Knochenmark von Patienten mit AML und in gesundem Knochenmark.

## 3.2.3 G? 13

Die Expression von G? 13 war in den Patientenproben im Vergleich zum gesunden Knochenmark erhöht (siehe Tabelle 6 und Abbildung 5). Dieser Unterschied war signifikant auf einem Niveau von  $p = 0,008$ .

**Tabelle 6:**

|            | AML   | Gesund |
|------------|-------|--------|
| N          | 78    | 4      |
| Mittelwert | 10,81 | 4,89   |
| Median     | 8,38  | 4,80   |



**Abbildung 5:** Vergleich der Expression von G? 13 im Knochenmark von Patienten mit AML und in gesundem Knochenmark.

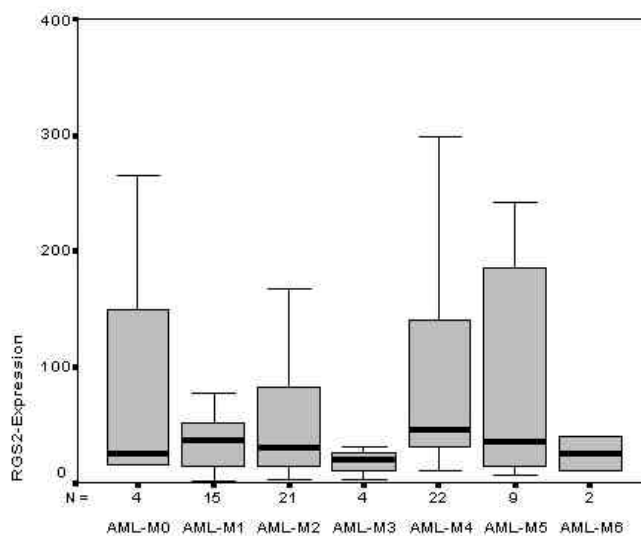
### 3.3 Genexpression und FAB-Typ

Es sollte untersucht werden, ob das Expressionsniveau der G-Proteine und RGS-Proteine mit dem FAB-Typ korreliert. Dafür wurden die Messwerte der verschiedenen Gruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test für quantitative Werte mit ungleicher Varianz verglichen. Ein signifikanter Unterschied wurde bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  angenommen. Der FAB-Typ war für 77 der 78 Patienten bekannt.

Für alle drei RGS-Proteine und für Galpha12 konnten statistisch signifikante Korrelationen gezeigt werden. Die G $\beta$ 13-Expression korrelierte nicht mit dem FAB-Typ.

#### 3.3.1 RGS2

Abbildung 6 zeigt einen Überblick über die RGS2-Expression in den verschiedenen FAB-Typen.

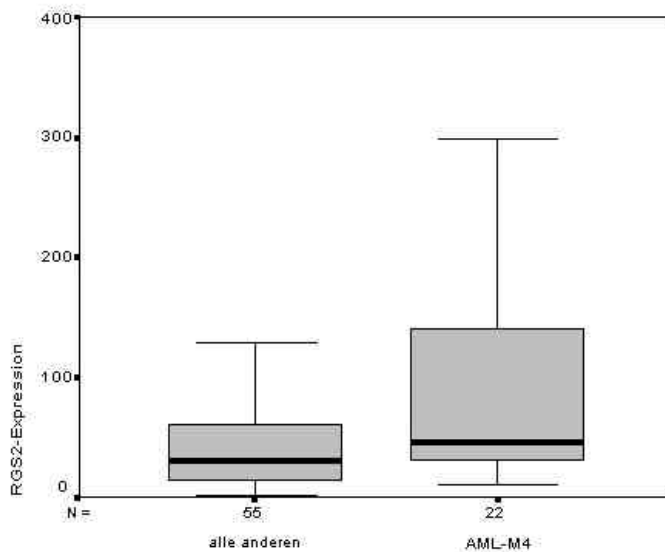


**Abbildung 6:** RGS2-Expression in Abhängigkeit vom FAB-Typ.

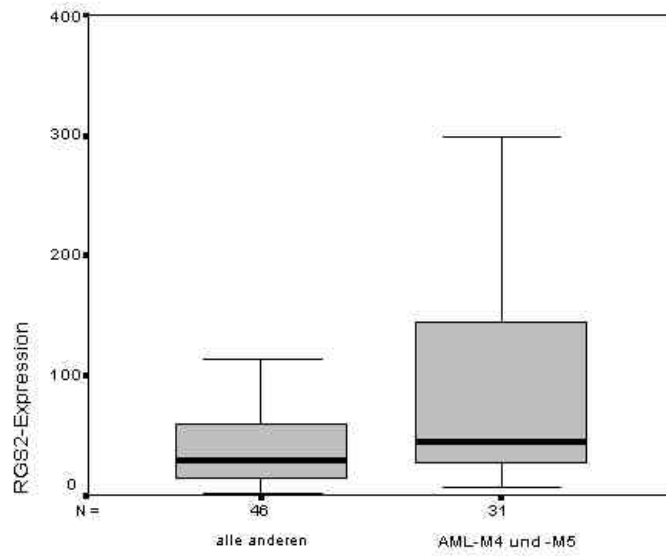
Beim Vergleich der einzelnen FAB-Typen konnte für die AML-M4 eine signifikante Erhöhung ( $p = 0,027$ ) der RGS2-Expression gezeigt werden (siehe Abbildung 7). Von den 22 Patienten mit AML-M4 hatten drei Patienten eine AML-M4eo. Diese drei Patienten mit AML-M4eo unterschieden sich in der RGS2-Expression nicht von den übrigen Patienten mit AML-M4.

Vergleich man die RGS2-Expression für die monozytoid differenzierten AML-M4 und AML-M5 zusammengenommen mit den übrigen Patienten ergab sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied. Die Expression in AML-M4 und -M5 zusammen war auf einem Signifikanzniveau von  $p = 0,023$  erhöht (siehe auch Abbildung 8).

Die Unterschiede im Bereich der anderen FAB-Typen waren nicht signifikant. Auch die niedrige Expression in der AML-M3 war mit  $p = 0,088$  nicht signifikant erniedrigt.



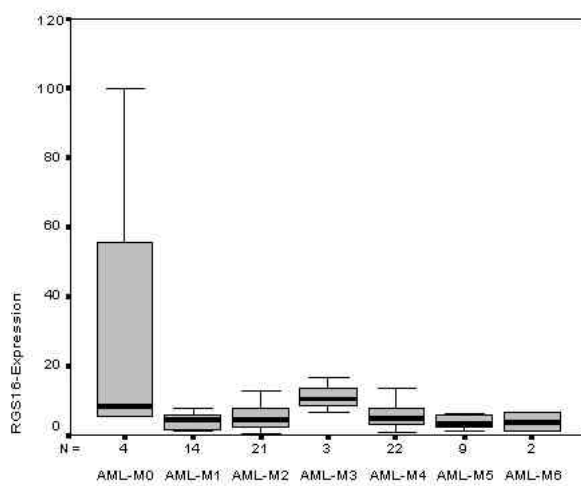
**Abbildung 7:** RGS2-Expression von Patienten mit AML-M4 im Vergleich zu allen anderen Patienten.



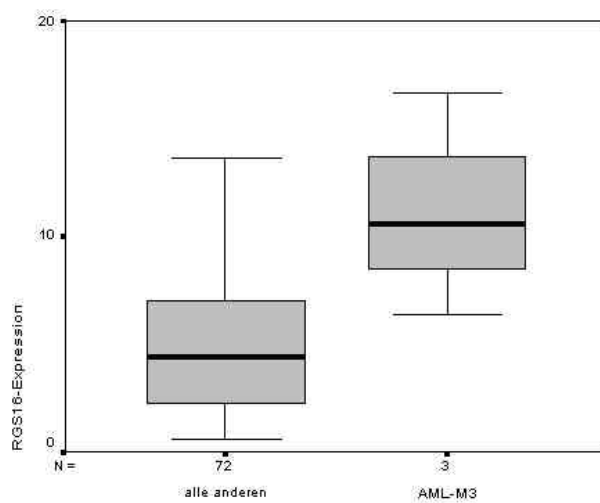
**Abbildung 8:** RGS2-Expression von Patienten mit AML-M4 und -M5 im Vergleich zu allen anderen Patienten.

### 3.3.2 RGS16

Abbildung 9 zeigt einen Überblick über die RGS16-Expression in den verschiedenen FAB-Typen. Beim Vergleich der verschiedenen FAB-Typen zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Expression von RGS16 in der AML-M3 ( $p = 0,047$ ; siehe auch Abbildung 10). Die anderen FAB-Typen unterschieden sich im Expressionsniveau nicht signifikant.



**Abbildung 9:** RGS16-Expression in Abhängigkeit vom FAB-Typ

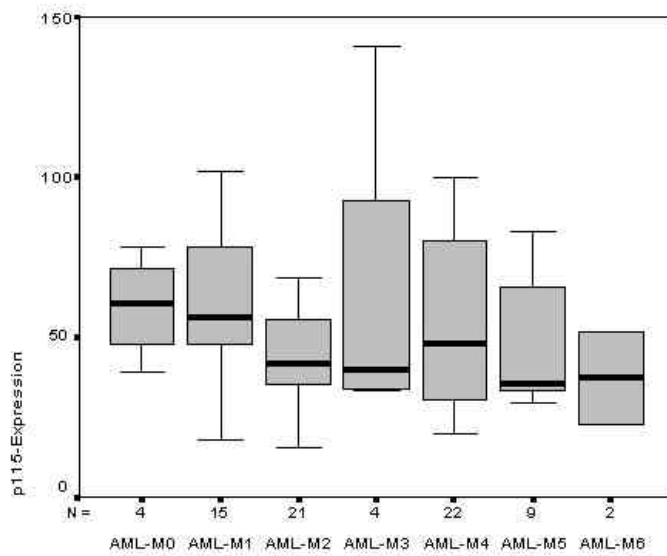


**Abbildung 10:** RGS16-Expression von Patienten mit AML-M3



### 3.3.3 p115<sup>Rho-GEF</sup>

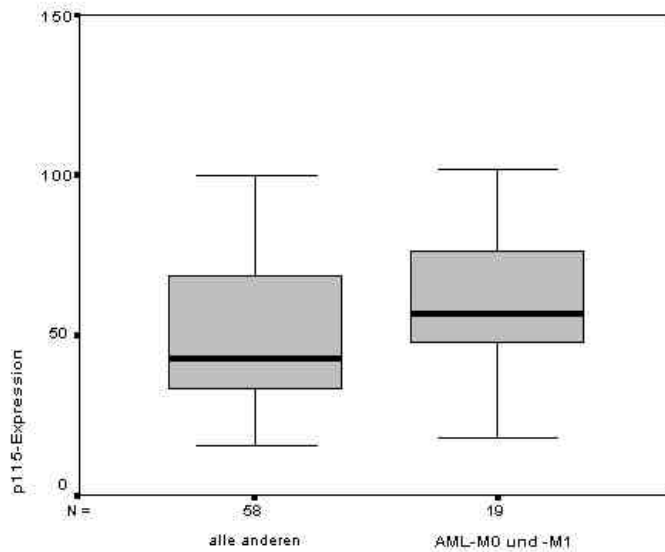
Abbildung 11 zeigt zunächst einen Überblick über die p115<sup>Rho-GEF</sup>-Expression in den verschiedenen FAB-Typen.



**Abbildung 11:** p115-Expression in Abhängigkeit vom FAB-Typ.

Im Vergleich der einzelnen FAB-Typen untereinander fand sich die Expression von p115<sup>Rho-GEF</sup> signifikant erhöht ( $p = 0,045$ ) bei Patienten mit unreifzelliger Leukämie (AML-M0 oder -M1; siehe auch Abbildung 12).

Die anderen FAB-Typen unterschieden sich nicht signifikant in der p115<sup>Rho-GEF</sup>-Expression



**Abbildung 12:** p115-Expression in unreifzelliger Leukämie im Vergleich zu allen anderen Patienten.

### 3.3.4 G? 12

Abbildung 13 zeigt einen Überblick über die Expression von G? 12 in den verschiedenen FAB-Typen.

Beim Vergleich der einzelnen FAB-Typen konnte für die unreifzelligen Leukämien (AML-M0 und -M1) eine signifikante Erhöhung ( $p = 0,032$ ) der G? 12-Expression gezeigt werden (siehe auch Abbildung 14).

Die anderen FAB-Typen unterschieden sich nicht signifikant in der G? 12-Expression.

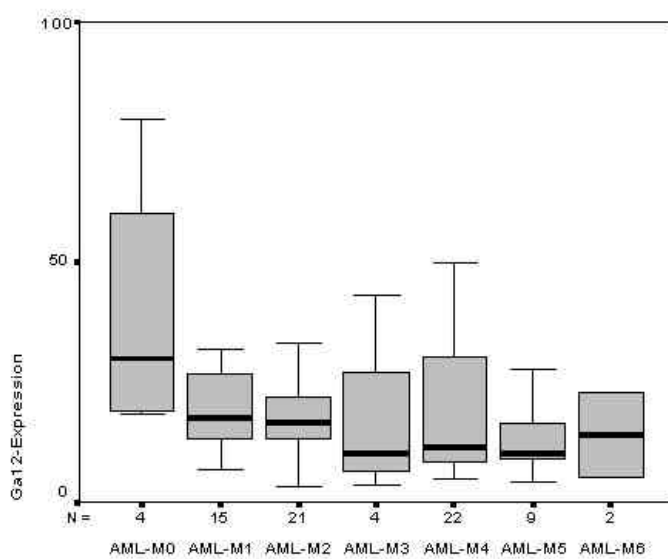


Abbildung 13: G $\beta$  12-Expression in Abhängigkeit vom FAB-Typ

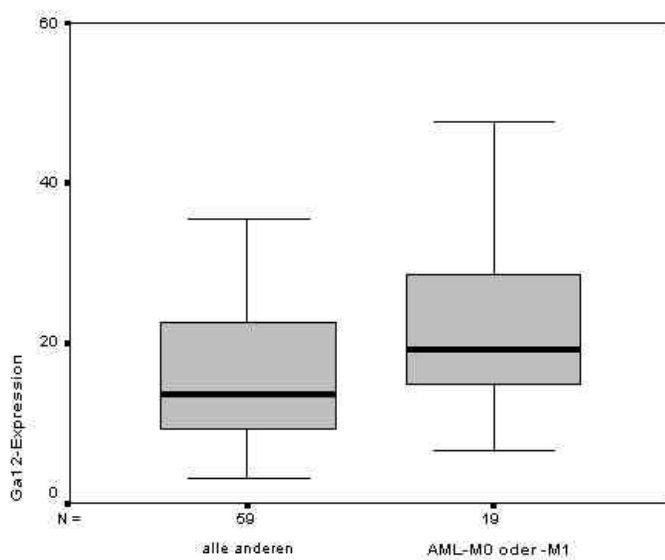
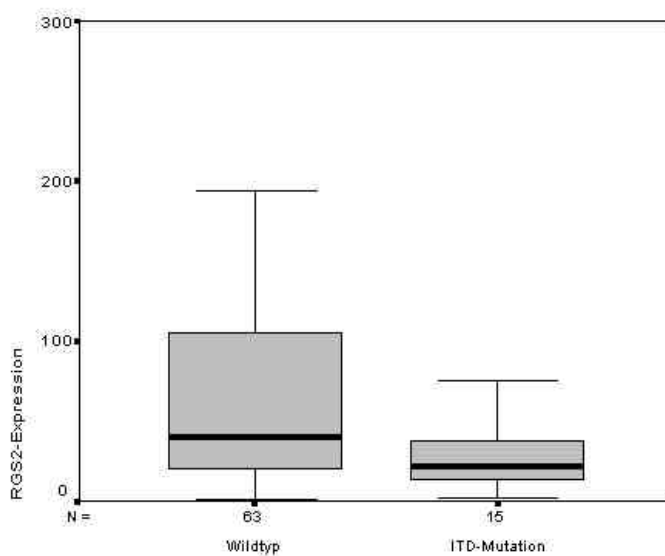


Abbildung 14: G $\beta$  12-Expression von Patienten mit unreifzelliger Leukämie

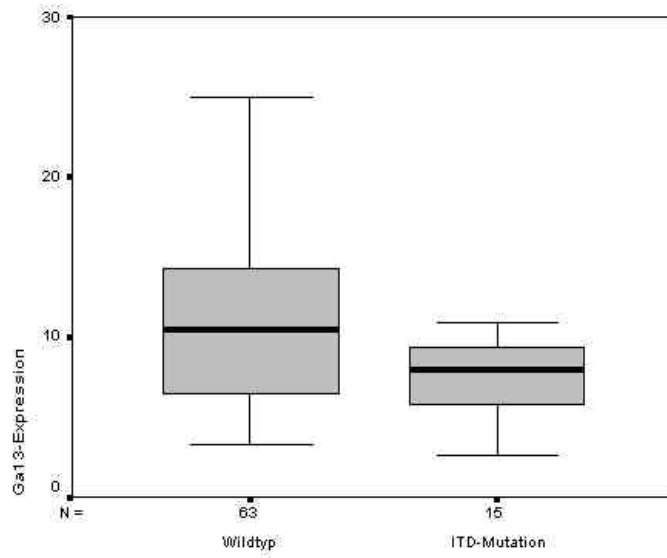
### 3.4 Genexpression und ITD-Mutationen

Mit dem Mann-Whitney-U-Test für quantitative Werte mit ungleicher Varianz wurde untersucht, ob das Expressionsniveau der G-Proteine und RGS-Proteine sich signifikant unterschied bei Patienten mit ITD-Mutationen von Flt3 und Patienten mit Flt3-Wildtyp. Bei 15 der 78 Patienten liegen ITD-Mutationen vor.

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von RGS2 in Patienten mit ITD-Mutationen signifikant erniedrigt war ( $p = 0,044$ ; siehe Abbildung 15). Die Expression von G $\beta$  13 war ebenfalls deutlich erniedrigt, mit  $p = 0,055$  aber außerhalb des statistisch signifikanten Niveaus (siehe Abbildung 16). Die Expression der anderen Gene unterschied sich zwischen den beiden Gruppen nicht.



**Abbildung 15:** Vergleich der RGS2-Expression zwischen Patienten mit ITD-Mutationen von Flt3 und Flt3-Wildtyp.



**Abbildung 16:** Vergleich der Gal3-Expression zwischen Patienten mit ITD-Mutationen und Flt3-Wildtyp.

### 3.5 Korrelation der Genexpression mit sonstigen Patientenmerkmalen

Mit dem Mann-Whitney-U-Test für quantitative Werte mit ungleicher Varianz und mit der bivariaten Korrelation nach Pearson wurde untersucht, ob das Expressionsniveau der G-Proteine und RGS-Proteine mit den folgenden Patientendaten korrelierte:

- Extramedulläre Manifestation
- Initiale Leukozytenzahl
- Initiale Blastenzahl im Blut
- Initiale Blastenzahl im Knochenmark
- Initiale LDH
- Infektionshäufigkeit
- Ergebnis nach Kurs 1
- Zellularität sieben Tage nach Kurs 1
- Blasten im Knochenmark sieben Tage nach Kurs 1
- Ergebnis nach Kurs 2
- Zellularität sieben Tage nach Kurs 2
- Blasten im Knochenmark sieben Tage nach Kurs 2
- Induktionsergebnis
- Zytogenetik

Für diese Daten konnte keine Korrelation mit der Expression der untersuchten Gene aufgezeigt werden.

### 3.6 Genexpression und Prognose

Es sollte untersucht werden, ob das Expressionsniveau der G-Proteine und RGS-Proteine mit dem rezidivfreien Überleben oder dem Gesamtüberleben der AML-Patienten assoziiert ist.

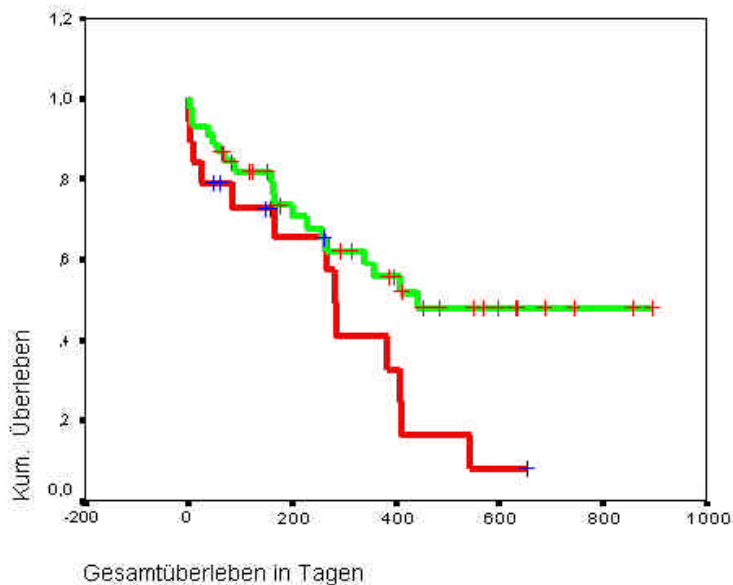
Die Patientenproben wurden für jedes Gen in zwei Gruppen geteilt: eine Gruppe mit hoher Expression und eine Gruppe mit niedriger Expression. Die Gruppen wurden nach dem Mittelwert der jeweiligen Genexpression getrennt. Es wurden Kaplan-Meier-Diagramme erstellt, die mit dem Log-Rank-Test auf einen signifikanten Unterschied verglichen wurden. Ein solcher wurde bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  angenommen.

Für die RGS-Proteine RGS2 und RGS16 ergaben sich signifikante Unterschiede. Die Expressionshöhe der anderen Gene ging nicht mit einem statistisch signifikanten Unterschied der Prognose einher.

#### 3.6.1 RGS2

Der Mittelwert der RGS2-Expression lag bei 69,00. Es fanden sich 56 Patienten in der Gruppe mit niedriger Expression und 22 Patienten in der Gruppe mit hoher Expression. Das durchschnittliche Gesamtüberleben betrug in der Gruppe mit niedriger RGS2-Expression 533 Tage und in der Gruppe mit hoher Expression 284 Tage (siehe Abb. 17). Mit dem Log-Rank-Test ergab sich für diesen Unterschied ein Signifikanzniveau von  $p = 0,036$ .

Für das rezidivfreie Überleben (430 Tage / 334 Tage) ergab sich für die Gruppe mit der niedrigen Expression ebenfalls ein Vorteil, der allerdings nicht statistisch signifikant war.



**Abbildung 17:** Kaplan-Meier-Überlebenskurven für das Gesamtüberleben in

Abhängigkeit von der Höhe der RGS2-Expression

Die grüne Kurve zeigt die Patienten mit niedriger RGS2-Expression, die rote Kurve die mit hoher RGS2-Expression

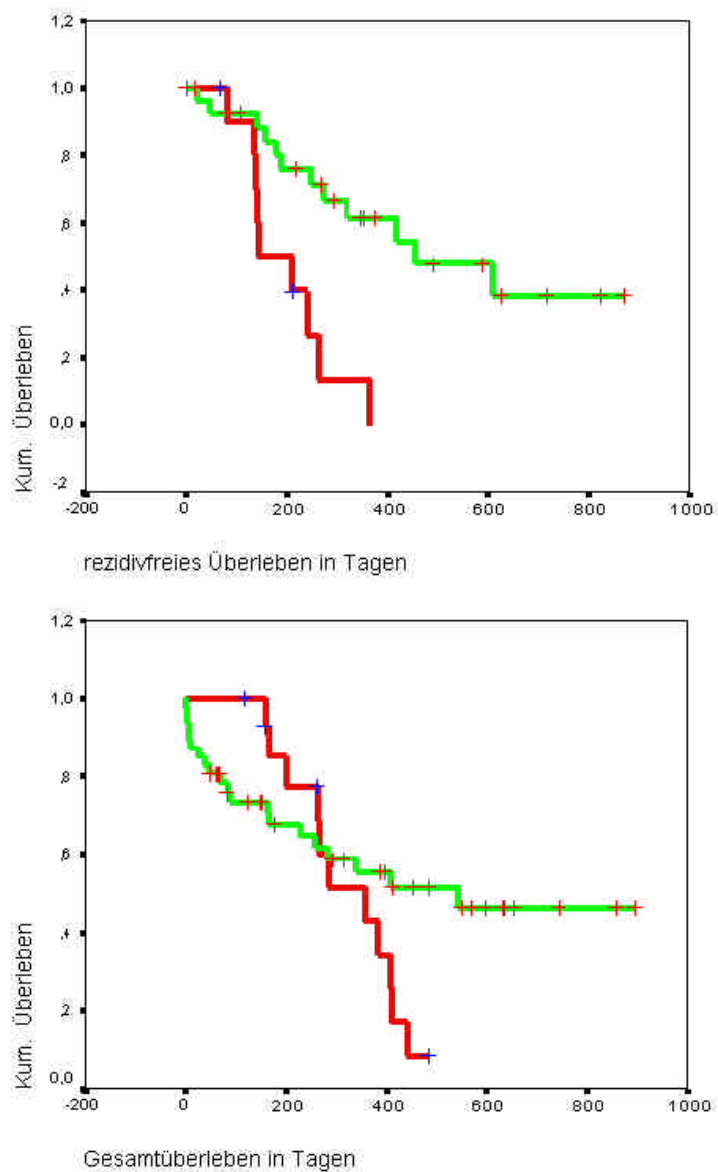
### 3.6.2 RGS16

Der Mittelwert der RGS16-Expression lag bei 7,25. Es befanden sich 57 Patienten in der Gruppe mit niedriger Expression und 19 Patienten in der Gruppe mit hoher Expression.

Das durchschnittliche rezidivfreie Überleben betrug in der Gruppe mit niedriger RGS16-Expression 521 Tage und in der Gruppe mit hoher Expression 201 Tage (siehe Abb. 18). Mit dem Log-Rank-Test ergab sich für diesen Unterschied ein Signifikanzniveau von  $p = 0,0009$ .

Für das Gesamtüberleben bestand mit 512 Tagen gegenüber 323 Tagen für die Gruppe mit niedriger Expression ebenfalls ein Vorteil, der allerdings nicht statistisch signifikant war (siehe Abb. 19).





**Abbildung 18 und 19:** Kaplan-Meier-Überlebenskurven für das rezidivfreie Überleben (oben) und das Gesamtüberleben (unten) in Abhängigkeit von der Höhe der RGS16-Expression

Die grünen Kurven zeigen die Patienten mit niedriger RGS16-Expression, die roten Kurven die mit hoher RGS16-Expression

## 4 Diskussion

G-Protein-vermittelte Signaltransduktionswege sind an grundlegenden Prozessen von Proliferation und Überleben beteiligt.

Die G-Protein-Untereinheiten  $G_{12}$  und  $G_{13}$ , die auch als gep-Onkogene bezeichnet werden, wurden in Zusammenhang mit Weichteiltumoren und Ewing Sarkomen gebracht (12, 76). Ihre aktivierten Mutationen wirken als sehr starke Onkogene in Fibroblasten (33, 71). Über das RGS-Protein  $p115^{\text{Rho-GEF}}$  und das kürzlich beschriebene LARG (Leukemia-associated Rho-GEF) (19) stehen sie in Verbindung mit den kleinen G-Proteinen der Rho-Familie, die als potente Onkogene bekannt sind.

RGS-Proteine regulieren die G-Protein-vermittelten Signalwege negativ. Sie bewirken die Beendigung eines Rezeptorsignals durch Beschleunigung der intrinsischen GTPase-Aktivität der G-Proteine, die sich somit schneller wieder in ihrem GDP-gebundenen inaktiven Zustand befinden. RGS-Proteine können auch als Bindeglieder zwischen heterotrimeren G-Proteinen und anderen Signalwegen wie die der Rho-Familie ( $p115^{\text{Rho-GEF}}$ ) und des Wnt-Signalings (Axin) wirken (23, 24, 34, 79).

Es wurde beschrieben, dass RGS2 eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Adipozyten spielt (51). Für RGS2-defiziente Mäuse konnte eine verminderte T-Zell-Proliferation und eine reduzierte antivirale Immunität gezeigt werden (52). Eine Arbeitsgruppe beschreibt, dass RGS2 im Knochenmark von Patienten mit akuten Hämoblastosen, nicht hingegen im gesunden Knochenmark exprimiert wird (75). Die RGS16- und  $p115^{\text{Rho-GEF}}$ -Expression in myeloischen Zellen ist bislang nicht untersucht worden.

Die vorliegende Arbeit sollte mit Hilfe der TaqMan PCR quantitative Daten zur Expression der G-Proteine  $G_{12}$  und  $G_{13}$  sowie der RGS-Proteine RGS2, RGS16 und  $p115^{\text{Rho-GEF}}$  im gesunden Knochenmark und im Knochenmark von Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie liefern. Es sollte geklärt werden, ob Unterschiede im Expressionsniveau zwischen den Patienten und den gesunden Kontrollen bestehen.

Darüber hinaus wurde untersucht, ob die Höhe der Genexpression mit relevanten Patientenmerkmalen und mit der Prognose korreliert.

#### 4.1 Vergleich der Genexpression zwischen Patienten mit AML und gesunden Kontrollen

Von den hier untersuchten Genen liegen einzig für RGS2 publizierte Daten zur Expression im Knochenmark von Gesunden und von Patienten mit Hämoblastosen vor. Es wurde beschrieben, dass RGS2 nicht im gesunden Knochenmark und nicht im Knochenmark von Patienten im chronischen Stadium einer CML exprimiert wird, wohl aber im Knochenmark von Patienten mit AML, ALL und CML in Blastenkrise (75). Diese Ergebnisse wurden mittels RT-PCR gewonnen.

Im Gegensatz dazu kann in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch im gesunden Knochenmark RGS2 exprimiert wird. Darüber hinaus ist die Expression von RGS2 im Knochenmark von Patienten mit AML signifikant ( $p = 0,023$ ) niedriger als im gesunden Knochenmark.

Diese gegensätzlichen Ergebnisse sind methodisch gut begründbar und illustrieren in beeindruckender Weise die methodischen Probleme der Genexpressionsanalyse mittels Endpunkt RT-PCR. Da die Amplifikation eines Produkts in der Endpunkt-PCR von einer Vielzahl verschiedener experimenteller Bedingungen abhängt, läßt sich aus der Menge des Endproduktes nach Amplifikation nur mit großen Einschränkungen auf die RNA Ausgangsmenge schließen. In der zitierten Arbeit wird jedoch genau dies versucht.

Hingegen ist die Realtime RT-PCR eine quantitative Methode, da sie die Möglichkeit eröffnet, die Amplifikation im linearen Bereich der Produktzunahme zu messen, der direkt von der Menge des Ausgangsmaterials abhängt.

Neben der deutlich geeigneteren Methode konnte in der vorliegenden Arbeit auch erheblich mehr Material untersucht werden. In der zitierten Arbeit wurden 30 AML-Proben untersucht, in der vorliegenden Arbeit 78 AML-Proben. Die größere Probenzahl

sowie die quantitative Methode der Real-Time RT-PCR geben den eigenen Arbeiten erheblich mehr Gewicht, als der zitierten Publikation.

Es wurde beschrieben, dass RGS2 zu Beginn der Differenzierung von Adipozyten stark exprimiert wird und dass RGS2 diese Differenzierung fördert (31, 51). Überträgt man diese Beobachtungen auf die Myelopoese, ist es denkbar, dass sich der Differenzierungsstopp von Leukämiezellen in einer verminderten RGS2-Expression widerspiegelt, wie sie in dieser Arbeit gezeigt wird. Auch könnte die herunterregulierte RGS2-Expression ursächlich an diesem Differenzierungsstopp beteiligt sein. In diesem Zusammenhang ist auch die Beobachtung interessant, dass die RGS2-Expression in den Leukämien der FAB-Typen AML-M4 und AML-M5 signifikant höher ist im Vergleich mit allen anderen FAB-Typen. Bei diesen Leukämietypen sind mehr als 20 % (M4) bzw. mehr als 80 % (M5) der Zellen im Knochenmark monozytoid differenziert. Somit ist denkbar, dass RGS2 bei der Ausdifferenzierung zum Monozyten eine Rolle spielt.

Für die G-Proteine  $G_{12}$  und  $G_{13}$ , die beide zu der  $G_{12}$ -Unterfamilie von G-Proteinen gehören, kann eine signifikante Erhöhung der Genexpression im Knochenmark von Patienten mit AML im Vergleich zum gesunden Knochenmark gezeigt werden. Zu der Expression der beiden Proteine in der Hämatopoese und speziell in der malignen Hämatopoese lagen bislang keine Daten vor.

Es ist beschrieben, dass aktivierte Mutationen von  $G_{12}$  und  $G_{13}$  als sehr potente Onkogene in Fibroblasten wirken (33, 71).  $G_{12}$  und  $G_{13}$  stehen über  $p115^{\text{Rho-GEF}}$  in Verbindung zu den monomeren G-Proteinen der Rho-Familie (19, 23, 37, 40). Proteine der Rho-Familie nehmen eine Schlüsselfunktion bei der Vermittlung der transformierenden Aktivitäten einer Reihe von Onkogenen wie z.B. Ras ein (81).  $G_{12}$  und  $G_{13}$ , die selber als gep-Onkogene bezeichnet werden (76), stehen somit in Verbindung zu diversen anderen Onkogenen. Es erscheint wahrscheinlich, dass sie auch an der Transformation und Proliferation von Leukämiezellen beteiligt sind.

In unseren Patientenproben ist die Expression von  $G_{12}$  und  $G_{13}$  signifikant erhöht, die Expression von  $p115^{\text{Rho-GEF}}$ , das als Verbindungsglied zwischen den G-Proteinen

und Rho fungiert, unterscheidet sich aber nicht zwischen den Patienten und den gesunden Kontrollen. Ein weiteres, erst kürzlich beschriebenes Verbindungsglied zwischen G $\beta$  12 / G $\beta$  13 und Rho ist LARG (Leukemia-Associated Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor; (7)). LARG ist als Fusionspartner des Mixed-Lineage-Leukämieproteins (MLL) in einem Patienten mit AML beschrieben worden (36). Die Messung der Expression von LARG im Knochenmark von AML-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen könnte weitere interessante Ergebnisse liefern.

Die gleichzeitige Erniedrigung der RGS2-Expression und Erhöhung der G $\beta$  12- und G $\beta$  13-Expression deutet auf einen Zusammenhang hin. Bisher konnte nicht gezeigt werden, dass RGS2 auch G-Proteine der G $\beta$ 12-Unterfamilie negativ reguliert (7).

#### 4.2 Genexpression und FAB-Typ

Für alle drei RGS-Proteine sowie für G $\beta$  12 ergeben sich signifikante Unterschiede ihres Expressionsniveaus in den verschiedenen FAB-Typen:

Für RGS16 können wir eine signifikante Erhöhung der Expression in Patienten mit einer Promyelozytenleukämie (AML-M3) zeigen. Dieser Leukämietyp nimmt aufgrund seiner speziellen Biologie, der Möglichkeit einer gezielten Therapie und der guten Prognose eine Sonderstellung unter den Leukämien ein (siehe Kapitel 1.1.6).

Die myeloische Differenzierung der Leukämiezellen stoppt bei der AML-M3 auf der Stufe des Promyelozyten. Dieser Stillstand kann durch die Therapie mit All-trans-Retinsäure selektiv aufgehoben werden.

Die Beobachtung, dass im Knochenmark von Patienten mit einer AML-M3 zum Zeitpunkt der Erstdiagnose die RGS16-Expression signifikant erhöht ist, sollte Anlass zu weiteren Untersuchungen geben. Besonders interessant erscheint dabei, wie sich eine Therapie der AML-M3 mit ATRA und die konsekutive Ausdifferenzierung der Leukämiezellen auf die Expression von RGS16 auswirken.

Weiter konnten wir zeigen, dass die Expression von p115<sup>Rho-GEF</sup> und G $\beta$  12 im Knochenmark von Patienten mit unreifzelligen Leukämien (AML-M0 und AML-M1) signifikant erhöht ist. Diese Leukämien zeichnen sich durch ein Vorherrschen von minimal bis wenig differenzierten Myeloblasten im Knochenmark aus. Insbesondere die Prognose der AML-M0 ist schlecht.

Die RGS2-Expression ist in den monozytoid differenzierten Leukämien der FAB-Typen AML-M4 und AML-M5 signifikant höher im Vergleich mit allen anderen FAB-Typen. Bei diesen Leukämietypen sind mehr als 20 % (M4) bzw. mehr als 80 % (M5) der Zellen im Knochenmark monozytoid differenziert. Zur Diskussion siehe Kapitel 4.1.

#### 4.3 Genexpression und ITD-Mutationen

Bei 15 der 78 Patienten liegen ITD-Mutationen von Flt3 vor. Das entspricht einer Häufigkeit von 19,23 % und liegt somit im Bereich der in der Literatur beschriebenen Häufigkeit von 20 % (49, 78). ITD-Mutationen von Flt3 gehen einher mit einer signifikant schlechteren Prognose (43, 58) siehe auch 1.1.4).

In dieser Arbeit kann eine signifikante Erniedrigung der RGS2-Expression bei der Patientengruppe mit ITD-Mutationen von Flt3 gezeigt werden. Ebenfalls erniedrigt ist in dieser Gruppe die G $\beta$  13-Expression, allerdings ist dieser Unterschied mit  $p = 0,055$  knapp außerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus.

Flt3 vermittelt bedeutende Funktionen in Proliferation, Differenzierung und Überleben (5, 42, 62). In Zellen mit ITD-Mutationen von Flt3 erfolgt eine ligandenunabhängige Flt3-Aktivierung (18, 25, 45, 68).

Die Beobachtung, dass in diesen Zellen die RGS2-Expression herunterreguliert ist, kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass die RGS2-vermittelten Funktionen im Bereich der Regulation von Proliferation und Differenzierung in Leukämiezellen mit ITD-Mutationen auch ohne RGS2 ablaufen können.

#### 4.4 Genexpression und Prognose

Zur Analyse der prognostischen Bedeutung der untersuchten G-Proteine und RGS-Proteine wurden die Proben nach dem Mittelwert der Genexpressionshöhe in zwei Gruppen unterteilt: eine mit hoher und eine mit niedriger Expression. Anschließend wurden Kaplan-Meier-Kurven erstellt, die mit dem Log-Rank-Test verglichen wurden.

Es zeigte sich, dass eine hohe RGS2-Expression mit einem signifikant kürzeren Gesamtüberleben assoziiert ist. Es kann dabei aber kein signifikanter Unterschied in der Remissionsdauer gezeigt werden, die in der Gruppe mit niedriger RGS2-Expression durchschnittlich 477 Tage und in der Gruppe mit hoher Expression 334 Tage beträgt. Das heißt also, dass Patienten mit hoher RGS2-Expression nicht signifikant häufiger oder schneller ein Rezidiv erleiden als Patienten mit niedriger Expression, dennoch aber eine signifikant schlechtere Prognose haben. Der prognostische Unterschied betrifft also den Zeitpunkt nach dem ersten Rezidiv. Ursache könnte somit ein unterschiedliches Ansprechen auf eine Rezidivtherapie sein. Wir konnten ausschließen, dass es sich hierbei um einen Trend handelt, der durch eine ungleiche Verteilung der Häufigkeit von Knochenmarkstransplantationen zwischen den beiden Gruppen zustande kommt. Eine hohe RGS2-Expression geht also mit einer schlechteren Prognose einher. Gleichzeitig ist aber in den mit einer ungünstigen Prognose behafteten Patienten mit ITD-Mutationen von Flt3 die RGS2-Expression signifikant erniedrigt. Diese Beobachtung muss keinen Widerspruch beinhalten. Denkbar ist, dass die hohe RGS2-Expression in den Patienten mit der schlechten Prognose ein Hinweis auf hier gänzlich fehlregulierte Signalwege ist, was unabhängig von sonstigen Faktoren zu einem ungünstigen Verlauf führt.

Ebenfalls ein signifikanter Unterschied zeigt sich zwischen den Patienten mit hoher und niedriger Expression von RGS16:

Patienten mit hoher RGS16-Expression zeigen ein signifikant kürzeres rezidivfreies Überleben als Patienten mit niedriger RGS16-Expression. Das Gesamtüberleben ist in

der Gruppe mit hoher Expression vermindert (323 Tage gegenüber 512 Tage), allerdings nicht auf einem statistisch signifikanten Niveau. In diesem Zusammenhang sollte auch die Beobachtung der erhöhten RGS16 Expression in Patienten mit AML-M3, die ja eine gute Prognose hat, diskutiert werden. Hohe RGS16-Expression kann also einerseits wie im Fall der AML-M3 mit einer guten Prognose einhergehen, betrachtet man die Gesamtheit aller Leukämiepatienten ist sie aber mit einem signifikant verringerten rezidivfreien Überleben behaftet. Auch in diesem Zusammenhang erscheint es interessant, die RGS16-Expression in ATRA-behandelten APL-Zellen zu untersuchen.

Es ist bekannt, dass das p53-Tumorsuppressorgen die Expression von RGS16 induziert (9). Mutationen von p53 bei der AML gehen mit einer schlechten Prognose einher (48, 72). Eine p53-Überexpression in der AML geht mit einer hohen Rate an intramedullärem Zelltod bei erhöhter Chemosensitivität des Knochenmarks und verlängerter Knochenmarkssuppression einher, gleichzeitig aber auch mit dem Vorliegen von leukämischen Blasten mit erhöhter Chemoresistenz (53). Die Expressionshöhe von p53 in den vorliegenden Patientenproben wurde nicht bestimmt. Es wäre interessant zu zeigen, ob die erhöhte RGS16-Expression in den Patienten mit schlechter Prognose mit einer gleichzeitigen Erhöhung der p53-Expression einhergeht, und somit möglicherweise ursächlich auf diese zurückzuführen ist.



## 5 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, nähere Informationen zur Regulation von G-Protein-vermittelter Signalübertragung in der Akuten Myeloischen Leukämie zu erlangen.

Dazu wurde mittels quantitativer Real-Time-PCR die Expression der G-Proteine G $\beta$  12 und G $\beta$  13 sowie der RGS-Proteine RGS2, RGS16 und p115<sup>Rho-GEF</sup> im Knochenmark von Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie gemessen. Die Höhe der Genexpression in den Patientenproben wurde mit der in gesunden Kontrollen verglichen. Es wurde untersucht, ob die Höhe der Genexpression mit bekannten Patientendaten und mit der Prognose korreliert.

Beim Vergleich mit gesundem Knochenmark zeigte sich in den Patientenproben eine signifikant niedrigere RGS2-Expression und eine signifikant erhöhte G $\beta$  12- und G $\beta$  13-Expression.

Für vier Gene konnte eine Korrelation der Genexpression mit dem FAB-Typ gezeigt werden: RGS2 war signifikant erhöht in den monozytoid differenzierten Leukämien AML-M4 und -M5, RGS16 zeigte eine signifikante Erhöhung in der AML-M3 und p115<sup>Rho-GEF</sup> und G $\beta$  12 waren signifikant erhöht in den unreifzelligen Leukämien AML-M0 und-M1.

Beim Vergleich der Genexpression zwischen Patienten mit und ohne ITD-Mutationen von Flt3 konnte für die Gruppe mit Mutationen eine signifikant erniedrigte RGS2-Expression gezeigt werden.

Für die Höhe der RGS2- und der RGS16-Expression ergaben sich signifikante Unterschiede in der Prognose der Patienten: Patienten mit hoher RGS2-Expression zeigten ein vermindertes Gesamtüberleben, Patienten mit hoher RGS16-Expression ein vermindertes rezidivfreies Überleben.

Diese Ergebnisse zeigen, dass G-Proteine und RGS-Proteine, über deren Rolle in der Hämatopoese bislang wenig bekannt war, in Leukämien vielfältig reguliert sind. Das weist darauf hin, dass sie auch in der malignen Hämatopoese wichtige Funktionen

innehaben. Insbesondere die RGS-Proteine RGS2 und RGS16 erscheinen interessant, und ihre Rolle bei der Pathogenese von Leukämien sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

---

## Literaturverzeichnis

1. **Adamson, R. H., and S. M. Seiber.** 1981. Chemically induced leukemia in humans. *Environ Health Perspect* **39**:93-103.
2. **Bennett, J. M., D. Catovsky, M. T. Daniel, G. Flandrin, D. A. Galton, H. R. Gralnick, and C. Sultan.** 1976. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* **33**:451-8.
3. **Bennett, J. M., D. Catovsky, M. T. Daniel, G. Flandrin, D. A. Galton, H. R. Gralnick, and C. Sultan.** 1985. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* **103**:620-5.
4. **Bienz, M., and H. Clevers.** 2000. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* **103**:311-20.
5. **Birg, F., O. Rosnet, N. Carbuccia, and D. Birnbaum.** 1994. The expression of FMS, KIT and FLT3 in hematopoietic malignancies. *Leuk Lymphoma* **13**:223-7.
6. **Bockaert, J., and J. P. Pin.** 1999. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo J* **18**:1723-9.
7. **Booden, M. A., D. P. Siderovski, and C. J. Der.** 2002. Leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor promotes G alpha q-coupled activation of RhoA. *Mol Cell Biol* **22**:4053-61.
8. **Buchner, T., D. Urbanitz, W. Hiddemann, H. Ruhl, W. D. Ludwig, J. Fischer, H. C. Aul, H. A. Vaupel, R. Kuse, G. Zeile, and et al.** 1985. Intensified induction and consolidation with or without maintenance chemotherapy for acute myeloid leukemia (AML): two multicenter studies of the German AML Cooperative Group. *J Clin Oncol* **3**:1583-9.
9. **Buckbinder, L., S. Velasco-Miguel, Y. Chen, N. Xu, R. Talbott, L. Gelbert, J. Gao, B. R. Seizinger, J. S. Gutkind, and N. Kley.** 1997. The p53 tumor

- suppressor targets a novel regulator of G protein signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:7868-72.
10. **Burchett, S. A., M. L. Volk, M. J. Bannon, and J. G. Granneman.** 1998. Regulators of G protein signaling: rapid changes in mRNA abundance in response to amphetamine. *J Neurochem* **70**:2216-9.
  11. **Byrd, J. C., K. Mrozek, R. K. Dodge, A. J. Carroll, C. G. Edwards, D. C. Arthur, M. J. Pettenati, S. R. Patil, K. W. Rao, M. S. Watson, P. R. Koduru, J. O. Moore, R. M. Stone, R. J. Mayer, E. J. Feldman, F. R. Davey, C. A. Schiffer, R. A. Larson, and C. D. Bloomfield.** 2002. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* **100**:4325-36.
  12. **Chan, A. M., T. P. Fleming, E. S. McGovern, M. Chedid, T. Miki, and S. A. Aaronson.** 1993. Expression cDNA cloning of a transforming gene encoding the wild-type G alpha 12 gene product. *Mol Cell Biol* **13**:762-8.
  13. **Chan, R. K., and C. A. Otte.** 1982. Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants supersensitive to G1 arrest by a factor and alpha factor pheromones. *Mol Cell Biol* **2**:21-9.
  14. **Cheson, B. D., P. A. Cassileth, D. R. Head, C. A. Schiffer, J. M. Bennett, C. D. Bloomfield, R. Brunning, R. P. Gale, M. R. Grever, M. J. Keating, and et al.** 1990. Report of the National Cancer Institute-sponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* **8**:813-9.
  15. **Derrien, A., and K. M. Druey.** 2001. RGS16 function is regulated by epidermal growth factor receptor- mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* **276**:48532-8.
  16. **Dhanasekaran, N., S. T. Tsim, J. M. Dermott, and D. Onesime.** 1998. Regulation of cell proliferation by G proteins. *Oncogene* **17**:1383-94.

17. **Dietzel, C., and J. Kurjan.** 1987. Pheromonal regulation and sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* SST2 gene: a model for desensitization to pheromone. *Mol Cell Biol* **7**:4169-77.
18. **Fenski, R., K. Flesch, S. Serve, M. Mizuki, E. Oelmann, K. Kratz-Albers, J. Kienast, R. Leo, S. Schwartz, W. E. Berdel, and H. Serve.** 2000. Constitutive activation of FLT3 in acute myeloid leukaemia and its consequences for growth of 32D cells. *Br J Haematol* **108**:322-30.
19. **Fukuhara, S., H. Chikumi, and J. S. Gutkind.** 2000. Leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor (LARG) links heterotrimeric G proteins of the G(12) family to Rho. *FEBS Lett* **485**:183-8.
20. **Gilman, A. G.** 1995. Nobel Lecture. G proteins and regulation of adenylyl cyclase. *Biosci Rep* **15**:65-97.
21. **Gold, S. J., Y. G. Ni, H. G. Dohlman, and E. J. Nestler.** 1997. Regulators of G-protein signaling (RGS) proteins: region-specific expression of nine subtypes in rat brain. *J Neurosci* **17**:8024-37.
22. **Grignani, F., S. De Matteis, C. Nervi, L. Tomassoni, V. Gelmetti, M. Ciocco, M. Fanelli, M. Ruthardt, F. F. Ferrara, I. Zamir, C. Seiser, M. A. Lazar, S. Minucci, and P. G. Pelicci.** 1998. Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature* **391**:815-8.
23. **Hart, M. J., X. Jiang, T. Kozasa, W. Roscoe, W. D. Singer, A. G. Gilman, P. C. Sternweis, and G. Bollag.** 1998. Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by G $\alpha$ 13. *Science* **280**:2112-4.
24. **Hart, M. J., S. Sharma, N. elMasry, R. G. Qiu, P. McCabe, P. Polakis, and G. Bollag.** 1996. Identification of a novel guanine nucleotide exchange factor for the Rho GTPase. *J Biol Chem* **271**:25452-8.
25. **Hayakawa, F., M. Towatari, H. Kiyoi, M. Tanimoto, T. Kitamura, H. Saito, and T. Naoe.** 2000. Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogene* **19**:624-31.

26. **Heximer, S. P., N. Watson, M. E. Linder, K. J. Blumer, and J. R. Hepler.** 1997. RGS2/G0S8 is a selective inhibitor of Gqalpha function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:14389-93.
27. **Hong, J. X., G. L. Wilson, C. H. Fox, and J. H. Kehrl.** 1993. Isolation and characterization of a novel B cell activation gene. *J Immunol* **150**:3895-904.
28. **Horowitz, M. M., R. P. Gale, P. M. Sondel, J. M. Goldman, J. Kersey, H. J. Kolb, A. A. Rimm, O. Ringden, C. Rozman, B. Speck, and et al.** 1990. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* **75**:555-62.
29. **Huang, M. E., Y. C. Ye, S. R. Chen, J. R. Chai, J. X. Lu, L. Zhao, L. J. Gu, and Z. Y. Wang.** 1988. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* **72**:567-72.
30. **Ichimaru, M., T. Ishimaru, and J. L. Belsky.** 1978. Incidence of leukemia in atomic bomb survivors belonging to a fixed cohort in Hiroshima and Nagasaki, 1950--71. Radiation dose, years after exposure, age at exposure, and type of leukemia. *J Radiat Res (Tokyo)* **19**:262-82.
31. **Imagawa, M., T. Tsuchiya, and T. Nishihara.** 1999. Identification of inducible genes at the early stage of adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **254**:299-305.
32. **Ingi, T., A. M. Krumins, P. Chidiac, G. M. Brothers, S. Chung, B. E. Snow, C. A. Barnes, A. A. Lanahan, D. P. Siderovski, E. M. Ross, A. G. Gilman, and P. F. Worley.** 1998. Dynamic regulation of RGS2 suggests a novel mechanism in G-protein signaling and neuronal plasticity. *J Neurosci* **18**:7178-88.
33. **Jiang, H., D. Wu, and M. I. Simon.** 1993. The transforming activity of activated G alpha 12. *FEBS Lett* **330**:319-22.
34. **Kishida, S., H. Yamamoto, S. Ikeda, M. Kishida, I. Sakamoto, S. Koyama, and A. Kikuchi.** 1998. Axin, a negative regulator of the wnt signaling pathway, directly interacts with adenomatous polyposis coli and regulates the stabilization of beta-catenin. *J Biol Chem* **273**:10823-6.

35. **Koelle, M. R., and H. R. Horvitz.** 1996. EGL-10 regulates G protein signaling in the *C. elegans* nervous system and shares a conserved domain with many mammalian proteins. *Cell* **84**:115-25.
36. **Kourlas, P. J., M. P. Strout, B. Becknell, M. L. Veronese, C. M. Croce, K. S. Theil, R. Krahe, T. Ruutu, S. Knuutila, C. D. Bloomfield, and M. A. Caligiuri.** 2000. Identification of a gene at 11q23 encoding a guanine nucleotide exchange factor: evidence for its fusion with MLL in acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:2145-50.
37. **Kozasa, T., X. Jiang, M. J. Hart, P. M. Sternweis, W. D. Singer, A. G. Gilman, G. Bollag, and P. C. Sternweis.** 1998. p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for Galpha12 and Galpha13. *Science* **280**:2109-11.
38. **Lisovsky, M., Z. Estrov, X. Zhang, U. Consoli, G. Sanchez-Williams, V. Snell, R. Munker, A. Goodacre, V. Savchenko, and M. Andreeff.** 1996. Flt3 ligand stimulates proliferation and inhibits apoptosis of acute myeloid leukemia cells: regulation of Bcl-2 and Bax. *Blood* **88**:3987-97.
39. **Lozzio, C. B., and B. B. Lozzio.** 1975. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* **45**:321-34.
40. **Majumdar, M., T. M. Seasholtz, C. Buckmaster, D. Toksoz, and J. H. Brown.** 1999. A rho exchange factor mediates thrombin and Galpha(12)-induced cytoskeletal responses. *J Biol Chem* **274**:26815-21.
41. **Matanoski, G. M., R. Seltser, P. E. Sartwell, E. L. Diamond, and E. A. Elliott.** 1975. The current mortality rates of radiologists and other physician specialists: specific causes of death. *Am J Epidemiol* **101**:199-210.
42. **McKenna, H. J., K. L. Stocking, R. E. Miller, K. Brasel, T. De Smedt, E. Maraskovsky, C. R. Maliszewski, D. H. Lynch, J. Smith, B. Pulendran, E. R. Roux, M. Teepe, S. D. Lyman, and J. J. Peschon.** 2000. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* **95**:3489-97.
43. **Meshinchi, S., W. G. Woods, D. L. Stirewalt, D. A. Sweetser, J. D. Buckley, T. K. Tjoa, I. D. Bernstein, and J. P. Radich.** 2001. Prevalence and prognostic

- significance of Flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood* **97**:89-94.
44. **Miller, J. R., A. M. Hocking, J. D. Brown, and R. T. Moon.** 1999. Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathways. *Oncogene* **18**:7860-72.
45. **Mizuki, M., R. Fenski, H. Halfter, I. Matsumura, R. Schmidt, C. Muller, W. Gruning, K. Kratz-Albers, S. Serve, C. Steur, T. Buchner, J. Kienast, Y. Kanakura, W. E. Berdel, and H. Serve.** 2000. Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood* **96**:3907-14.
46. **Moreno, I., G. Martin, P. Bolufer, E. Barragan, E. Rueda, J. Roman, P. Fernandez, P. Le n, A. Mena, J. Cervera, A. Torres, and M. A. Sanz.** 2003. Incidence and prognostic value of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations in acute myeloid leukemia. *Haematologica* **88**:19-24.
47. **Mrozek, K., K. Heinonen, A. de la Chapelle, and C. D. Bloomfield.** 1997. Clinical significance of cytogenetics in acute myeloid leukemia. *Semin Oncol* **24**:17-31.
48. **Nakano, Y., T. Naoe, H. Kiyoi, K. Kitamura, S. Minami, S. Miyawaki, N. Asou, K. Kuriyama, S. Kusumoto, C. Shimazaki, H. Akiyama, K. Saito, M. Nishimura, T. Motoji, K. Shinagawa, H. Saito, and R. Ohno.** 2000. Prognostic value of p53 gene mutations and the product expression in de novo acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* **65**:23-31.
49. **Nakao, M., S. Yokota, T. Iwai, H. Kaneko, S. Horiike, K. Kashima, Y. Sonoda, T. Fujimoto, and S. Misawa.** 1996. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **10**:1911-8.
50. **Neer, E. J.** 1995. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* **80**:249-57.
51. **Nishizuka, M., K. Honda, T. Tsuchiya, T. Nishihara, and M. Imagawa.** 2001. RGS2 promotes adipocyte differentiation in the presence of ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* **276**:29625-7.



- 
52. **Oliveira-Dos-Santos, A. J., G. Matsumoto, B. E. Snow, D. Bai, F. P. Houston, I. Q. Whishaw, S. Mariathasan, T. Sasaki, A. Wakeham, P. S. Ohashi, J. C. Roder, C. A. Barnes, D. P. Siderovski, and J. M. Penninger.** 2000. Regulation of T cell activation, anxiety, and male aggression by RGS2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:12272-7.
  53. **Orazi, A., M. Kahsai, K. John, and R. S. Neiman.** 1996. p53 overexpression in myeloid leukemic disorders is associated with increased apoptosis of hematopoietic marrow cells and ineffective hematopoiesis. *Mod Pathol* **9**:48-52.
  54. **Pepperl, D. J., S. Shah-Basu, D. VanLeeuwen, J. G. Granneman, and R. G. MacKenzie.** 1998. Regulation of RGS mRNAs by cAMP in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **243**:52-5.
  55. **Polakis, P.** 2000. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* **14**:1837-51.
  56. **Poppe, B., H. Van Limbergen, N. Van Roy, E. Vandecruys, A. De Paepe, Y. Benoit, and F. Speleman.** 2001. Chromosomal aberrations in Bloom syndrome patients with myeloid malignancies. *Cancer Genet Cytogenet* **128**:39-42.
  57. **Pui, C. H.** 1995. Childhood leukemias. *N Engl J Med* **332**:1618-30.
  58. **Rombouts, W. J., I. Blokland, B. Lowenberg, and R. E. Ploemacher.** 2000. Biological characteristics and prognosis of adult acute myeloid leukemia with internal tandem duplications in the *Flt3* gene. *Leukemia* **14**:675-83.
  59. **Rowley, J. D.** 1998. The critical role of chromosome translocations in human leukemias. *Annu Rev Genet* **32**:495-519.
  60. **Schoch, C., and T. Haferlach.** 2002. Cytogenetics in acute myeloid leukemia. *Curr Oncol Rep* **4**:390-7.
  61. **Severson, R. K., S. Davis, L. Heuser, J. R. Daling, and D. B. Thomas.** 1990. Cigarette smoking and acute nonlymphocytic leukemia. *Am J Epidemiol* **132**:418-22.
  62. **Shurin, M. R., C. Esche, and M. T. Lotze.** 1998. FLT3: receptor and ligand. Biology and potential clinical application. *Cytokine Growth Factor Rev* **9**:37-48.
  63. **Slack, J. L., and R. E. Gallagher.** 1999. The molecular biology of acute promyelocytic leukemia. *Cancer Treat Res* **99**:75-124.

- 
64. **Slovak, M. L., K. J. Kopecky, P. A. Cassileth, D. H. Harrington, K. S. Theil, A. Mohamed, E. Paietta, C. L. Willman, D. R. Head, J. M. Rowe, S. J. Forman, and F. R. Appelbaum.** 2000. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* **96**:4075-83.
65. **Strathmann, M. P., and M. I. Simon.** 1991. G alpha 12 and G alpha 13 subunits define a fourth class of G protein alpha subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:5582-6.
66. **Stryer, L., and H. R. Bourne.** 1986. G proteins: a family of signal transducers. *Annu Rev Cell Biol* **2**:391-419.
67. **Tamirisa, P., K. J. Blumer, and A. J. Muslin.** 1999. RGS4 inhibits G-protein signaling in cardiomyocytes. *Circulation* **99**:441-7.
68. **Tse, K. F., G. Mukherjee, and D. Small.** 2000. Constitutive activation of FLT3 stimulates multiple intracellular signal transducers and results in transformation. *Leukemia* **14**:1766-76.
69. **Tseng, C. C., and X. Y. Zhang.** 1998. Role of regulator of G protein signaling in desensitization of the glucose-dependent insulinotropic peptide receptor. *Endocrinology* **139**:4470-5.
70. **Visani, G., P. Bernasconi, M. Boni, G. L. Castoldi, S. Ciolli, M. Clavio, M. C. Cox, A. Cuneo, G. Del Poeta, D. Dini, D. Falzetti, R. Fanin, M. Gobbi, A. Isidori, F. Leoni, V. Liso, M. Malagola, G. Martinelli, C. Mecucci, P. P. Piccaluga, M. C. Petti, R. Rondelli, D. Russo, M. Sessarego, G. Specchia, N. Testoni, G. Torelli, F. Mandelli, and S. Tura.** 2001. The prognostic value of cytogenetics is reinforced by the kind of induction/consolidation therapy in influencing the outcome of acute myeloid leukemia--analysis of 848 patients. *Leukemia* **15**:903-9.
71. **Voyno-Yasenetskaya, T. A., A. M. Pace, and H. R. Bourne.** 1994. Mutant alpha subunits of G12 and G13 proteins induce neoplastic transformation of Rat-1 fibroblasts. *Oncogene* **9**:2559-65.

- 
72. **Wattel, E., C. Preudhomme, B. Hecquet, M. Vanrumbeke, B. Quesnel, I. Dervite, P. Morel, and P. Fenaux.** 1994. p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood* **84**:3148-57.
73. **Weinstein, H. J.** 1978. Congenital leukaemia and the neonatal myeloproliferative disorders associated with Down's syndrome. *Clin Haematol* **7**:147-54.
74. **Wingo, P. A., T. Tong, and S. Bolden.** 1995. Cancer statistics, 1995. *CA Cancer J Clin* **45**:8-30.
75. **Wu, H. K., H. H. Heng, X. M. Shi, D. R. Forsdyke, L. C. Tsui, T. W. Mak, M. D. Minden, and D. P. Sidrovski.** 1995. Differential expression of a basic helix-loop-helix phosphoprotein gene, GOS8, in acute leukemia and localization to human chromosome 1q31. *Leukemia* **9**:1291-8.
76. **Xu, N., T. Voyno-Yasenetskaya, and J. S. Gutkind.** 1994. Potent transforming activity of the G13 alpha subunit defines a novel family of oncogenes. *Biochem Biophys Res Commun* **201**:603-9.
77. **Xu, X., W. Zeng, S. Popov, D. M. Berman, I. Davignon, K. Yu, D. Yowe, S. Offermanns, S. Muallem, and T. M. Wilkie.** 1999. RGS proteins determine signaling specificity of Gq-coupled receptors. *J Biol Chem* **274**:3549-56.
78. **Yokota, S., H. Kiyoi, M. Nakao, T. Iwai, S. Misawa, T. Okuda, Y. Sonoda, T. Abe, K. Kahsima, Y. Matsuo, and T. Naoe.** 1997. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines. *Leukemia* **11**:1605-9.
79. **Zeng, L., F. Fagotto, T. Zhang, W. Hsu, T. J. Vasicek, W. L. Perry, 3rd, J. J. Lee, S. M. Tilghman, B. M. Gumbiner, and F. Costantini.** 1997. The mouse Fused locus encodes Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation. *Cell* **90**:181-92.
80. **Zhang, Y., S. Y. Neo, J. Han, L. P. Yaw, and S. C. Lin.** 1999. RGS16 attenuates galphaq-dependent p38 mitogen-activated protein kinase activation by platelet-activating factor. *J Biol Chem* **274**:2851-7.

81. **Zohn, I. M., S. L. Campbell, R. Khosravi-Far, K. L. Rossman, and C. J. Der.** 1998. Rho family proteins and Ras transformation: the RHOad less traveled gets congested. *Oncogene* **17**:1415-38.

**Lebenslauf**

Name Annika Rudat  
Geburtsdatum 18.04.1976  
Geburtsort Bielefeld  
Familienstand ledig

## Schulausbildung:

1982 – 1986 Stieghorster Grundschule Bielefeld  
1986 – 1995 Cecilien Gymnasium Bielefeld

## Studium:

10/95 – 05/02 Studium der Humanmedizin an der Westfälischen Wilhelms-  
Universität Münster und an der Medizinischen Fakultät der  
Universität Córdoba, Spanien  
08/97 Ärztliche Vorprüfung  
08/98 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
04/01 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
05/02 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

## Berufliche Tätigkeit:

seit 08/2002 Ärztin im Praktikum in der Medizinischen Klinik A (Hämatologie  
und Onkologie) der Universitätsklinik Münster

Münster, 24.03.2003

## **Danksagung**

Herrn Univ.-Prof. Dr. H. L. Serve danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Ihm und allen Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe gilt mein herzlichster Dank für eine außergewöhnlich gute Arbeitsatmosphäre, die viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Für ständige Gesprächs- und Diskussionsbereitschaft sowie konstruktive Kritik bei der Betreuung dieser Arbeit bedanke ich mich bei Herrn Dr. J. Schwäble.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Medizinstudium ermöglicht und mich stets mit großem Verständnis unterstützt haben.