

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

**Die Rolle von Zyklin D1 und *Amino-terminal Enhancer of Split* in der molekularen Pathogenese der Akuten Myeloischen
Leukämie
(AML)**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Marcel-Philipp Henrichs

aus Wesel

2009

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Carsten Müller-Tidow
2. Berichterstatter: Prof. Dr. phil. nat. Andreas Bräuninger

Tag der mündlichen Prüfung: 04.11.2009

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

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Carsten Müller-Tidow
2. Berichterstatter: Prof. Dr. phil. nat. Andreas Bräuninger

Zusammenfassung

Die Rolle von Zyklin D1 und *Amino-terminal Enhancer of Split* in der molekularen Pathogenese der Akuten Myeloischen Leukämie (AML)
Marcel-Philipp Henrichs

Die Akute Myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne Erkrankung des hämatopoetischen Systems und gekennzeichnet durch das unkontrollierte, klonale Wachstum unreifer hämatopoetischer Vorläuferzellen. Zu den am häufigsten bei der AML nachweisbaren genetischen Alterationen gehören Mutationen der Rezeptortyrosinkinase Flt3 und chromosomale Translokationen. Diese beeinflussen Proliferation, Differenzierung und Selbsterneuerungsfähigkeit sowie die Signaltransduktionswege in hämatopoetischen Zellen und führen somit zur Entstehung der AML.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PML-RAR α und Flt3-ITD die Expression von Zyklin D1, einem wichtigen Regulator des Zellzyklus, induzieren. Das Fusionsprotein PML-RAR α induziert die Translation von Zyklin D1 während Flt3-ITD vornehmlich zur Induktion der Transkription führt. Zudem ergaben die Untersuchungen, dass die Induktion von Zyklin D1 durch Flt3-ITD über den PI3-Kinase/AKT Signaltransduktionsweg geschieht.

Amino-terminal Enhancer of Split (AES) gehört zu den *Transducin-like Enhancer of Split* (TLE), einer Gruppe von transkriptionellen Co-Repressoren. AES ist jedoch eine verkürzte Form und führt durch Rekrutierung von TCF-Transkriptionsfaktoren zur Aktivierung von wnt-Zielgenen. Experimente zeigten, dass AES durch die Fusionsproteine in der AML sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene heraufreguliert wird. Es konnte nachgewiesen werden, dass AES sowohl in immortalen Zellen als auch in Knochenmarkproben von AML-Patienten überexprimiert wird. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Überexpression von AES zu gesteigerter Proliferation und Selbsterneuerungsfähigkeit in 32D Zellen führt. Eine Herunterregulation mündet in vermindertem Kolonienwachstum.

Genehmigungsbescheid der Tierversuche vom 15.04.2005 (G15/2005)

Tag der mündlichen Prüfung: 04.11.2009

Meiner Familie,
in Gedenken an Philipp Henrichs

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|---|
| 4E-BP1 | 4E-bindendes Protein 1 |
| AES | <i>Amino-terminal Enhancer of Split</i> |
| AKT | <i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i> |
| ALL | Akute Lymphatische Leukämie |
| AML | Akute Myeloische Leukämie |
| Ap-1 | Aktivatorprotein 1 |
| APL | Akute Promyelozytenleukämie |
| ATRA | <i>all-trans</i> Retinsäure |
| C/EBP α | <i>Ccaat-enhancer-binding protein α</i> |
| CBF- β | <i>core binding factor β</i> |
| CDK | Zyclinabhängige Kinase |
| CFU | Koloniebildende Einheit |
| c-myc | <i>oncogene of the MC29 avian myelocytomatosis virus</i> |
| CSF-1 | Koloniestimulierender Faktor 1 |
| DMP1 | <i>dentin matrix acidic phosphoprotein 1</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| eIF | <i>eukaryotic initiation factor</i> |
| ETO | <i>eight twentyone</i> |
| EtOH | Ethanol |
| FACS | <i>fluorescence activated cell sorting</i> |
| FCS | fetales Kälberserum |
| FL | Flt3-Ligand |
| Flt3 | <i>fms-like tyrosinkinase 3</i> |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| GFP | grün-fluoreszierendes Protein |
| Grg5 | <i>Groucho related gene 5</i> |
| h | Stunde |
| HDAC | Histondeacetylase |
| HuN-CoR | <i>human nuclear receptor corepressor</i> |
| IL-3 | Interleukin 3 |

| | |
|--------------------|--|
| ITD | <i>internal tandem duplication</i> |
| KIT | <i>v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i> |
| LIF | Leukämie inhibierender Faktor |
| MDS | Myelodysplastisches Syndrom |
| MEF | <i>myeloid elf 1 like factor</i> |
| ml | Milliliter |
| MPO | Myeloperoxidase |
| mRNA | <i>messenger Ribonukleinsäure</i> |
| mTOR | <i>mammalian target of rapamycin</i> |
| NADPH | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat |
| NBM | normales Knochenmark |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> |
| PDGF-R β | <i>platelet derived growthfactor receptor β</i> |
| PI3K | Phosphatidylinositol-3-Kinase |
| PKC412 | ein Proteinkinaseinhibitor (N-Benzoylstauosporin) |
| PLZF | Promyelozytenleukämie Zinkfingerprotein |
| PML-RAR α : | Promyelozytenleukämie Retinsäurerezeptor α |
| pRb | Retinoblastomprotein |
| PTEN | Phosphatase und Tensin homolog |
| PU.1 | Transkriptionsfaktor der ets-Proteinfamilie |
| RAC1 | <i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i> |
| RAS/MAPK | <i>rat sarcoma/mitogen-activated protein kinase</i> |
| ROS | <i>radical/reactive oxygen species</i> |
| RTK | Rezeptortyrosinkinase |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion |
| shRNA | <i>small hairpin RNA</i> |
| Smad3 | <i>mothers against decapentaplegic homolog 3</i> |
| STAT | <i>signal transducer and activator of transcription</i> |
| TCF | TCF7L2 (<i>Transcription factor 7-like 2</i>) |
| TLE | <i>Transducin - like Enhancer of Split</i> |
| TSA | Trichostatin A |
| UBP43 | Ubiquitin-spezifische Protease, 43kDa |

| | |
|------|------------------------------------|
| VEGF | vascular endothelial growth factor |
| WHO | Weltgesundheitsorganisation |
| Wnt | <i>Wingless</i> und <i>Int-1</i> |
| wt | Wildtyp |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | Akute Myeloische Leukämie – Einführung | 1 |
| 1.2 | Diagnose und Klassifikation..... | 2 |
| 1.3 | Aspekte der molekularen Pathogenese der Akuten Myeloischen Leukämie | 5 |
| 1.4 | Die Rolle der Fusionsproteine | 7 |
| 1.4.1 | AML1-ETO | 7 |
| 1.4.2 | PML-RAR α | 11 |
| 1.5 | Die Rezeptortyrosinkinase Flt3 | 13 |
| 1.6 | Zyclin D1 und <i>Amino-terminal Enhancer of Split</i> : | |
| | Regulation durch Fusionsproteine in der AML | 17 |
| 1.6.1 | Zyclin D1..... | 17 |
| 1.6.2 | <i>Amino-terminal Enhancer of Split</i> | 20 |
| 2 | MATERIAL UND METHODEN | 23 |
| 2.1 | Zelllinien und Kulturbedingungen | 23 |
| 2.1.1 | Zelllinien..... | 23 |
| 2.1.1.1 | NB4-Zellen..... | 23 |
| 2.1.1.2 | U937-Zellen..... | 23 |
| 2.1.1.3 | 32D-Zellen..... | 24 |
| 2.1.1.4 | Patientenproben..... | 24 |
| 2.1.2 | Kulturbedingungen | 24 |
| 2.1.3 | Zellbehandlungen | 25 |
| 2.2 | Vektoren und Plasmide..... | 25 |
| 2.3 | Oligonukleotide | 26 |
| 2.4 | shRNA Konstrukte | 27 |
| 2.5 | Transfektionen | 29 |
| 2.6 | Protein-Isolation und Westernblots | 29 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.7 | RNA-Isolation, Reverse Transkription und <i>Real-Time</i> RT-PCR | 30 |
| 2.8 | Retrovirale Transduktion von primärem Mausknochenmark..... | 32 |
| 2.9 | Klonales Wachstum in Methylzellulose (Kolonie-Assay) | 33 |
| 2.10 | <i>Replating</i> | 33 |
| 2.11 | <i>Tissue Micro Arrays</i> | 34 |
| 3 | ERGEBNISSE | 35 |
| 3.1 | Regulation von Zyklin D1 | 35 |
| 3.1.1 | Regulation von Zyklin D1 in der Promyelozyten-Leukämiezelllinie NB4..... | 35 |
| 3.1.1.1 | Regulation der Zyklin D1 Expression durch PML-RAR α | 36 |
| 3.1.1.2 | Regulation der Zyklin D1 Expression durch Flt3-ITD allein und in Kombination mit PML-RAR α | 38 |
| 3.1.2 | Einfluss von Flt3-ITD auf die Expression von Zyklin D1 und Effektoren des PI3K/AKT Signaltransduktionsweges in 32D-Zellen..... | 41 |
| 3.2 | Regulation von <i>Amino-terminal Enhancer of Split</i> (AES)..... | 44 |
| 3.2.1 | Einfluss von Fusionsproteinen auf die Expression von AES..... | 44 |
| 3.2.2 | Expression von AES in 32D-Zellen..... | 47 |
| 3.2.3 | Expression von AES in murinem Gewebe..... | 49 |
| 3.2.4 | Expression von AES in humanen Zelllinien..... | 49 |
| 3.2.5 | Expression von AES in Knochenmark von AML-Patienten..... | 50 |
| 3.3 | Die Rolle von AES in Wachstum, Proliferation und Selbsterneuerung..... | 52 |
| 3.3.1 | Auswirkungen der Überexpression von AES in primären Mausknochenmarkzellen..... | 52 |
| 3.3.2 | Auswirkungen der Herunterregulation von AES durch shRNA | 55 |
| 4 | DISKUSSION..... | 57 |
| 4.1 | Zyklin D1..... | 57 |
| 4.2 | <i>Amino-terminal Enhancer of Split</i> | 63 |
| 4.3 | Zyklin D1 und AES: Effektoren in der Pathogenese der AML..... | 68 |

| | | |
|----------|-------------------------------------|-----------|
| 5 | LITERATURVERZEICHNIS | 70 |
| 6 | DANKSAGUNG..... | 79 |
| 7 | LEBENS LAUF | 80 |
| 8 | TIERVERSUCHSGENEHMIGUNG..... | 81 |

1 Einleitung

1.1 Akute Myeloische Leukämie – Einführung

Die Hämatopoese ist ein sehr genau gesteuerter Prozess, bei dem sich aufgrund einer Stimulation durch verschiedene Wachstumsfaktoren aus einigen wenigen hämatopoetischen Stammzellen durch Zellteilung und Differenzierung die Zellen der verschiedenen Zellreihen entwickeln: Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten. Die Akute Myeloische Leukämie (AML) ist eine Erkrankung dieses blutbildenden Systems. Durch unkontrollierte Proliferation und schnelle Expansion maligne transformierter myeloischer Vorläuferzellen im Knochenmark kommt es zu einer Ausschwemmung der unreifen Blasten ins Blut und einer Einschränkung der physiologischen Hämatopoese. Dies führt zu einer Knochenmarksinsuffizienz mit Anämie, Thrombozytopenie und Granulozytopenie.

Die AML ist meist eine Erkrankung des Erwachsenenalters. Die jährliche Inzidenz liegt bei 2-4 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner im Jahr und nimmt mit zunehmenden Alter auf 15 pro 100.000 Einwohner/Jahr im Alter von > 65 Jahren zu. Die Erkrankung hat eine schlechte Prognose. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate von Patienten unter 65 Jahren wird in klinischen Studien mit etwa 40% und in einer groß angelegten amerikanischen epidemiologischen Untersuchung mit 32,7% angegeben [19; 68; 104]. Mit zunehmendem Alter verschlechtert sich die Prognose drastisch. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate der über 75-Jährigen beträgt nur noch etwa 2%. Die Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeiten für fünf Jahre liegen in Europa und den USA bei etwa 20% [104; 116].

Die genaue Ätiologie der AML ist bisher noch nicht vollständig geklärt, man weiß jedoch um Faktoren, die die Entstehung der Leukämie begünstigen. Dazu zählen unter anderem ionisierende Strahlen (Nuklearwaffenangriffe, berufliche Exposition, Strahlentherapie), Chemikalien (Benzol ist z.B. nach Nr. 1303 der Berufskrankheitenverordnung als leukämogene Substanz anerkannt) und eine Therapie mit Zytostatika (vor allem alkylierende Substanzen und Topoisomerase-II-Inhibitoren). Etwa 10-15% aller Akuten Myeloischen Leukämien entstehen sekundär aus einem häufig langjährig bestehendem myelodysplastischen Syndrom (MDS).

Durch intensive Erforschung der molekularbiologischen Zusammenhänge der AML konnten in den letzten Jahren entscheidende Fortschritte bei der Untersuchung charakteristischer genetischer Veränderungen erzielt werden, die dieser Erkrankung zu Grunde liegen und im Folgenden weiter erläutert werden. Diese Erkenntnisse haben in der Vergangenheit bereits zur Entwicklung neuer Therapiekonzepte geführt. So besteht die Hoffnung, dass das zunehmende Verstehen der molekularpathologischen Zusammenhänge in der AML zu einer deutlichen Verbesserung der meist noch immer schlechten Prognose der Patienten führt.

1.2 Diagnose und Klassifikation

Ein Patient mit einer AML präsentiert sich mit den Symptomen infolge der Knochenmarksinsuffizienz (Müdigkeit und Abgeschlagenheit, verstärkte Blutungsneigung, vermehrte Infektionen). Die Knochenmarkszytologie ist die entscheidende Untersuchung zur Diagnosestellung. Ausschlaggebend ist der Infiltrationsgrad des Knochenmarks durch unreife Vorläuferzellen (Blasten). Ab einem Infiltrationsgrad von 30% (20% nach WHO, siehe unten) spricht man von einer akuten Leukämie. Aufgrund morphologischer, zytochemischer und immunphänotypischer Eigenschaften der Blasten kann man die AML von der Akuten Lymphatischen Leukämie (ALL) abgrenzen. Ein wichtiges Kriterium ist dabei der zytochemische Nachweis der Myeloperoxidase (MPO). Falls dieser Nachweis nicht gelingt, kann die Diagnose meist anhand der Immunphänotypisierung erfolgen. Charakteristisch ist hierbei der Nachweis myeloischer Oberflächenmarker bei fehlendem Nachweis lymphatischer Oberflächenmarker. Die AML ist eine heterogene Erkrankung. Abhängig vom Grad der Differenzierung der Blasten und deren zytochemischen Eigenschaften, kann man die AML in weitere Subtypen einteilen. Dies geschieht nach der *French-American-British* (FAB) Klassifikation, die eine Einteilung in neun verschiedene Gruppen vorsieht (siehe Tabelle 1.1).

| FAB-Klassifikation der Akuten Myeloischen Leukämie | | | | | | |
|--|--|-----------|-----|-----|-----|--|
| FAB | Name | Vorkommen | MPO | NBE | PAS | Zytopenetik |
| M0 | Akute myeloische Leukämie, minimal differenziert | 8% | - | - | - | inv (3q26), t(3;3) (1%) |
| M1 | Akute Myeloblastenleukämie | 15% | +/- | - | - | |
| M2 | Akute Myeloblastenleukämie mit Ausreifung | 25% | ++ | - | - | t(8;21) (40%) |
| M3 | Akute Promyelozytenleukämie | 10% | +++ | - | +/- | t(6;9) (1%) t(15;17) (98%) |
| M4 | Akute myelomonozytäre Leukämie | 20% | +++ | ++ | - | t(11;17) (1%) t(5;17) (1%) 11q23 (20%) |
| M4eo | Akute myelomonozytäre Leukämie mit abnormen Eosinophilen | 5-10% | +++ | ++ | - | inv(3q26), t(3;3) (3%) t(6;9) (1%) inv(16), t(16;16) (80%) |
| M5 | Akute Monozytenleukämie | 10% | +/- | +++ | +/- | 11q23 (20%) t(8;16) (2%) |
| M6 | Erythroleukämie | 3-4% | - | - | +++ | |
| M7 | Akute Megakaryozyten-Leukämie | 2-4% | - | - | ++ | t(1;22) (5%) |

Tabelle 1.1: FAB-Klassifikation der AML; MPO = Myeloperoxidase, NBE = N-Butylazetat-Esterase (unspezifisch); PAS = *Periodic-acid shift*

Im Jahre 2000 hat eine internationale Kommission für die WHO eine neue Klassifikation erarbeitet (siehe Tabelle 1.2). In diese Einteilung fließen zusätzlich zur Zytophologie und Zytochemie der Blasten zytogenetische und pathogenetische Aspekte der Erkrankung mit ein, die einen entscheidenden Einfluss auf die Prognose haben und in Zukunft wohl auch für die Therapie mitentscheidend sein werden. So wird berücksichtigt, ob eine rekurrente Translokation vorliegt und ob es sich um eine sekundäre Leukämie nach Chemotherapie oder MDS handelt. Weiterhin wurde der zur Diagnose notwendige Blastenanteil im Knochenmark von 30% auf 20% gesenkt.

Eine optimale, für alle Patienten wirksame und auch verträgliche Therapie existiert bisher nicht, obwohl in den letzten Jahren im Rahmen von großangelegten klinischen Studien deutliche Verbesserungen erzielt werden konnten. Primäres Ziel ist das Erreichen einer kompletten Remission (CR) mittels Polychemotherapie.

| WHO-Klassifikation der Akuten Myeloischen Leukämie |
|--|
| <p>AML mit rekurrenten Translokationen:</p> <p>AML mit t(8;21) (q22;q22), AML1/ETO</p> <p>Akute Promyelozytenleukämie (AML mit t(15;17)(q22;q11-22) und Varianten, PML-RARα)</p> <p>AML mit abnormen Eosinophilen im Knochenmark (inv(16)(p13q22) oder t(16;16)(p13;q11), CBFβ/MYH11)</p> <p>AML mit 11q23 (MLL)-Abnormalitäten</p> |
| <p>AML mit Dysplasie in mehreren Linien:</p> <p>mit vorangegangenem MDS</p> <p>ohne vorangegangenes MDS</p> |
| <p>Therapieassoziierte AML und myelodysplastische Syndrome:</p> <p>Alkylantien-induziert</p> <p>Epipodophyllotoxin-induziert</p> <p>Andere</p> |
| <p>AML uncharakterisiert:</p> <p>Minimal differenzierte AML</p> <p>AML ohne Reifungszeichen</p> <p>AML mit Ausreifung</p> <p>Akute myelomonozytäre Leukämie</p> <p>Akute monozytäre Leukämie</p> <p>Akute erythroide Leukämie</p> <p>Akute megakaryozytäre Leukämie</p> <p>Akute Basophilenleukämie</p> <p>Akute Panmyelose mit Myelofibrose</p> <p>Akute biphänotypische Leukämien</p> |

Tabelle 1.2 WHO-Klassifikation der AML

Komplette Remission bedeutet, dass sich das Blutbild vollständig normalisiert, keine extramedullären Herde mehr nachweisbar sind und dass der Blastenanteil im Knochenmark auf unter 5% absinkt. Dieser Zustand wird bei etwa 60-80% der Patienten erreicht. Diese erste Phase der Therapie wird als Induktionstherapie bezeichnet. Die Standardsubstanzen dieser Therapiephase sind Cytosin-Arabinosid (Ara-C) und Daunorubicin oder Idarubicin [1]. Durch eine Wiederholung des ersten Therapiezyklus an Tag 22 kann ein deutlich verbessertes ereignisfreies Überleben erzielt werden [14; 108]. Im Rahmen der Postremissionstherapie kann eine Stammzelltransplantation

(autolog oder allogene) erfolgen, der Stellenwert dieses Verfahrens ist jedoch umstritten und muss individuell unter Berücksichtigung von Risikofaktoren entschieden werden und weiter in klinischen Studien getestet werden, da verschiedene klinische Studien bisher keinen eindeutigen Vorteil im Gesamtüberleben der Patienten zeigten [16; 18; 42; 50; 119]. Im Rahmen dieser Therapiephase kann auch eine weitere Chemotherapie in Form einer intensivierten Konsolidierung erfolgen. Dabei wird meist hochdosiertes Ara-C eingesetzt [75]. Eine optimale Postremissionstherapie ist bisher umstritten, ihre Optimierung ist daher ein Ziel klinischer Forschung. Einen Sonderfall stellt die Therapie der Akuten Promyelozytenleukämie (APL, FAB M3) dar. Bei dieser Form der AML wird *all-trans* Retinsäure (ATRA) eingesetzt. ATRA bewirkt eine Ausdifferenzierung der Promyelozyten, wird bei dieser Erkrankung zusammen mit der klassischen Chemotherapie eingesetzt und kann auch bei alleiniger Verwendung zu einer kompletten Remission führen, obwohl es kein Zytostatikum ist (siehe auch 1.4.2).

1.3 Aspekte der molekularen Pathogenese der Akuten Myeloischen Leukämie

Der Fortschritt, der bei der Erforschung der Pathogenese der AML erzielt wurde, ist von einigen wichtigen Entdeckungen wesentlich beeinflusst worden. Bereits vor Jahren hat man festgestellt, dass durch AML-typische chromosomale Veränderungen Fusionsgene entstehen, die die Gene einiger für die myeloische Differenzierung wichtiger Transkriptionsfaktoren miteinbeziehen. Die daraus resultierenden Fusionsproteine unterbinden wichtige Prozesse, die zur Zellreifung notwendig sind. Aufgrund dieser Ergebnisse ging man davon aus, dass die AML eine Erkrankung sei, die aufgrund von Störungen im Ablauf der Transkription entsteht.

Ein weiterer wichtiger Schritt war die Entdeckung von aktivierenden Mutationen von Tyrosinkinaserzeptoren in AML-Blasten. Diese mutierten Tyrosinkinaserzeptoren führen über die gesteigerte Aktivität von Signaltransduktionswegen zu verstärktem Zellwachstum und verminderter Apoptose. Durch diese Erkenntnisse ging man davon aus, dass Störungen der Signaltransduktion von Wachstumsfaktorrezeptoren zumindest zu einem Teil an der Entstehung der AML beteiligt seien. Hier zeigten Experimente, dass ein isoliertes Vorhandensein einer mutierten Rezeptortyrosinkinase (z.B. Flt3-ITD, siehe 1.5) nicht in der Lage ist, eine AML zu induzieren [38; 52].

So wurde die Hypothese aufgestellt, dass nur durch das Zusammenwirken von Mutationen zweier unterschiedlicher Klassen eine AML induziert werden kann. Das „*2-hit model of AML*“ besagt, dass eine Mutation, z.B. Flt3-ITD, nur wenig Einfluss auf die Zelldifferenzierung hat und primär dazu dient, Wachstums- und Überlebensvorteil zu vermitteln. Eine weitere Mutation wie z.B. AML1-ETO behindert primär die hämatopoetische Differenzierung, hat aber nur wenig Einfluss auf Wachstum und Überleben [32; 51; 93].

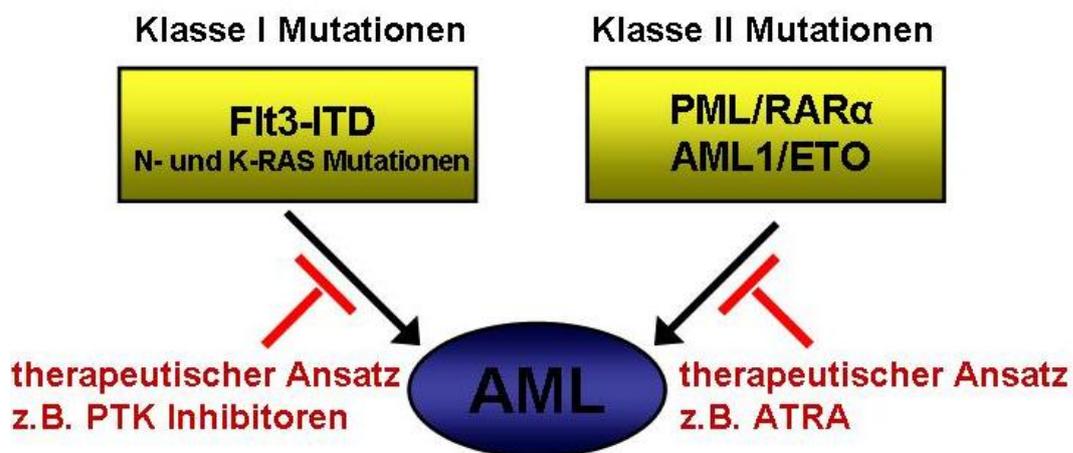


Abbildung 1.1 Modell der Entstehung der AML. Es müssen zwei Mutationen unterschiedlicher Klasse kooperieren, um eine AML hervorzurufen [32]. Die optimale zielgerichtete Therapie müsste daher eine Kombinationstherapie sein, um die Wirkung der Mutationen beider Klassen unterbinden zu können (PTK = Protein-Tyrosinkinase)

Dieses Modell zur Pathogenese der AML ist jedoch aus heutiger Sicht simplifizierend. So ist bekannt, dass beispielsweise AML1-ETO nicht nur einen Differenzierungsblock bewirkt, sondern auch Einfluss auf die Signaltransduktion nimmt und so z.B. zu erhöhter Selbsterneuerungsfähigkeit der Leukämiezellen führt (siehe auch 1.4.1) [79]. Ebenso weiß man, dass durch Flt3-ITD auch die Transkription diverser Gene beeinflusst wird (siehe 1.5). Es ist davon auszugehen, dass nur das gleichzeitige Vorhandensein zweier sich gegenseitig beeinflussender Mutationen zur Entstehung einer AML führen kann und dass eine erfolgreiche Therapie die Behandlung beider Mutationsklassen umfassen muss.

1.4 Die Rolle der Fusionsproteine

Charakteristisch für die AML sind Translokationen, die zur Expression von Fusionsproteinen führen. Diese Translokationen involvieren auch Transkriptionsfaktoren, die normalerweise die Expression von Differenzierungsgenen beeinflussen und so die hämatopoetische Reifung entscheidend regulieren. Durch die Wirkung der Fusionsproteine kommt es beispielsweise zum Abschalten von Zielgenen, die eine wichtige Rolle in der Differenzierung von hämatopoetischen Zellen spielen. Die Repression dieser Gene führt zum Differenzierungsblock in der AML.

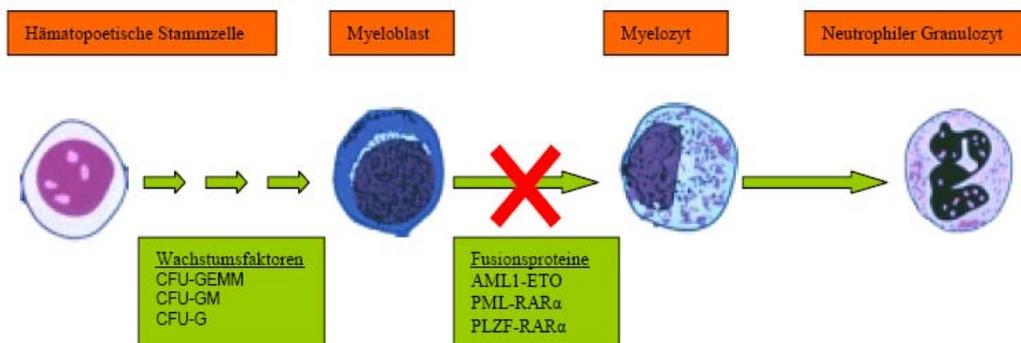


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung der Granulopoese. Durch die Wirkung der Fusionsproteine kommt es zu einem Differenzierungsstop und zur Anhäufung von Blasten im Knochenmark. (Abbildung: Thomas Cauvet)

Die Wirkung der Fusionsproteine geht jedoch über die Vermittlung des Differenzierungsblockes hinaus, sie tragen durch weitere Interaktionen zur Pathogenese der AML bei (siehe 1.4.1 und 1.4.2).

1.4.1 AML1-ETO

Die am häufigsten in der AML vorkommende Translokation ist die t(8,21) (q22,q22) Translokation. Sie wird bei etwa 10-15% der erwachsenen AML-Patienten angetroffen [23]. Durch die Translokation wird der N-terminale Teil von AML1, lokalisiert auf Chromosom 21, mit einem Großteil des ETO-Gens auf Chromosom 8 fusioniert. Hieraus resultiert das Fusionsprotein AML1-ETO.

AML1/Runx1 spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung und im Gleichgewicht der Myelopoese. Zusammen mit CBF β bildet AML1/Runx1 einen heterodimeren Transkriptionsfaktor, der die Expression spezifischer hämatopoetischer Gene (z.B. IL-3, CSF1-Rezeptor, Myeloperoxidase und den Wachstumsfaktor GM-CSF [24]) reguliert. AML1/Runx1 bindet an die DNA und rekrutiert Histonacetyltransferasen (HATs), die die DNA durch Azetylierung von Histonen und eine daraus resultierende Konformationsänderung für die Transkription zugänglicher machen.

ETO ist ein nukleäres Zinkfingerprotein. Es bildet einen Komplex mit Co-Repressoren wie HuN-CoR, mSin A und B und Histondeacetylasen (HDAC1) [31; 70; 127]. Durch die Aktivität der HDACs bewirkt der Komplex eine Konformitätsänderung im Chromatin. Dies macht die DNA unzugänglicher für die Transkription [39].

Im Fusionsprotein AML1-ETO ist somit der DNA-bindende transkriptionsaktivierende Faktor AML1/Runx1 mit dem repressiv auf die Transkription wirkenden Faktor ETO verbunden. AML1-ETO bindet die DNA an denselben Stellen wie AML1/Runx1, allerdings kommt es nun durch Wirkung von ETO zur Repression der Zielgene von AML1/Runx1 (siehe Abbildung 1.3). Auf diese Weise lässt sich der Differenzierungsblock der AML-Blasten erklären. Klinisch gesehen ist der Nachweis von AML1-ETO mit einer günstigen Prognose verknüpft.

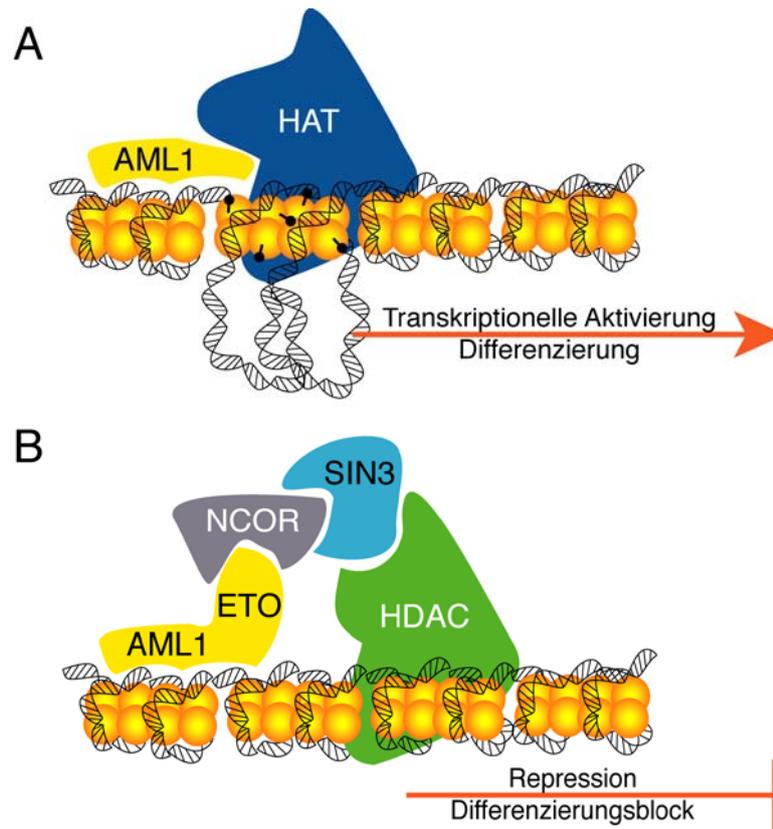


Abbildung 1.3 Wirkung von AML1-ETO: A: Das Wildtyp-AML1-Protein hat die Fähigkeit, an die DNA zu binden und HATs zu rekrutieren, was in einer transkriptionellen Aktivierung resultiert. B: Das Fusionsprotein AML1-ETO bindet auch an die DNA, rekrutiert durch ETO jedoch einen Co-Repressorkomplex, der die Vermittlerelemente Sin3A und N-CoR, sowie HDAC enthält. Diese Interaktion führt zur Repression einer Reihe von Genen, die normalerweise durch AML1 aktiviert werden [23].

Die Wirkungen von AML1-ETO gehen jedoch weit über den Differenzierungsblock hinaus. So bewirkt AML1-ETO nicht nur eine Repression, sondern auch eine Induktion von Genen, die an der Zelldifferenzierung beteiligt sind. Hierzu gehören die Gene Ap-1 (Aktivatorprotein 1), UBP43 (Ubiquitin spezifische Protease 18) und auch der M-CSF Rezeptor. Der zugrunde liegende Mechanismus konnte bisher nicht vollständig geklärt werden. Weiterhin beeinflusst AML1-ETO die Expression und Funktion zahlreicher Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel MEF (*myeloid ELF-like factor*), PU.1 (Transkriptionsfaktor der ets-Familie) und C/EBP α (*ccaat-enhancer-binding protein α*). So konnte nachgewiesen werden, dass AML1-ETO direkt mit MEF interagiert, welches als ets-Protein an der Regulation von Genen der Hämatopoese beteiligt ist [72]. PU.1 ist

einer der wichtigsten ets-Transkriptionsfaktoren und wesentlich für die normale Myelopoese. Die transkriptionelle Aktivität von PU.1 wird durch AML1-ETO blockiert [126]. C/EBP α ist ein essentieller Regulator der granulozytären Differenzierung. Zum einen führt AML1-ETO zur verminderten Transkription von C/EBP α , zum anderen interagiert AML1-ETO direkt mit C/EBP α und inaktiviert auf diese Weise dessen Funktion [13; 15; 29; 88].

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass AML1-ETO, PML-RAR α und PLZF-RAR α via Induktion von Plakoglobin zur Aktivierung des wnt-Signalweges führen und so in die Expressionsregulation von Onkogenen wie z.B. Zyklin D1 mit eingreifen. Die Induktion von Plakoglobin geschieht hierbei nicht über eine direkte Bindung der Fusionsproteine an den Promoter [79]. Neuere Publikationen bringen den wnt-Signalweg mit Proliferation und Selbsterneuerungsfähigkeit von hämatopoetischen Vorläuferzellen in Verbindung [5; 82; 103].

Weiterhin nimmt AML1-ETO Einfluss auf die Expression von p14ARF, ein wichtiger Tumorsuppressor. p14ARF ist als ein bedeutender Stabilisator der p53 Funktion wesentlich an Prozessen der Proliferationskontrolle und Apoptose beteiligt [95; 141]. AML1-ETO ist in der Lage, die Expression von p14ARF direkt zu inhibieren [66]. Niedrige Level von p14ARF bei AML-Patienten scheinen mit einer schlechten Prognose verknüpft zu sein [78].

Zusätzlich zur Beeinflussung von Proliferation, Überleben und Apoptose von Zellen des hämatopoetischen Systems vermittelt AML1-ETO eine verstärkte Selbsterneuerungsfähigkeit. So zeigten Tonks *et al.*, dass AML1-ETO zum Differenzierungsblock in der Erythro- und in der Granulopoese führt, gleichzeitig aber in einer vermehrten Selbsterneuerungsfähigkeit von erythrozytären und granulozytären Vorläuferzellen mündet [123; 124].

Auf diese Weise wird deutlich, dass AML1-ETO nicht nur über eine Blockade der Differenzierung zur Pathogenese der AML beitragen kann, sondern dass weitere Mechanismen Einfluss auf Proliferation, Selbsterneuerungsfähigkeit, Apoptose und Überleben ausüben.

1.4.2 PML-RAR α

Die Translokation t(15;17), aus der das Fusionsprotein PML-RAR α hervorgeht, ist charakteristisch für den AML Subtyp FAB M3. In rund 99% der APL-Fälle ist die Translokation nachweisbar. Dabei kommt es zur Fusion großer Teile des RAR α Gens auf Chromosom 17 (17q12) mit annähernd der vollständigen Sequenz von PML auf Chromosom 15 (15q22) [89].

PML ist ein Protein, dessen Funktion noch immer nicht vollständig verstanden wird. Eine wichtige Erkenntnis ist, dass einige Strukturen des Proteins an der Bildung von sogenannten *nuclear bodies* im Kern beteiligt sind und auf diese Weise mit Proteinen interagieren, die eine entscheidende Funktion bei der Kontrolle der Apoptose haben. Zudem rekrutiert PML durch post-translationale Modifikation Proteine an die *nuclear bodies*, von denen einige als transkriptionelle Aktivatoren (z.B. p53) oder Repressoren (z.B. Daxx (*death-associated protein 6*)) fungieren [121].

RAR α steht für Retinsäurerezeptor α . Genau wie AML1 spielt auch RAR α eine wichtige Rolle in der Myelopoese. Das RAR α -Protein kann in sechs Regionen eingeteilt werden (A-F). Die Region C des Proteins enthält zwei Zinkfinger motive. Dieser Bereich vermittelt die Bindung des Rezeptors an die DNA. Die Bereiche der Promotoren, an die RAR α binden kann, werden als *retinoic acid response elements* (RARE) bezeichnet. Wenn keine Retinsäure an den Rezeptor gebunden ist, fungiert RAR α als transkriptioneller Repressor, indem es durch Rekrutierung von Co-Repressoren (N-CoR, mSin3) und HDACs die DNA unzugänglicher für den Transkriptionsapparat macht. Wenn nun Retinsäure an RAR α bindet, bildet RAR α einen Komplex mit RXR α , einem weiteren Protein aus der Familie der Retinsäurerezeptoren. Dieser heterodimere Komplex agiert als Aktivator der Transkription indem Co-Repressoren und HDACs entfernt werden. Dem Fusionsprotein PML-RAR α bleibt die Fähigkeit der DNA-Bindung erhalten, allerdings wird die normale Reaktion des Rezeptors auf Bindung von Retinsäure behindert [64; 76]. Die physiologische Konzentration von Retinsäure ist nicht in der Lage den zur Transkription benötigten Prozess der Konformationsänderung in Gang zu setzen. Auf diese Weise unterbleibt die Expression von RAR α - Zielgenen. Hohe Konzentrationen an Retinsäure führen jedoch zu einer physiologischen Funktion des Rezeptors, so dass eine Transkription der in die

Zelldifferenzierung involvierten Gene stattfinden kann [37; 44; 65]. So zeigten Grignani *et al.* 1998, dass bei einer Retinsäurekonzentration von 1×10^{-8} bis 2×10^{-5} M PML-RAR α völlig von N-CoR dissoziiert. Auf diese Weise ist durch systemische Gabe von ATRA eine Zelldifferenzierung in der APL zu erzielen [37].

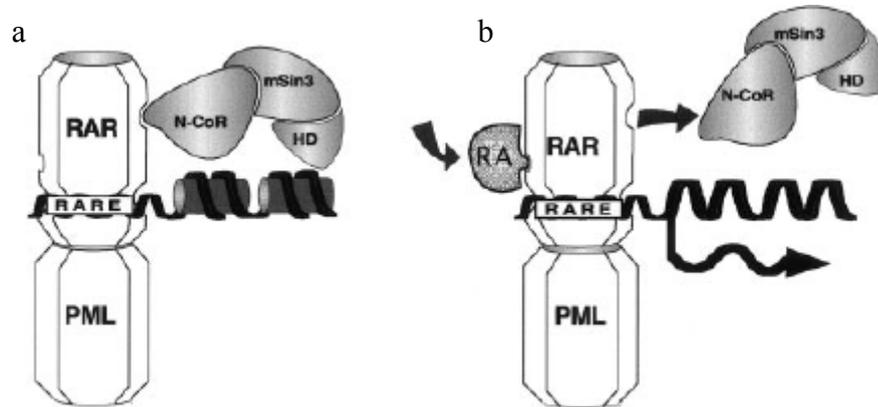


Abbildung 1.4 PML-RAR α : (a) Der Retinsäurerezeptor α des PML-RAR α Fusionsproteins bindet im Promoterbereich (RARE) eines Zielgens an die DNA. Durch Rekrutierung von Co-Repressoren wird die DNA für den Transkriptionsapparat unzugänglich gemacht. Kommt es zur Bindung von Retinsäure (RA) in hoher Konzentration (b), werden Co-Repressoren und HDACs freigegeben und so die Transkription ermöglicht [37].

ATRA, auch bekannt unter dem Namen Tretinoin, ist ein natürlicher Metabolit des Vitamin A (Retinol). Es entsteht im Rahmen der Oxidation von Vitamin A durch die Retinoldehydrogenase und die Retinaldehydrogenase [90]. Retinoide spielen bei vielen Wachstums- und Differenzierungsvorgängen eine wichtige Rolle. So ist auch der therapeutische Einsatzbereich von ATRA sehr umfassend. Neben dem Einsatz von ATRA in der Therapie der Akne zeigten sich günstige Einflüsse auf den Verlauf maligner Erkrankungen. So hemmt ATRA beispielsweise das Wachstum des hepatozellulären Karzinoms und es konnte eine antimetastatische Wirkung auf Zellen des invasiven Prostatakarzinoms bei Ratten beobachtet werden [34; 35; 85; 92]. Das erfolgreichste Einsatzgebiet von ATRA ist jedoch die Promyelozytenleukämie. Bereits 1988 wurden erste klinische Studien in der Therapie der APL durchgeführt [100; 101]. Neben der Aufhebung des Differenzierungsblocks bewirkt die Therapie mit ATRA eine signifikante Reduktion der Verbrauchskoagulopathie, eine typische und lebensgefährliche Komplikation der APL. Durch den Einsatz von ATRA in der Therapie der APL konnte die Prognose der Patienten, die an dieser Form der AML erkrankt sind erheblich verbessert werden.

Neuere Untersuchungen zu PML-RAR α haben ergeben, dass die Zyklin A1-Transkription durch PML-RAR α induziert wird [81]. Das Zyklin A1-Protein wiederum interagiert mit RB, E2F und B-Myb [80; 136]. Auf diese Weise kann PML-RAR α den Zellzyklus beschleunigen. Analog zu AML1-ETO konnte für PML-RAR α eine Aktivierung des wnt-Signalweges über Plakoglobin nachgewiesen werden.

1.5 Die Rezeptortyrosinkinase Flt3

Flt3 (*Fms-like tyrosine kinase 3*) gehört zur Gruppe der Klasse-III-Rezeptortyrosinkinasen (RTKs). RTKs sind transmembranäre Rezeptoren, die sich durch Proteintyrosinkinaseaktivität auszeichnen. Die RTKs der Klasse III bestehen aus fünf bis sieben extramembranären, immunglobulinähnlichen Domänen und einer zytoplasmatischen Tyrosinkinase-Domäne [10; 106; 107]. Flt3 wird vor allem in hämatopoetischem Gewebe exprimiert und ist in frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen anzutreffen, in primitiven Stammzellen kommt sie dagegen nicht vor [73]. Der natürliche Flt3-Ligand (FL) führt durch Bindung zur Autophosphorylierung des Rezeptors, wodurch über eine Signalkaskade bestimmte Signalwege in der Zelle aktiviert werden. Hierzu gehören u.a. der PI3K/AKT- Signalweg und der Ras/MAP-Kinase-Signalweg [7; 77; 139; 140]. Der STAT5 Signalweg wird durch den normalen Liganden kaum aktiviert. Über diese Signalwege werden Gene reguliert, die mit Proliferation, Überleben und Differenzierung von hämatopoetischen Zellen verknüpft sind. Eine Expression von Flt3 wird in 60 bis 90% der AML-Fälle beschrieben [8; 17; 25; 105; 118]. In AML-Blasten ist die Expression von Flt3 gegenüber normalen hämatopoetischen Vorläuferzellen gesteigert. Es konnte gezeigt werden, dass FL *in vitro* zu Proliferationszunahme und gesteigertem Überleben von primären AML-Blasten führt [17; 67; 91; 118].

Das Flt3-Gen ist eines der häufigsten Ziele von Mutationen in der AML. In 27 bis 35% der Fälle ist eine Mutation nachweisbar [135; 137]. Die meisten Flt3-Mutationen sind Längenmutationen (Flt3-LM). Sie sind in etwa 24 % aller AML Fälle anzutreffen [32]. Häufig sind dies sogenannte interne Tandemduplikationen (ITD) und Insertionen in der mRNA-Sequenz der juxtamembranären Domäne von Flt3. Das Vorkommen von Flt3-ITD ist nicht an einen bestimmten FAB-Typ der AML geknüpft, häufig tritt diese

Mutation jedoch bei der APL (FAB-M3) auf [48; 55; 112]. Bei den ITDs handelt es sich um Aminosäuresequenzen variierender Länge (ca. 4-50 Aminosäuren), die verdoppelt sind, wodurch es zu einer Verlängerung der juxtamembranären Region des Rezeptors kommt. Die Mutationen sind *in frame*, d. h. „im Leserahmen“, hinter der Insertion wird die RNA korrekt weiter translatiert [59; 83; 102; 112]. Die Verlängerung der juxtamembranären Region mündet in einer konstitutiven Tyrosinkinaseaktivität von Flt3 [56]. Die autoinhibitorische Funktion, die der juxtamembranären Domäne zugeschrieben wird, geht durch die Verlängerung verloren [36; 56]. Diese Theorie wurde durch die Beschreibung der Kristallstruktur von Flt3 bestärkt. Diese zeigt, dass die juxtamembranäre Region im inhibierten Zustand von Flt3 verhindert, dass ATP ins aktive Zentrum des Enzyms gelangt. Tyrosinreste der juxtamembranären Region scheinen eine entscheidende Rolle für die Autoinhibition des Rezeptors zu spielen. Man geht davon aus, dass die Phosphorylierung dieser Tyrosinreste in einer Aktivierung von Flt3 mündet [36].

Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Flt3-ITD zu einem wachstumsfaktorunabhängigen Wachstum und Überleben von myeloischen Zellen führt. Darüber hinaus konnte eine konstitutive Aktivierung der Signalwege von STAT5, Ras/MAP und PI3K/AKT beobachtet werden (siehe Abbildung 1.5) [27; 43; 56; 77; 125]. Auf welche Weise die Mutation von Flt3 zustande kommt, ist bisher nicht hinreichend geklärt. Es existiert jedoch die Meinung, dass palindromische Sequenzen im Flt3-Gen in Kombination mit einem defekten DNA-Reparaturmechanismus zur Entstehung von Flt3-ITD beitragen [56]. In den meisten AML-Fällen werden die ITD- und die wt-mRNA co-exprimiert. Der Verlust des wt-Allels ist mit einer schlechten Prognose verknüpft [59; 122; 133]. Der Nachweis von Flt3-ITD im Subtyp FAB M3 zum Zeitpunkt der Diagnose ist mit einer hohen Leukozytenzahl, hohen LDH Leveln und einem hohen Prozentsatz an Blasten im Knochenmark verknüpft [30; 54; 55; 59]. All dies spiegelt sich in einem erhöhten Risiko für Therapieversagen wider. Diese Verknüpfung von ITD-Nachweis und Prognose wurde durch klinische Studien auch für die anderen FAB-Subtypen nachgewiesen [2; 30; 48; 112; 122; 133].

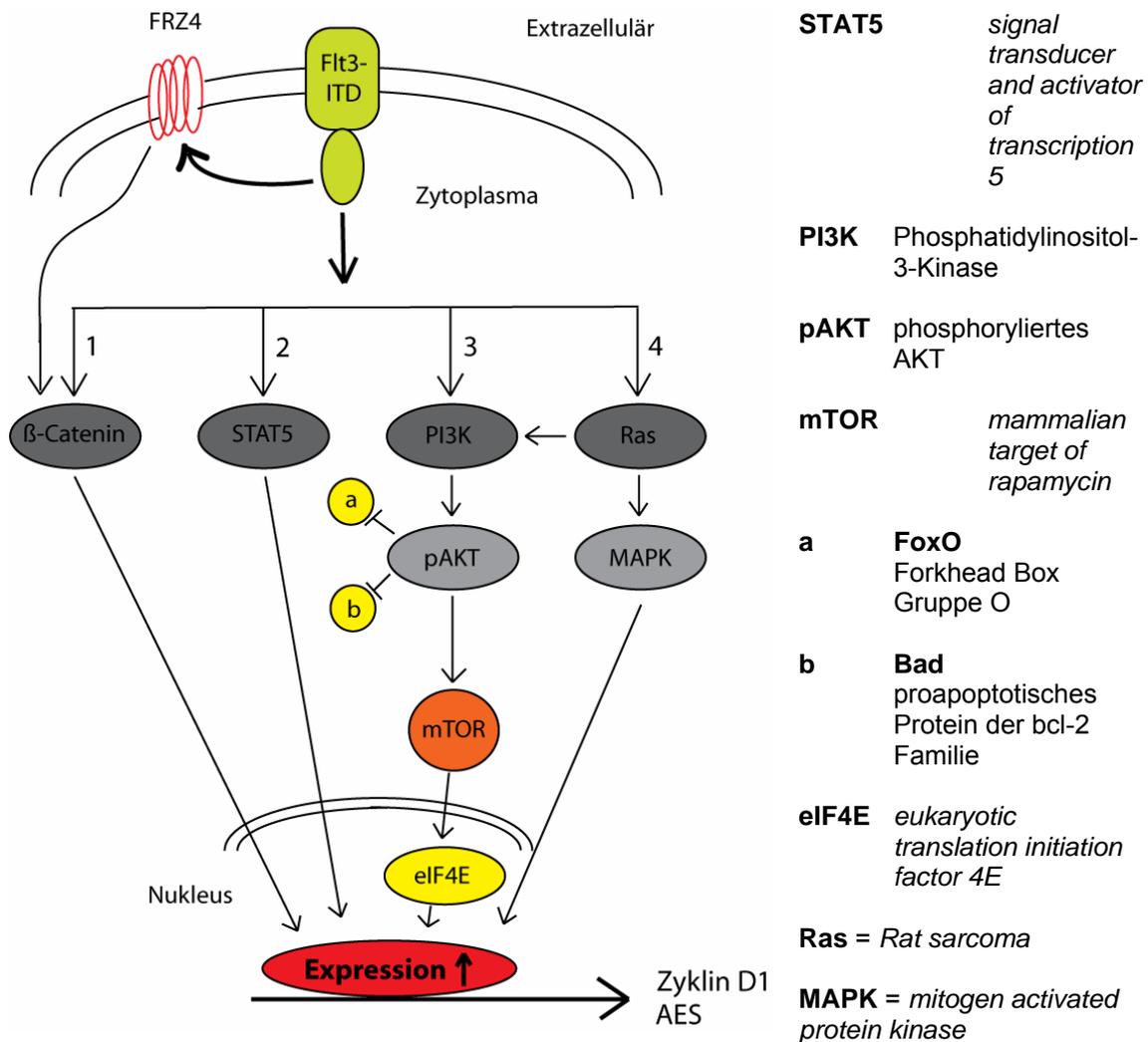


Abbildung 1.5 Schematische Darstellung der durch Flt3-ITD beeinflussten Signalwege. 1. Wnt: Durch Flt3-ITD kommt es zur vermehrten Expression des FRZ4-Rezeptors, die Degradation von β -Catenin durch GSK3- β wird via wnt inhibiert. 2. STAT5: Flt3-ITD aktiviert den STAT5 Signalweg. 3. PI3K: Flt-ITD trifft auf erhöhte PI3K-Level und aktiviert diesen Signalweg. AKT blockiert Apoptosewege und induziert über mTOR die Proteinsynthese. 4. Ras/MAPK: Flt3-ITD aktiviert den Ras/MAPK-Signalweg. Über Ras wird zudem auch der PI3K-Signalweg aktiviert.

Sallmyr *et al.* beschreiben in einer aktuellen Publikation einen möglichen Grund für die schlechte Prognose Flt3-ITD positiver Patienten. Sie haben nachgewiesen, dass in ITD-positiven Zellen erhöhte Spiegel von Sauerstoffradikalen (ROS) vorliegen, welche zu einem erhöhten Vorkommen von DNA- Doppelstrangbrüchen und Reparaturfehlern führen. Das erhöhte Vorkommen dieser Sauerstoffradikale scheint via STAT5 vermittelt zu werden. Der STAT5 Signalweg vermittelt eine Aktivierung von RAC1, einer NADPH-Oxidase, die für die ROS-Produktion essentiell ist. Eine Behandlung mit

einem Flt3-Inhibitor verhindert gesteigerte ROS-Spiegel und resultiert in einer geringeren Anzahl von Doppelstrangbrüchen und einer gesteigerten Effektivität der DNA-Reparaturmechanismen [110].

Wie bereits beschrieben, ist der Nachweis einer Mutation des Flt3-Rezeptors mit einer schlechteren Prognose verknüpft. Mutationen des Flt3-Rezeptors haben eine hohe Prävalenz bei AML-Patienten. Dies zeigt, dass Flt3 ein interessantes Ziel für neue molekulartherapeutische Ansätze darstellt. In den letzten Jahren sind zahlreiche Tyrosinkinaseinhibitoren entwickelt worden. Einige dieser Substanzen wurden bereits in klinischen Studien mit unterschiedlichem Erfolg eingesetzt [58]. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde PKC412 als Tyrosinkinaseinhibitor verwendet. PKC412 (N-benzoylstaurosporin) gehört zur chemischen Klasse der Indolocarbazole und ist ein synthetischer Abkömmling des natürlichen Alkaloids Staurosporin. Wie alle direkten Flt3 Inhibitoren imitiert es die Purinringstruktur von Adenosin und ist so ein kompetitiver Antagonist an der ATP-Bindungsstelle der Kinasedomäne von Flt3. PKC412 wurde ursprünglich als Inhibitor der Proteinkinase C entwickelt. PKC412 inhibiert jedoch nicht nur Flt3, sondern auch andere Rezeptortyrosinkinasen wie PDGFR β und KIT [63]. Weisberg *et al.* zeigten 2002, dass PKC412 in Blasten von AML-Patienten mit einer Mutation von Flt3 die Apoptose induziert. In Tiermodellen einer Flt3-induzierten myeloproliferativen Erkrankung konnte ein verlängertes Überleben unter PKC412 Therapie beobachtet werden [131]. Damit übereinstimmend zeigten Odgerel *et al.* 2008, dass die Effekte von PKC412 auf die Proliferation von leukämischen Zellen vom Vorhandensein einer Mutation von Flt3 abhängig sind [86]. In Zelllinien mit mutiertem Flt3 induziert PKC412 eine massive Apoptose, in Zelllinien ohne Flt3-Mutation wird hingegen ein Arrest in der G2-Phase des Zellzyklus hervorgerufen [86]. In einer klinischen Phase-2-Studie zeigte sich, dass bei 14 von 20 Patienten mit einer Flt3-Mutation die Therapie mit PKC412 eine Reduktion der peripheren Blastenzahl um mehr als 50% bewirkte, in 6 Fällen reduzierte sich auch die Blastenzahl im Knochenmark signifikant [120]. Mittlerweile geht man davon aus, dass ein Großteil der klinischen Wirkung von PKC412 durch den aktiven Metaboliten CGP52541 vermittelt wird [63]. Da mit Flt3-Inhibitoren allein keine andauernde Remission erzielt werden kann, werden nun vielversprechende klinische Studien von

Flt3-Inhibitoren wie PKC412 in Kombination mit einer Polychemotherapie durchgeführt [58].

1.6 Zyklin D1 und *Amino-terminal Enhancer of Split*: Regulation durch Fusionsproteine in der AML

1.6.1 Zyklin D1

Zykline sind Proteine, die maßgeblich an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind. Zyklin D1 gehört zur Gruppe der G1-Zykline und reguliert den Übergang von der G1- in die S-Phase. Zyklin D1 bindet und aktiviert die Zyklin-abhängigen Kinasen cdk4 und cdk6. Dieser Komplex inaktiviert während der G1-Phase des Zellzyklus das Retinoblastoma Protein (pRb) durch Phosphorylierung. Dies führt zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F aus dem pRb-E2F-Komplex. E2F wiederum induziert die Transkription der zum Übergang von der G1- zur S-Phase benötigten Gene, wie zum Beispiel Zyklin E [26]. Der Zyklin D1-cdk4/6-Komplex unterstützt zudem die vollständige Inaktivierung von pRb durch Zyklin E-cdk2.

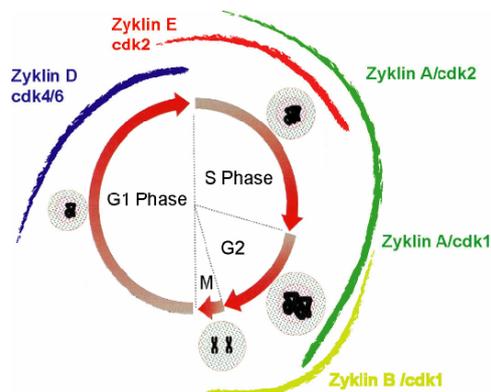


Abbildung 1.6 Schematische Darstellung des Zellzyklus. Die höchsten Zyklin D1 Level werden während der G1-Phase beobachtet. Im Komplex mit den cdk4 und 6 leitet Zyklin D1 den Übergang in die S-Phase ein.

Das Zyklin D1 Gen wird in vielen Krebsarten wie beispielsweise Brust-, Dickdarm-, Lungen-, Prostata-, Blasen- und Leberkrebs, sowie Plattenepithelkarzinomen von Ösophagus und der Kopf/Halsregion amplifiziert, bzw. überexprimiert. Zudem ist der genomische Lokus von Zyklin D1 (Chromosom 11q13) bei Nebenschilddrüsentumoren

und bestimmten B-Zell-Lymphomen in chromosomale Aberrationen involviert, die zu einer vermehrten Expression von Zyklin D1 führen [41].

Es besteht die Theorie, dass diese Dysregulation der Expression von Zyklin D1 am Verlust der Restriktionspunktkontrolle beteiligt ist [26]. So konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von D-Zyklinen direkten Einfluss auf die Kontrolle des Restriktionspunktes nimmt [45; 99]. Im Komplex mit cdk4 kann Zyklin D1 zum Beispiel Smad3 durch Phosphorylierung inaktivieren [74]. Smad3 (*Mothers against decapentaplegic homolog 3*) hat eine anti-proliferative Funktion, indem es durch transkriptionelle Aktivierung zur vermehrten Bildung von Zellzyklusinhibitoren wie p27KIP und p15INK4b führt [114].

In den letzten Jahren haben einige Untersuchungsergebnisse der Ansicht widersprochen, dass eine Überexpression von Zyklin D1 nur über eine cdk-abhängige Proliferationsinduktion zur Tumorigenese beiträgt. So zeigte sich, dass eine Überexpression von Zyklin D1 in Brustkrebszellen nicht zu einer verstärkten Expression von E2F Zielgenen führt. Im Gegensatz zu den Tumoren mit inaktiviertem pRb oder einer Zyklin E-Überexpression konnte in den Zyklin D1 überexprimierenden Tumoren keine gesteigerte Proliferation festgestellt werden [47; 84; 142]. Weiterhin zeigte sich, dass die Zyklin D1-Level nicht mit der Expression von Ki67, einem Marker von proliferierenden Zellen, korrelieren [115]. Diese Ergebnisse werden so gedeutet, dass das onkogene Potential einer Zyklin D1-Überexpression über andere Wege als über die cdk-abhängige, mittels E2F vermittelte Beschleunigung des Zellzyklus ausgeübt wird [87; 130].

In Einklang hiermit konnte gezeigt werden, dass Zyklin D1 die Aktivität unterschiedlichster Transkriptionsfaktoren wie DMP1 (*cyclin D1-interacting myb-like protein 1*), den Androgenrezeptor und STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) beeinflusst [26]. Auf diese Weise eröffnen sich unterschiedliche Signalwege, über die Zyklin D1 sein onkogenes Potential entfalten kann.

Neuere Untersuchungen von Lamb *et al.* haben gezeigt, dass C/EBP β (*CCAAT/enhancer-binding protein β*) an der transkriptionellen Regulation durch Zyklin D1 beteiligt ist und ein direkter Effektor der Zyklin D1 Aktivität ist [60]. C/EBP β ist ein Transkriptionsfaktor, der durch Regulation der Genexpression die Differenzierung und Funktion verschiedener Gewebe maßgeblich steuert [62]. Zyklin D1 fungiert als

Antagonist von C/EBP β . Es konnte bereits vorher gezeigt werden, dass eine Unterbrechung der Signaltransduktion von C/EBP β zu maligner Transformation beitragen kann. Die Interaktion von C/EBP β und Zyklin D1 scheint in die Entstehung von humanen Tumoren verwickelt zu sein [26; 60].

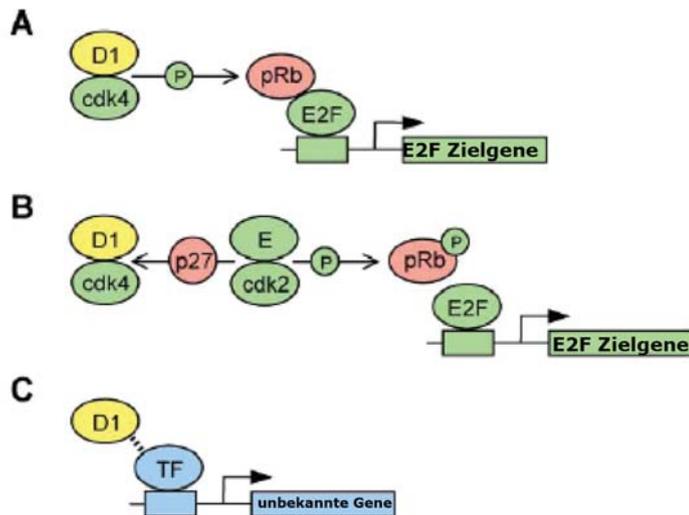


Abbildung 1.7
Mögliche Effekte von Zyklin D1: **A:** Zyklin D1 bewirkt über eine Phosphorylierung vom Retinoblastomprotein eine Transkription von E2F Zielgenen. **B:** Zyklin D1 bewirkt über eine Beeinflussung von Zyklin E eine Transkription von E2F Zielgenen. **C:** Zyklin D1 kann unabhängig von den cdks verschiedene Transkriptionsfaktoren in der Funktion beeinflussen [60].

Die Expression von Zyklin D1 wird über Signalwege gesteuert, von denen viele auch in die Pathogenese der AML verwickelt sind. So kommt es über Aktivierung des Ras/MAPK- und des wnt-Signalweges (siehe Abbildung 1.5) zu einer vermehrten Expression von Zyklin D1 [26]. Zudem konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass es durch die Einwirkung der Fusionsproteine in der AML zu einer Aktivierung des wnt-Signalweges mit konsekutiver Expressionssteigerung von Zyklin D1 kommt (siehe Abbildung 1.8). Die Untersuchungen haben weiterhin ergeben, dass AML1-ETO auch direkt an den Zyklin D1-Promoter binden und ihn aktivieren kann. Die Aktivierung des Promoters geschieht dabei TCF-unabhängig [79].

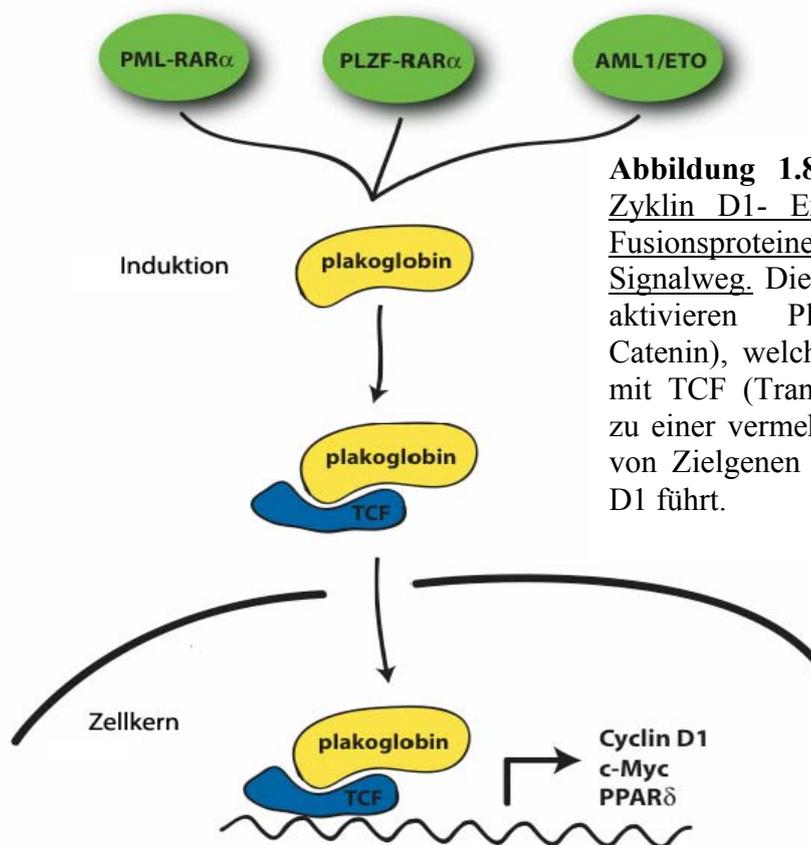


Abbildung 1.8 Induktion der Zyklin D1- Expression durch Fusionsproteine via wnt-Signalweg. Die Fusionsproteine aktivieren Plakoglobin (γ -Catenin), welches im Komplex mit TCF (Transkriptionsfaktor) zu einer vermehrten Expression von Zielgenen wie z.B. Zyklin D1 führt.

1.6.2 Amino-terminal Enhancer of Split

AES (*Amino-terminal Enhancer of Split*) gehört zur Gruppe der TLE-Proteine (TLE = *Transducin-like Enhancer of Split*). Die TLE-Proteine stellen das humane Homolog der Groucho-Proteine von *Drosophila* dar, einer Familie von hoch-konservierten transkriptionellen Co-Repressoren. Die Grouchos und auch die TLE-Proteine bestehen aus fünf Proteindomänen, AES ist jedoch eine verkürzte Variante. Das AES-Gen codiert nur die beiden N-terminalen Domänen der TLEs, die Q- und die GP-Domäne. Die homologen murinen Gene heißen Grg (*Groucho-related genes*), Grg 5 entspricht dabei AES. Die „langen“ Grgs fungieren als Co-Repressoren der Transkription. Sie bilden Tetramere und binden den Transkriptionsfaktor TCF, der normalerweise über den wnt-Signalweg durch β -Catenin aktiviert wird. Durch Rekrutierung von HDACs sorgen die Groucho-Proteine für eine starke Repression der Transkription. Anders ist es bei AES und Grg5. Sie binden ebenfalls an TCF, jedoch findet keine Rekrutierung von HDACs statt. Auf diese Weise verhindern sie eine Repression der Transkription [11; 12]. AES trägt so zur Transkription von Zielgenen des wnt-Signalweges bei. Wie bereits erwähnt,

sind diese Gene (u.a Zyklin D1, c-myc) an der Regulation von Zellproliferation, -überleben und -differenzierung beteiligt.

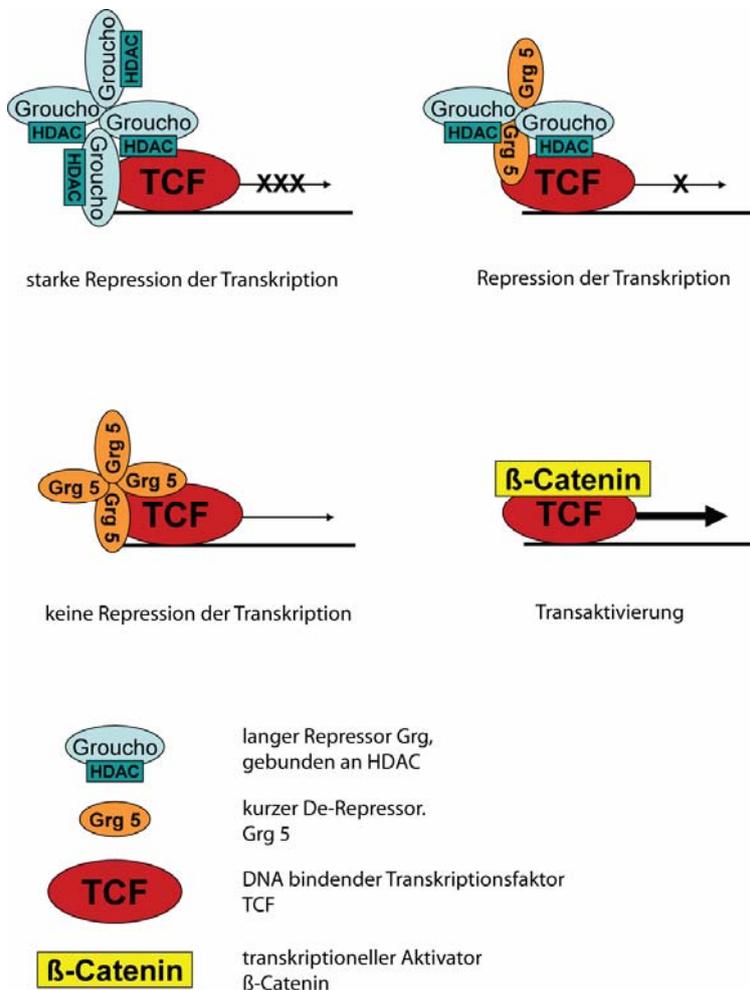


Abbildung 1.9 Regulation der Tcf-Aktivität durch Grg- und Grg5-Funktion.

Die Expression von Tcf-Zielgenen wird nach Bindung von β -Catenin aktiviert. Wenn Grg Tcf bindet, findet eine Repression statt. Bei gleichzeitiger Bindung von Grg und Grg5 an Tcf werden weniger HDACs rekrutiert, die Repression ist schwächer. Bei ausschließlicher Bindung von Tcf durch Grg5 findet keine Repression statt [12].

Sekkai *et al.* haben herausgefunden, dass AES ein direktes Zielgen von STAT3 in embryonalen Stammzellen ist. Nach Einleitung der Differenzierung der embryonalen Stammzellen wird AES durch Entzug von LIF in diesen Zellen herunterreguliert. Es ist bekannt, dass STAT3 eine wichtige Rolle in der Vermittlung von Selbsterneuerungsfähigkeit und Aufrechterhaltung der Pluripotenz von embryonalen Stammzellen zukommt. Zudem ist STAT3 ein Transkriptionsaktivator, der in vielen menschlichen Krebsarten eine übermäßige Aktivität zeigt. Man weiß, dass Zielgene von STAT3 über Vermittlung von Proliferation, Überleben, Selbsterneuerungsfähigkeit, Invasion sowie Angiogenese an der Entstehung von Tumoren beteiligt sind [28]. In der Promoterregion von AES wurden drei STAT-bindende Elemente nachgewiesen, im Rahmen von Chromatin-IP Experimenten konnte gezeigt werden, dass endogenes

STAT3 an den AES-Promoter bindet und die Transkription von AES stimuliert [113]. Auf diese Weise ist AES an der Vermittlung der Selbsterneuerungsfähigkeit durch STAT3 beteiligt und bildet gleichzeitig eine Verbindung zwischen dem STAT3-Signalweg und dem wnt-Signalweg.

Mäuse, die kein AES exprimieren, sind lebensfähig, etwa die Hälfte dieser Tiere weist jedoch Wachstumsdefekte auf [47; 128].

Bereits seit längerer Zeit weiß man, dass TLE/Grg Proteine mit RUNX-Familienmitgliedern interagieren können. Zu dieser Gruppe gehört auch AML1/Runx1. Die Interaktion geschieht über eine C-terminale Peptidsequenz von AML1 (VWRPY) und wird hauptsächlich durch die SP Domäne von TLE1 vermittelt. TLE1 ist auf diese Weise in der Lage, die durch AML1 induzierte Transaktivierung von Zielgenpromotoren zu inhibieren [4; 46]. Die VWRPY-Proteinsequenz fehlt im AML1-ETO Fusionsprotein. Neuere Experimente haben jedoch ergeben, dass AML1-ETO dennoch sowohl mit TLE1 als auch mit TLE4 komplexieren kann [20].

Eine Mutation, die relativ häufig mit der Translokation t(8,21) vergesellschaftet ist, ist die Deletion eines Teiles des langen Arms von Chromosom 9, del(9q). Zu den bekannten Genen dieser Region gehören auch TLE1 und TLE4. In del(9q) positiven AML-Proben zeigte sich eine verminderte Expression von TLE1 und TLE4. In weiteren Experimenten fand man heraus, dass die Höhe der TLE-Spiegel die Zellproliferation von AML1-ETO-positiven Zellen beeinflusst. Durch Verlust der TLE-Expression kommt es zu einer Verdopplung der Zellteilungsrate, also zu einem Wachstumsvorteil in AML1-ETO positiven Zellen. Wenn TLE1 oder TLE4 hingegen überexprimiert wird, kommt es zu einem Anstieg der Apoptose. Der Verlust der TLE-Funktion in AML1-ETO positiven Zellen könnte somit den von AML1-ETO vermittelten Wachstumsnachteil, den Zellzyklus-Arrest und die erhöhte Apoptose ausgleichen und damit zur Leukämogenese beitragen [20].

Dies alles verdeutlicht, dass sowohl TLE als auch AES eine kritische Rolle in der Vermittlung von Wachstums- und Überlebensvorteilen in menschlichen Zellen spielen und dass eine Störung der physiologischen Funktionen zur Entstehung maligner Zellen beitragen kann.

2 Material und Methoden

2.1 Zelllinien und Kulturbedingungen

2.1.1 Zelllinien

2.1.1.1 NB4-Zellen

Bei der humanen Zelllinie NB4 handelt es sich um Zellen, die 1989 aus dem Knochenmark einer 23 Jahre alten Patientin mit einer akuten Promyelozyten Leukämie (AML FAB M3) isoliert wurden. Diese Zelllinie trägt die Translokation t(15;17), aus der das Fusionsprotein PML-RAR α hervorgeht. Die Zelllinie NB4-R2 trägt eine Mutation im Retinsäurerezeptors α , die zu einer Resistenz auch gegenüber hochdosierter Retinsäure (ATRA) führt.

Des Weiteren wurde die Zelllinie NB4-Flt3-ITD verwendet. Die ITD Mutation führt zu einer konstitutiven Aktivierung Flt3-abhängiger Signale.

Mittels FACS-Analyse wurde das Vorhandensein von hFlt3-ITD vor dem Start der Versuche nachgewiesen. Hierzu wurden die entsprechenden Zellen abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und anschließend durch Zugabe von eiskaltem, 70-prozentigem Ethanol 2h fixiert. Nach abermaligem Waschen mit PBS erfolgte die Zugabe von 5 μ l des entsprechenden Antikörpers (anti-human-CD135 oder IgG₁ als unspezifische Kontrolle) und Inkubation für 2h bei 4°C im Dunkeln. Anschließend wurden die Ansätze erneut gewaschen und nach Aufnahme in PBS mittels FACS-Analyse wurde die Expression bestimmt. Die Zellen standen in der Arbeitsgruppe zur Verfügung.

2.1.1.2 U937-Zellen

Die U937 (ATCC CRL-1593.2) Zelllinie wurde 1974 von Sundstrom und Nilson aus Lymphgewebe isoliert. Es handelt sich um eine humane myeloische Zelllinie, die durch den Überstand einer Lymphozytenkultur, durch Vitamin D3, Retinsäure, Phorbol ester, Gamma Interferon und TNF (Tumornekrosefaktor) zur Differenzierung angeregt werden kann. Verwendet wurden ebenfalls die Zelllinien U937 (B412) und U937 (PR9).

Die U937 (B412) Zelllinie ist induzierbar transfiziert mit dem Fusionsprotein PLZF-RAR α , U937 (PR9) mit dem Fusionsprotein PML-RAR α [97]. Die Zellen standen in der Arbeitsgruppe zur Verfügung.

2.1.1.3 32D-Zellen

Bei der Zelllinie 32D handelt es sich um murine, myeloische Knochenmarkszellen. Diese stammen ursprünglich von C3H/HeJ Mäusen, die mit dem *friend murine leukemia virus* (F-MuLV) infiziert wurden. Neben der Wildtyp-Version wurden von dieser Zelllinie zwei weitere Varianten bei den Versuchen eingesetzt. Die Zelllinie 32D hFlt3-ITD ist stabil mit einer humanen Mutante der Rezeptortyrosinkinase Flt3 transfiziert, die Zelllinie 32D hFlt3-wt mit der humanen Wildtypvariante. Die Zellen standen in der Arbeitsgruppe zur Verfügung.

2.1.1.4 Patientenproben

Die verwendeten Proben stammen ausschließlich von Patienten, die im Rahmen einer klinischen Studie behandelt worden sind [14]. Die Patienten haben zur wissenschaftlichen Verwendung des Probematerials ihre schriftliche Einverständniserklärung gegeben. Die Verwendung der Proben zu wissenschaftlichen Zwecken wurde zudem von der zuständigen Ethikkommission genehmigt. Aus den Proben wurde zur weiteren Verwendung Protein und RNA isoliert.

2.1.2 Kulturbedingungen

Alle Zelllinien wurden in RPMI 1640 Medium mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), 2% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37 C und 5% CO₂ im Begasungsbrutschrank inkubiert. NB4-Flt3wt und NB4-Flt3-ITD Zellen wurden zusätzlich mit Neomycin selektioniert. Das Medium für alle verwendeten murinen Zellen wurde zusätzlich mit 10% WEHI-Zellüberstand versetzt, der IL-3 enthält. Die 32D Zelllinien mit Flt3-Konstrukten wurden zusätzlich mit Blasticidin (15 μ g/ml) selektioniert.

PLAT-E-Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10% FCS und ansonsten unter den gleichen Bedingungen wie alle anderen Zellen kultiviert.

2.1.3 Zellbehandlungen

NB4 Zelllinien:

Je 3×10^7 Zellen wurden entweder ATRA (1 μ M), Ethanol (1 μ M), PKC412 (300 nM) oder DMSO (300 nM) im Kulturmedium exponiert. Nach 0, 12, 24 und 48 Stunden wurde von jedem Ansatz Protein und RNA isoliert.

32D Zelllinien:

Je 3×10^7 Zellen wurden entweder Interleukin 3 (1 ng/ml), FL (20 ng/ml), PKC412 (50-300 nM) oder DMSO (50-300 nM) exponiert. Protein und RNA wurden nach 0, 12, 24 und 48 Stunden isoliert. Für die Expressionsbestimmung von AES in murinen Zellen (siehe 3.2.2) wurden 32D-Flt3-wt /32D-Flt3-ITD Zellen für 6 Stunden mit IL-3 (1 ng/ml) oder FL (20 ng/ml) behandelt. Im Anschluss wurde die Proteinexpression von *Amino-terminal Enhancer of Split* bestimmt.

U937 Zelllinien:

U937 Zellen wurden mit AML1-ETO in einem induzierbaren Vektor (PMT) transfiziert. Nach Induktion der Expression durch Zugabe von Zink wurde ein Teil der Zellen mit Trichostatin A, einem Histondeacetylasehemmstoff, behandelt (1 μ M für 2h). Im Anschluss wurde die mRNA-Expression von AES quantifiziert.

2.2 Vektoren und Plasmide

PMY: Der Vektor wird nach retroviraler Transduktion der Zielzelllinien (nur murin) stabil in das Genom integriert. Zusätzlich zum inklonierten Gen wird GFP exprimiert, was eine einfache Selektion der transfizierten Zellen ermöglicht.

pcDNA3: eukaryotischer Expressionsvektor. Eine Selektion der transfizierten Zellen kann mit Neomycin erfolgen.

pRNAT-H1.1/Neo: eukaryotischer Expressionsvektor, der zusätzlich zum einklonierten Gen GFP exprimiert, was eine einfache Identifikation der transfizierten Zellen ermöglicht. Die Selektion der positiven Zellen erfolgt mittels Neomycin.

Die Expression der auf PMT und Pr9-Vektoren kodierten Gene wurden jeweils vor den Experimenten für 12h mit 100 µM Zinksulfat induziert.

2.3 Oligonukleotide

shRNA AES M1:

fwd: GAT CCC GTA GTA CAT GAC GTA ATG CCT CTT GAT ATC CGG AGG
CAT TAC GTC ATG TAC TAT TTT TTC CAA A

rev: AGC TTT TGG AAA AAA TAG TAC ATG ACG TAA TGC CTC CGG ATA
TCA AGA GGC ATT ACG TCA TGT ACT ACG G

shRNA AES M2 :

fwd: GAT CCC GTG ATG GAG TTC AGC TCA GGA GTT GAT ATC CGC TCC
TGA GCT GAA CTC CAT CAT TTT TTC CAA A

rev: AGC TTT TGG AAA AAA ATG ATG GAG TTC AGC TCA GGA GCG GAT
ATC AAC TCC TGA GCT GAA CTC CAT CAC GG

scrambled version (scr 1024):

fwd: GAT CCC AGA TCC GTA TAG TGT ACC TTA TTG ATA TCC GTA AGG
TAC ACT ATA CGG ATC TTT

rev: AGC TTT TGG AAA AAA AGA TCC GTA TAG TGT ACC TTA CGG ATA
TCA ATA AGG TAC ACT ATA

Taqman-Primer:

human und murin:

AES *fwd* 5'TGT CCT ACG GAT TGA ACA TCG A 3'

AES *rev* 5'GGC GCA AAT CCC ATT CAG 3'

Sonde 5'ATG CAG AAA CAG GCG GAA ATT GTG AAG 3'

human:

GAPDH *fwd* 5`GAA GGT GAA GGT CGG AGT C 3`

GAPDH *rev* 5`GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC 3`

Sonde 5`CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC 3`

Zyklin D1 *fwd* 5`ACT ACC GCC TCA CAC GCT TC 3`

Zyklin D1 *rev* 5`CTT CGA TCT GCT CCT GGC AG 3`

Sonde 5`CCA GAG TGA TCA AGT GTG ACC CGG ACT 3`

Sequenzierungsprimer:

T7 (*fwd*): 5`TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3`

BGH (*rev*): 5`TAG AAG GCA CAG TCG AGG 3`

2.4 shRNA Konstrukte

Zur Herunterregulation von AES *in vivo* wurde eine shRNA sowie eine Zufallssequenz gleicher Länge in den Expressionsvektor pRNAT-H1.1Neo kloniert.

(Primer wurden über Genescript bezogen).

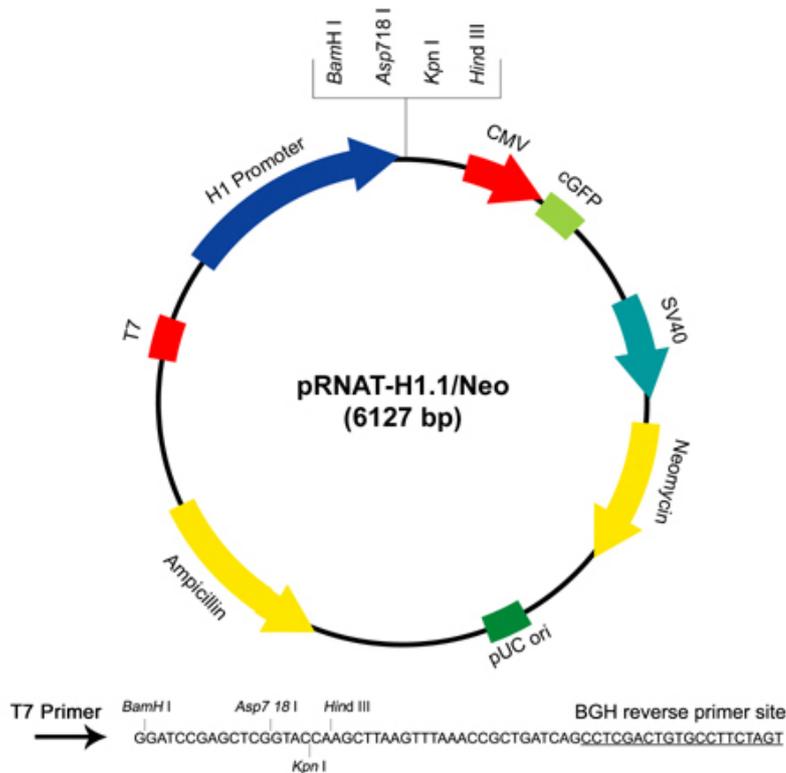


Abbildung 2.1: pRNAT-H1.1/Neo-Vektor für die shRNA-Konstrukte.

Die shRNA Inserts wurden jeweils in einem Gesamtvolumen von insgesamt 50 μ l mit je 220 pmol der *forward*- und *reverse*-Oligonukleotide mit Reaktionspuffer (10mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 1mM EDTA) angesetzt und durch Erhitzen und anschließendes langsames Abkühlen aneinandergelagert (Thermocycler-Programm: 95°C 4 min gefolgt von je 10 min bei 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35 und 30°C, gefolgt von 1h 30 min bei 25°C und weiteren 10 min bei je 20 und 15°C).

Der Vektor und die shRNA-Inserts wurden in Gegenwart des entsprechenden Puffers (NEB2) mit BamHI und HindIII für 1h bei 37°C verdaut. Nach Gelaufreinigung des linearisierten Vektors sowie der *Inserts* wurde beides im Verhältnis 3:1 über Nacht bei 16°C mittels Roche-T4-Ligase ligiert. Je 3 μ l des Ligationsansatzes wurden durch Hitzeschock in chemokompetente DH5 α Bakterien transformiert. Vor Ausplattieren auf ampicillinhaltigen LB-Platten wurden die Bakterien für eine Stunde bei 37°C in SOC-Medium inkubiert. Aus ampicillinresistenten Klonen wurden die Plasmide isoliert (mittels Quiagen MiniPräp-Kit, nach den Angaben des Herstellers). Der Erfolg der Klonierung wurde durch Kontrollrestriktion der Plasmide mit BamHI und HindIII,

gefolgt von Agarose-Gelelektrophorese sowie Sequenzierung der positiven Plasmide nachgewiesen. Dazu wurden 1 μ l des Plasmids mit 12,5 pmol T7-Primer, 2 μ l von 5-fach BD-Reaktionspuffer sowie 1 μ l Bigdye 3.1 (Applied Biosystems) gemischt, mit Wasser auf 10 μ l aufgefüllt und der Sequenzier-PCR zugeführt.

2.5 Transfektionen

32D Zellen wurden mittels Elektroporation mit den erstellten shRNA Konstrukten transfiziert. Hierzu wurden die Zellen auf eine Dichte von 3×10^6 /ml eingestellt und in 800 μ l PBS resuspendiert. Pro Ansatz wurden 30 μ g DNA eingesetzt. Die Elektroporation wurde mit dem Elektroporationsimpulsgenerator EPI 2500 durchgeführt, wobei eine Spannung von 330 V für 6 msec verwendet wurde. Die Zellen wurden nach der Elektroporation in 6-Loch-Platten aufgenommen. Nach 48 Stunden wurden GFP positive Zellen mittels Fluoreszenz-basierter Durchflusszytometrie isoliert und die Selektion mit Neomycin (G418) in entsprechender Dosis aufgenommen.

2.6 Protein-Isolation und Westernblots

Protein-Lysate wurden durch Lyse der Zellen mit Radioimmunpräzipitations (RIPA)-Puffer gewonnen. Die Zellen wurden abzentrifugiert, einmal in PBS gewaschen und anschließend in einer angemessenen Menge an LYSE-Puffer aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Die Lysate wurden bei 13000 U/min abzentrifugiert und die proteinhaltigen Überstände abgenommen. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch mittels BCA-Test nach den Angaben des Herstellers (Pierce) bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt.

20-80 μ g Protein wurden mittels Elektrophorese in einem Polyacrylamidgel (4-15% Tris-HCL, BIORAD) bei 80-120 Volt aufgetrennt. Das Blotten der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte bei 21 Volt und 4°C über Nacht. Die Membran wurde mit 5% entfetteter Milch geblockt und im Anschluss die zu untersuchenden Proteine mit Hilfe der in Tabelle 2.1 aufgelisteten Antikörper nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin nachgewiesen.

| Spezies | Erstantikörper | Quelle | Hersteller | Verdünnung | Zweitantikörper |
|---------|--------------------|-----------------------|----------------------|------------|---------------------|
| Human | Anti-Zyclin-D1 | Kaninchen, monoklonal | LAB VISION Corp. | 1/50 | anti Kaninchen Ig-G |
| Murin | Anti-Zyclin-D1 | Maus, monoklonal | Santa Cruz Tech. | 1/50 | anti Maus Ig-G |
| | Anti-eIF4E | Kaninchen, polyklonal | Cell Signaling Tech. | 1/1000 | anti Kaninchen Ig-G |
| | Anti-phospho eIF4E | Kaninchen, polyklonal | Cell Signaling Tech. | 1/1000 | anti Kaninchen Ig-G |
| | Anti-AKT | Kaninchen, polyklonal | Cell Signaling Tech. | 1/1000 | anti Kaninchen Ig-G |
| | Anti-phospho AKT | Kaninchen, polyklonal | Cell Signaling Tech. | 1/1000 | anti Kaninchen Ig-G |
| | Anti-AES | Kaninchen, N/A | Imgenex Corp. | 1/1000 | anti Kaninchen Ig-G |

Tabelle 2.1: Antikörper für die Westernblotanalysen

2.7 RNA-Isolation, Reverse Transkription und *Real-Time* RT-PCR

RNA-Isolation:

Die RNA der verwendeten Zelllinien wurde mit TRIzol Reagens (Total RNA Isolation Reagent) laut Protokoll des Herstellers (GIBCO BRL) isoliert:

1. Homogenisation:

Die Zellen wurden zentrifugiert, das Zellpellet anschließend in 1 ml Trizol Reagens pro 1×10^7 Zellen aufgenommen und lysiert.

2. Separationsphase:

Das Lysat wurde im Anschluss 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde 0,2 ml Chloroform hinzugefügt, geschüttelt und erneut für 2-3 Minuten inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation ($12.000 \times g$ für 14 Minuten bei 4°C) konnte die obere, RNA-enhaltende Phase abgenommen werden.

3. RNA Präzipitation:

Die RNA wurde durch Mischen mit 0,5 ml Isopropanol präzipitiert. Nach zehnmütiger Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender

Zentrifugation (12.000 x g für 10 Minuten bei 4°C) war das RNA-Präzipitat als Pellet sichtbar.

4. RNA Waschen:

Der Überstand wurde entfernt, das Pellet in 1ml 75% Ethanol gewaschen. Nach gründlicher Durchmischung mittels Vortex erfolgte erneut eine Zentrifugation (7500 x g für 5 Minuten bei 4°C)

5. Wiederauflösen der RNA:

Nach Lufttrocknung konnte das Pellet in 20 µl DEPC RNAse freiem Wasser aufgenommen und inkubiert werden (10 Minuten bei 55-60°C).

Im Anschluss wurde die Konzentration der RNA photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

Reverse Transkription:

Anhand der zuvor isolierten RNA wurde mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (eine RNA-abhängige DNA-Polymerase) ein DNA Strang erstellt, der zur eingesetzten RNA komplementär ist (cDNA = *complementary DNA*). Die Reverse Transkription erfolgte nach dem Protokoll der Firma Promega mit M-MLV (*Molony murine leukemia virus*) reverser Transkriptase unter Verwendung von RNAse-Inhibitoren (RNAse out, Promega).

Real-Time RT-PCR:

Die auf diese Weise gewonnene cDNA wurde im Anschluss unter Verwendung spezifischer Primer und Sonden (siehe Punkt 2.3) mittels *Real-Time* PCR quantifiziert. Die Messung der cDNA erlaubt direkte Rückschlüsse auf die mRNA-Expressionslevel der untersuchten Gene.

Alle amplifizierten Sequenzen wurden durch ein Primer- und SONDENSYSTEM detektiert. Die Sonde ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, der während der Amplifikation durch Abspaltung aktiviert wird. In allen Fällen wurde GAPDH als Referenzgen verwendet und die mRNA-Expression mit Hilfe einer Standardkurve errechnet.

2.8 Retrovirale Transduktion von primärem Mausknorpelmark

Herstellung retroviraler Überstände:

An Tag 0 wurden $2-3 \times 10^6$ PLAT-E Zellen in einer Zellkulturschale in 10 ml DMEM Medium mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) ausgesät. Diese Zellen, die stabil die benötigten Virushüllproteine exprimieren, wurden mittels Lipofectamin nach Angaben des Herstellers (Invitrogen) mit je 6-8 μg Plasmid-DNA (PMY) an Tag 1 transfiziert (in 5 ml Medium). 4 Stunden nach Transfektion wurden weitere 5 ml Medium zugefügt. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurde der Zellüberstand, der die an das Medium abgegebenen Viren enthält, abgenommen und 7 ml frisches Medium zugegeben. Dies wurde im 12-Stunden Rhythmus bis zum Tag 5-6 wiederholt. Die Virusüberstände wurden sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

Der „Virus Titer“ berechnet sich wie folgt:

Titer = % der transduzierten Zellen x ausgesäte Zellen x Zellteilungsfaktor x Verdünnungsfaktor = „*number of fluorescent transfer units* (FTU)“ pro ml Virusüberstand

Transduktion von murinen Knochenmarkszellen:

Der nachfolgende Tierversuch wurde durch das Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt Münster am 15.04.2005 genehmigt (Tierversuchsantragsnummer G15/2005).

Tag 1: Am ersten Tag erfolgte die intraperitoneale Injektion von 5-FU (5-Fluoruracil) in einer Menge von $150 \mu\text{g/g}$ Körpergewicht der Maus.

Tag 5: Am fünften Tag erfolgte die Isolation der Knochenmarkszellen aus den Oberschenkelknochen der injizierten Mäuse. Das Knochenmark wurde mit IMDM (*Iscove modified Dulbecco medium*) mit 10% FCS und 1% P/S aus den Femurknochen gespült. Im Anschluss wurden die erythroiden Zellen durch Zugabe eines hypotonen Puffers lysiert. Die Separation erfolgte mittels Zentrifugation (5 min bei 1000 U/min) und Waschen mit PBS. Die Zellen wurden gezählt und in einer Dichte von 2×10^6 pro 10 cm Zellkulturschale ausgesät. Das Wachstum der Zellen wurde durch Zusatz von Wachstumsfaktoren zum Medium stimuliert (IMDM mit Glutamat, Pyruvat, 20% FCS, 1% P/S, 10 ng/ml murinem IL-3, 5 ng/ml humanem IL-6 und 50 ng/ml murinem SCF).

Tag 7: Am siebten Tag erfolgte die Transduktion der Zellen. Hierzu wurde eine 6-Loch-Platte mit Nanofectin beschichtet (Inkubation 2h bei Raumtemperatur). Danach wurde die Platte mit 1% HSA (humanes Serumalbumin) in PBS für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur geblockt, um eventuell unbeschichtete Stellen abzudecken. Hierauf wurde einmal mit HBSS-Puffer gewaschen und dann je 3 ml Virusüberstand pro *well* zugegeben. Anschließend erfolgt eine halbstündige Zentrifugation bei 3000 U/min und 4°C, dabei wurden jeweils 3 ml des Virusüberstandes durch frischen Überstand ersetzt. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand komplett abgenommen und die Knochenmarkszellen auf die beschichteten Platten gegeben, 5 min bei Raumtemperatur und 400 g zentrifugiert und über Nacht inkubiert. Dieser Transduktionsvorgang wurde an Tag 8 und Tag 9 erneut durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Selektion der GFP-positiven Zellen mittels Durchflusszytometrie. Aus den GFP-positiven Zellen wurden nun Kolonie-Assays angesetzt.

2.9 Klonales Wachstum in Methylcellulose (Kolonie-Assay)

Die mit den shRNA - und Kontrollkonstrukten stabil transfizierten 32D Zellen wurden abzentrifugiert, mit IMDM gewaschen und auf eine Dichte von 500 Zellen pro μl eingestellt. Pro Triplikat wurden 460 μl dieser Zellsuspension pro 35 mm Zellkulturschale in 1 ml Medium (IMDM mit 1% Methylcellulose, 20% FCS, 1 ng/ml IL-3 und ggf. 0,6 ng/ml Neomycin) ausgesät. Die Koloniezahlen wurde an den angegebenen Tagen gezählt und fotografisch dokumentiert.

Die Kolonie-Assays mit murinem Knochenmarkszellen wurden mit einer vorgefertigten Methylcellulosemischung angefertigt, die neben IL-3 weitere essentielle Wachstumsfaktoren (IL-6, mSCF) enthielt. Die verwendete Zellzahl und Inkubationsbedingungen war identisch mit den 32D Kolonie-Assays.

2.10 Replating

Bei den Kolonie Assays mit primären Mausknorpelmark wurden die Zellen nach erfolgreicher Erstaussaat in einem weiteren Assay ausgesät. Dazu wurde der Inhalt der Zellkulturschale in PBS gelöst und mehrmals mit PBS gewaschen. Die Zellen

wurden gezählt und dann erneut auf ihre Fähigkeit zur Kolonienbildung getestet. Pro Zellkulturschale wurden 2×10^3 Zellen ausgesiedelt (Medium siehe 2.9). Diese *Replatings* wurden ebenfalls 3-fach angesetzt. Die Kolonien wurden nach 7-10 Tagen gezählt. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt bis kein Kolonienwachstum mehr zu beobachten war.

2.11 Tissue Micro Arrays

Der AES-Expressionsgrad von Patientenknochenmark wurde im Rahmen von *Tissue Micro Arrays* an Knochenmarkstanzen untersucht. Diese *Tissue Micro Arrays* enthielten Proben von 143 erstdiagnostizierten, unbehandelten AML-Patienten, als Kontrolle dienten 40 Proben physiologischen Knochenmarks (normales Knochenmark, NBM). Die *Tissue Micro Arrays* wurden im Gerhard-Domagk Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Münster durchgeführt. Zum Nachweis von AES wurde der in Tabelle 2.1 aufgelistete anti-AES-Antikörper in einer Verdünnung von 1:250 eingesetzt. Die gefärbten Präparate wurden uns wieder zur Verfügung gestellt und je nach Expressionsgrad in vier Gruppen eingeteilt. Eine entsprechende Genehmigung zur wissenschaftlichen Verwendung der Proben wurde durch die zuständige Ethikkommission erteilt.

3 Ergebnisse

3.1 Regulation von Zyklin D1

3.1.1 Regulation von Zyklin D1 in der Promyelozyten-Leukämiezelllinie NB4

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Regulation der Zyklin D1 Expression in humanen Leukämiezellen untersucht. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Fusionsproteine einen Einfluss auf die Expression von Zyklin D1 haben. In diesem Teil der Arbeit ging es darum, herauszufinden ob diese Regulation auf transkriptioneller oder translationeller Ebene stattfindet.

In der humanen Leukämiezelllinie NB4 wird das Fusionsprotein PML-RAR α exprimiert, dessen Wirkung durch *all-trans*-Retinsäure (ATRA) gehemmt werden kann. Daher wurde zum einen Protein und RNA von nativen NB4 Zellen gewonnen, zum anderen von mit ATRA vorbehandelten NB4 Zellen. Als Kontrolle dienten Lysate von NB4-R2 Zellen, welche nicht auf eine Behandlung mit ATRA ansprechen.

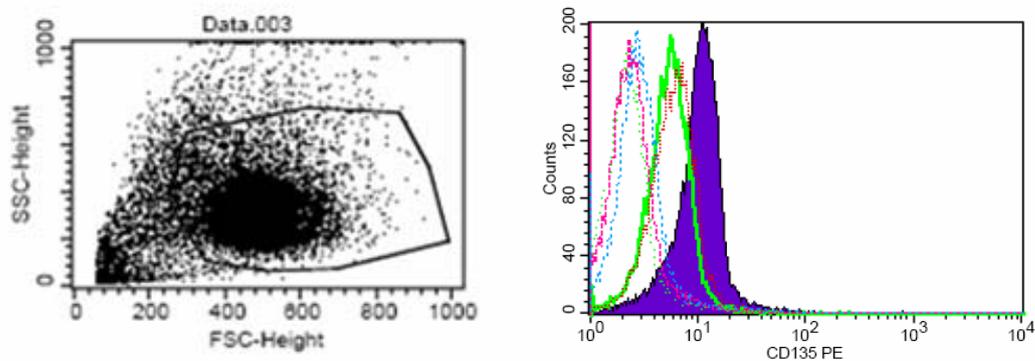


Abbildung 3.1 FACS-Analyse der eingesetzten NB4-Zellen. Native NB4-Zellen und NB4-R2-Zellen sowie mit hFlt3-ITD transfizierte NB4-Zellen wurden vor den Versuchen auf das Vorhandensein von Flt3 (CD 135) untersucht. Das linke Bild zeigt die Auswahl der untersuchten Zellen. Die rechte Seite zeigt die Kurven der verschiedenen Zellgruppen bei Nachweis von Flt3: Isotypenkontrolle (pink, blau), NB4-wt-Zellen (grün), NB4-R2-Zellen (grün), NB4-hFlt3-ITD-Zellen (violett).

3.1.1.1 Regulation der Zyklin D1 Expression durch PML-RAR α

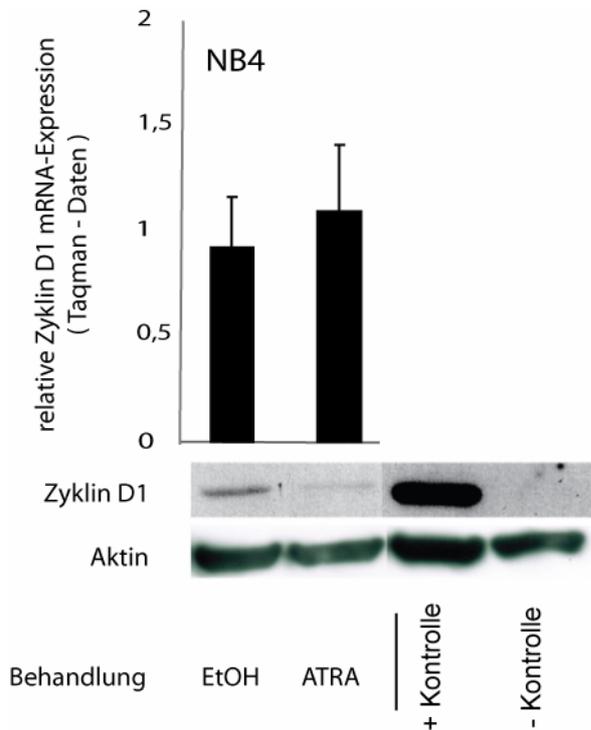


Abbildung 3.2 Expression von Zyklin D1 in NB4-Zellen nach Behandlung mit ATRA. Quantifizierung der Zyklin D1 mRNA-Expression nach 48h Behandlung mit ATRA (rechter Balken) oder Ethanol (linker Balken). Darunter die zugehörige Westernblot-Analyse der Proteinexpression. Als Positivkontrolle dienten 32D-Zyklin-D1-Zellen, als Negativkontrolle wurden mit einem Leervektor transfizierte 32D-Zellen eingesetzt.

Abbildung 3.2 zeigt, dass es auf transkriptioneller Ebene durch Inhibition des Fusionsproteins PML-RAR α mittels ATRA nicht zu einer signifikanten Veränderung der Zyklin D1 Expression kommt. Die zur Kontrolle mit Ethanol behandelten Zellen zeigen nach 48 Stunden sogar eine geringfügig niedrigere mRNA-Expression von Zyklin D1 als die Zellen, die über den gleichen Zeitraum mit ATRA behandelt worden sind. Die Westernblotanalyse zeigt, dass die mit ATRA behandelten Zellen auf Proteinebene weniger Zyklin D1 exprimieren als die mit Ethanol behandelte Kontrollgruppe.

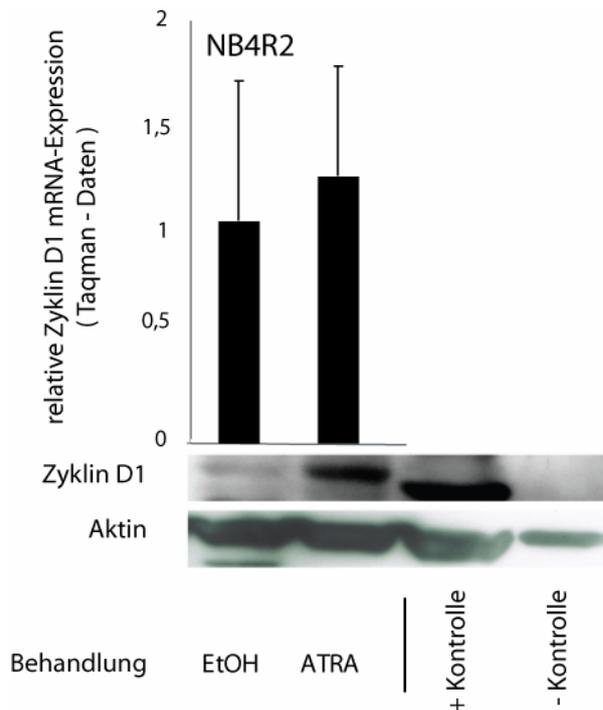


Abbildung 3.3 Expression von Zyclin D1 in NB4-R2-Zellen nach Behandlung mit ATRA. Quantifizierung der Zyclin D1 mRNA- und Proteinexpression von 48h mit ATRA (rechter Balken) oder Ethanol behandelten NB4-R2-Zellen (linker Balken). Positiv- und Negativkontrolle wie in Abb. 3.2. Die unterschiedliche Bandenhöhe der Positivkontrolle weist auf eine posttranslationale Modifikation hin.

Abbildung 3.3 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung an den ATRA-resistenten NB4-R2 Zellen. Die Expression der Zyclin D1 mRNA zeigt wiederum kaum Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen. Die Expression auf transkriptioneller Ebene ist in den 48 Stunden mit ATRA behandelten Zellen gegenüber den Zellen, die mit Ethanol behandelt wurden lediglich leicht gesteigert. Ein deutlicher Unterschied findet sich auf dem Proteinlevel. Wie zu erwarten zeigen die NB4-R2 Zellen keine reduzierte Proteinexpression durch die Behandlung mit ATRA. Im Vergleich zu den mit Ethanol behandelten Zellen kommt es in dieser Gruppe sogar zu einer gesteigerten Zyclin D1 Expression.

3.1.1.2 Regulation der Zyklin D1 Expression durch Flt3-ITD allein und in Kombination mit dem Fusionsprotein PML-RAR α .

Eine weitere Veränderung, die häufig in humanen Leukämiezellen nachgewiesen wird, ist eine Mutation der Rezeptortyrosinkinase Flt3. Untersuchungen haben ergeben, dass bei AML-Patienten das Vorliegen des Fusionsproteins PML-RAR α häufig mit der ITD-Mutation von Flt3 vergesellschaftet ist. Im folgenden Teil der Arbeit ging es darum, die Regulation von Zyklin D1 durch Flt3 alleine und in Kooperation mit dem Fusionsprotein PML-RAR α zu untersuchen.

Die mit hFlt3-ITD transfizierten NB4-Zellen tragen beide Mutationsklassen, sowohl das Fusionsprotein PML-RAR α als auch die Mutation der Rezeptortyrosinkinase Flt3. Durch Zugabe von ATRA, bzw. dem Tyrosinkinaseinhibitor PKC412 kann man wahlweise eine der Mutationen „abschalten“. Auf diese Weise kann man die Wirkung einer Mutation isoliert analysieren und auch eine eventuelle Kooperation nachweisen. Die Zyklin D1 mRNA- und Proteinexpression wurde nach 48-stündiger Behandlung von NB4-hFlt3-ITD- und nativen NB4-Zellen mit ATRA oder PKC412 untersucht.

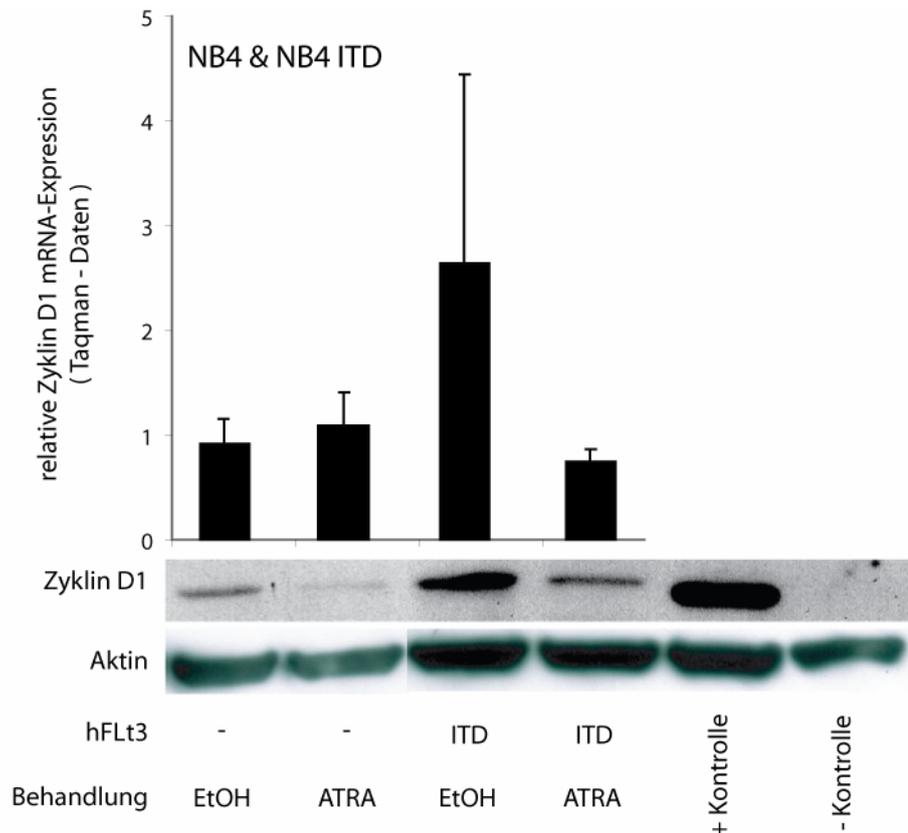


Abbildung 3.4 Zyklin D1 Expression: Einfluss der mutierten Rezeptortyrosinkinase hFlt3-ITD allein und in Kombination mit dem Fusionsprotein PML-RAR α . Taqman- und Westernblotanalyse von NB4- Kontroll- und NB4-hFlt3-ITD-Zellen. Quantifizierung der Zyklin D1 mRNA-Expression und Proteinexpression von 48h mit ATRA (2. Balken und 4. Balken) oder Ethanol (1. Balken und 3. Balken) behandelten NB4- und NB4-hFlt3-ITD-Zellen. Positiv- und Negativkontrolle wie in Abb. 3.2.

Wie unter Paragraph 3.1.1.1 bereits beschrieben, kommt es bei den NB4-Kontrollzellen durch eine Behandlung mit ATRA zu keiner signifikanten Veränderung der Zyklin D1 Expression. Anders stellt es sich bei den NB4-hFlt3-ITD-Zellen dar (Abb. 3.4). Man erkennt, dass diese Zellen generell mehr Zyklin D1 mRNA exprimieren als die Wildtyp NB4-Zellen. Durch die Inhibition des Fusionsproteins PML-RAR α ist eine deutliche Reduktion der Transkription zu beobachten, das Zyklin D1 mRNA-Level sinkt bis auf das Level der Wildtypzellen ab.

Auf Proteinebene zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen NB4- und NB4-hFlt3-ITD-Zellen. Die Expression von Zyklin D1 ist in allen NB4-Zellen mit mutierter Rezeptortyrosinkinase gesteigert. Die Veränderungen der Expression in NB4-Zellen (48h Ethanol, 48h ATRA) wurden bereits in Abbildung 3.2 gezeigt. Im Vergleich dazu weisen die Zellen mit der mutierten Rezeptortyrosinkinase eine stärkere

Proteinexpression auf. Im Rahmen einer 48-stündigen Behandlung mit ATRA kommt es im Vergleich zu den für 48 Stunden mit Ethanol behandelten Zellen zu einer deutlichen Reduktion der Zyklin D1 Proteinexpression, das Niveau der mit ATRA behandelten NB4-Zellen ohne Flt3-ITD wird jedoch nicht erreicht.

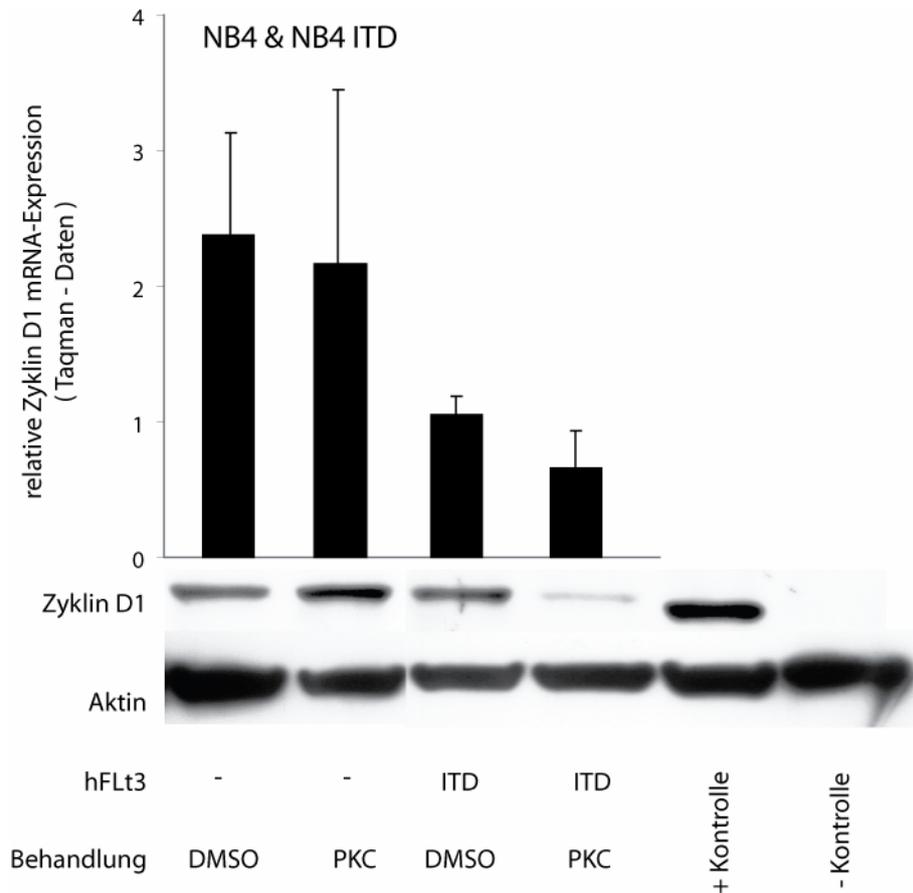


Abbildung 3.5 Zyklin D1 Expression: Einfluss des Fusionsproteins PML-RAR α allein und in Kombination mit der mutierten Rezeptortyrosinkinase hFlt3-ITD. Taqman- und Westernblotanalyse von NB4- und NB4-hFlt3-ITD-Zellysaten. Hemmung der Wirkung von Flt3-ITD durch 48-stündige Behandlung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor PKC412. 48-stündige Behandlung mit DMSO zur Kontrolle. Positiv- und Negativkontrolle wie in Abb. 3.2.

Um den Effekt von Flt3-ITD zu untersuchen, wurden die soeben beschriebenen Zellen (NB4-Kontroll- und NB4-hFlt3-ITD-Zellen) mit PKC412 und DMSO als Kontrolle behandelt.

Abbildung 3.5 zeigt, dass kaum ein Unterschied in der Zyklin D1 mRNA-Expression beobachtet werden kann. Durch die Behandlung mit PKC412 kommt es in den NB4-hFlt3-ITD-Zellen hingegen zu einem Absinken der Zyklin D1 mRNA um etwa 40%. Auf Proteinebene zeigt sich in den nativen NB4-Zellen, dass eine Behandlung mit PKC412 nicht zu einer Supprimierung der Zyklin D1 Expression führt. Durch die Behandlung scheint es im Vergleich zur Kontrollgruppe (DMSO für 48 Stunden) sogar zu einer Steigerung der Expression zu kommen. Nach 48-stündiger Behandlung mit DMSO ist bei beiden Zellgruppen eine vergleichbare Proteinexpression im Westernblot nachweisbar. Unter Berücksichtigung der Ladekontrolle Aktin ist jedoch eine vermehrte Zyklin D1 Expression der NB4-hFlt3-ITD-Zellen zu postulieren. Die 48-stündige Behandlung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor PKC412 führt bei den NB4-hFlt3-ITD-Zellen wie erwartet zu einer deutlichen Reduktion der Zyklin D1 Expression auf Proteinebene.

3.1.2 Einfluss von Flt3-ITD auf die Expression von Zyklin D1 und Effektoren des PI3K/AKT Signaltransduktionsweges in 32D-Zellen

Es ist bekannt, dass der PI3-Kinase/AKT Signaltransduktionsweg eine wichtige Rolle in verschiedenen Aspekten des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung und der Apoptose spielt. Über diesen Signaltransduktionsweg wird die Höhe von mTOR reguliert, welches über eine Inhibition von 4E-BP eine Aktivitätserhöhung von eIF4E bewirkt. eIF4E wiederum ist ein Bestandteil des *eukaryotic initiation factor* (eIF), der durch Rekrutierung des Ribosomens zur mRNA die Translation einleitet. Sowohl ein aktivierter PI3-Kinase/AKT Signaltransduktionsweg als auch eine Überexpression von eIF4E bewirken eine höhere Expression von Zyklin D1. Es konnte gezeigt werden, dass neben einer transkriptionellen Regulation von Zyklin D1 auch eine translationelle Regulation über Effektoren des PI3-Kinase/AKT Signaltransduktionsweges existiert. Durch eine Analyse der Komponenten dieses Signalweges wurde hier untersucht, ob die Flt3-ITD Wirkung auf Zyklin D1 über diesen Weg vermittelt wird.

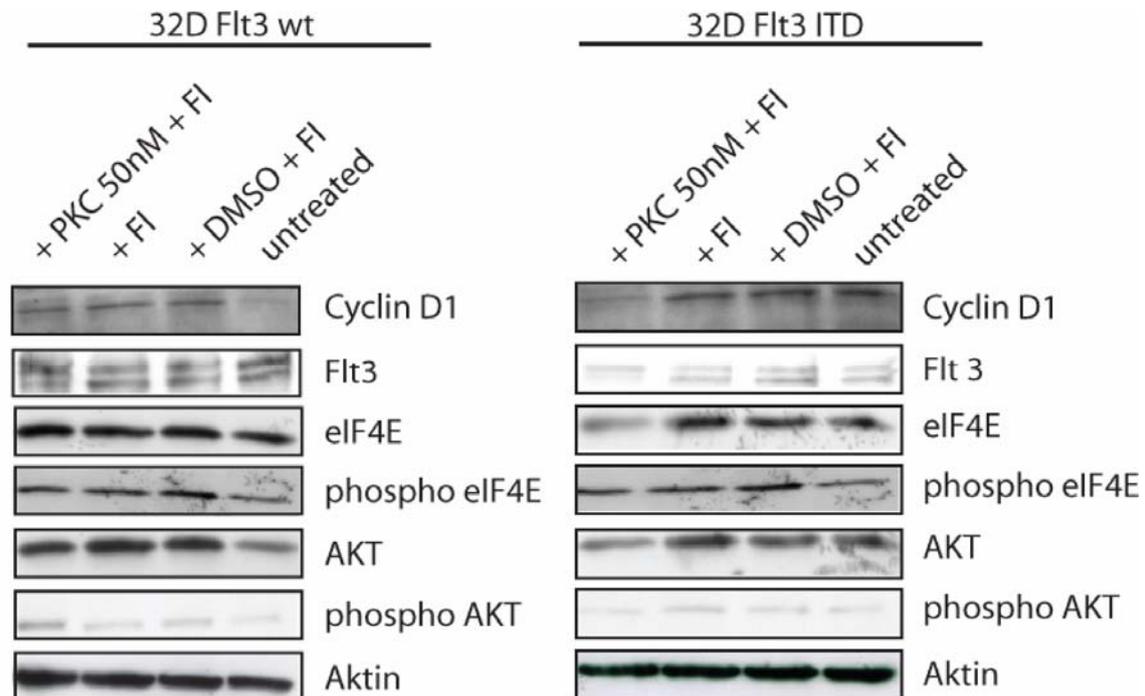


Abbildung 3.6 Einfluss der ITD-Mutation von Flt3 auf die Expression von Zyklin D1 und Effektoren des PI3-Kinase/AKT Signaltransduktionsweges in 32D-Zellen. Abgebildet sind Westernblot-Analysen von 32D-Flt3-wt- und 32D-Flt3-ITD-Zellysaten. Behandlung mit PKC412 50nM zur Inhibition von Flt3-ITD. Behandlung mit FL zur Induktion der über Flt3 vermittelten Signalwege. Weiterhin Behandlung mit DMSO und PKC412.

Hierzu wurden murine 32D-Zellen eingesetzt, die mit der Wildtypvariante der Rezeptortyrosinkinase transfiziert worden sind (32D hFlt3-wt) und Zellen, die mit der ITD-Mutante transfiziert worden sind (32D hFlt3-ITD, siehe Abb. 3.6). Die Zellen wurden entweder mit FL oder PKC412 in Kombination mit FL behandelt. Als Kontrolle wurden mit DMSO und FL behandelte, sowie unbehandelte Zellen untersucht. Nach 48 Stunden wurde jeweils Protein isoliert. Im Westernblot wurden Antikörper gegen Flt3, gegen Zyklin D1 und gegen zwei Effektoren des PI3/AKT Signaltransduktionsweges (AKT und eIF4E) eingesetzt. Hierbei wurden die aktiven phosphorylierten und die inaktiven unphosphorylierten Versionen von AKT und eIF4E unterschieden. Als Ladekontrolle diente wiederum Aktin.

Effekt auf eIF4E: Bei den Proteinlysaten der 32D-hFlt3-wt-Zellen lässt sich eine deutliche Bande nachweisen. Eine Veränderung der Translation durch eine der durchgeführten Behandlungen ist jedoch nicht zu beobachten. Dies ist auch bei den

32D-hFlt3-ITD-Zellen zu erkennen. Nachdem die Zellen PKC412 exponiert wurden, ist jedoch eine niedrigere eIF4E Expression zu verzeichnen.

Eine 48-stündige Inkubation mit FL führt in beiden Zellgruppen zu einem gesteigerten Vorkommen von phosphoryliertem eIF4E im Vergleich zur jeweils unbehandelten Kontrollgruppe. Eine Unterdrückung der Phosphorylierung von eIF4E durch Zugabe von PKC412 ist jedoch nicht zu beobachten.

Effekt auf AKT: 32D-hFlt3-wt-Zellen, die FL exponiert wurden, zeigen ein erhöhtes Vorkommen an AKT. Zudem ist die Phosphorylierung von AKT gesteigert. Nach Behandlung mit PKC412 zeigen die 32D-hFlt3-ITD-Zellen niedrigere AKT-Level als die unbehandelten Zellen. Ebenso ist eine Reduktion der Phosphorylierung von AKT zu verzeichnen. Dies ist bei den Wildtypzellen nicht zu erkennen.

Effekt auf Zyklin D1: Wie bereits gezeigt, kommt es durch die 50-nanomolare Gabe von PKC412 nur bei den ITD-Zellen zu einer Reduktion der Zyklin D1 Expression. In der Gruppe der 32D-hFlt3-wt-Zellen bewirkt die FL Gabe eine Stimulation der Zyklin D1 Translation. Durch die Gabe von FL ist bei den ITD-Zellen keine weitere Steigerung der Zyklin D1 Expression zu erzielen.

3.2 Regulation von *Amino-terminal Enhancer of Split*

3.2.1 Einfluss von Fusionsproteinen auf die Expression von AES

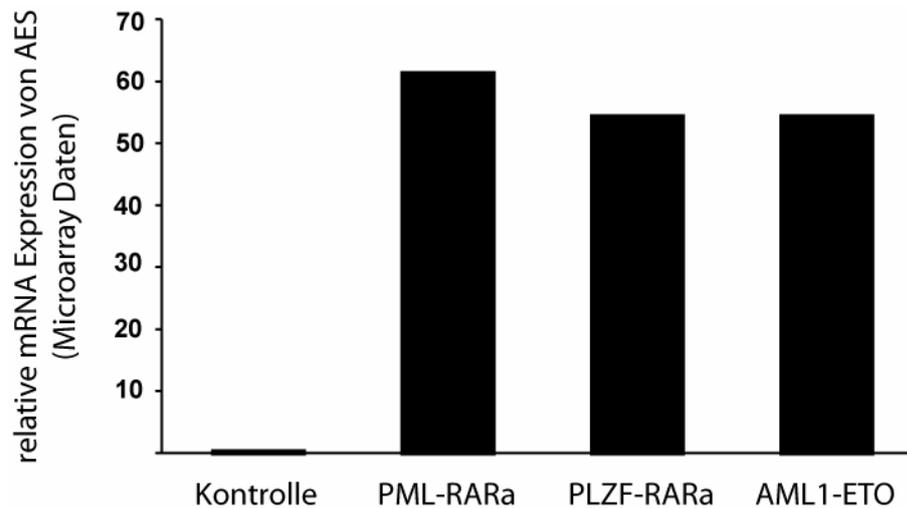


Abbildung 3.7 Einfluss von Fusionsproteinen auf die Expression von AES. Abgebildet sind Ergebnisse eines mRNA *Microarrays*. Die Fusionsgene wurden in einem durch Zn^{+} induzierbaren Vektor in U937 Zellen transfiziert. Als Kontrolle dienten mit einem Leervektor (PMT) transfizierte U937 Zellen. Die AES-Expression dieser Zellen wurde = 1 gesetzt.

Im Rahmen von Vorarbeiten wurde mittels *Microarray*-Analysen nach Zielgenen von der Fusionsproteine PML-RAR α , PLZF-RAR α und AML1-ETO gesucht (Abb. 3.7). Der Einfluss der Fusionsproteine auf die transkriptionelle Regulation der Zielgene wurde quantifiziert. Als Kontrolle diente hier die AES-Expression in U937-Zellen, die mit PMT als Leervektor transfiziert wurden (U937-PMT).

Die abgebildeten *Microarray*-Daten belegen, dass es durch die untersuchten Fusionsproteine zu einer sehr starken Induktion der mRNA-Expression von *Amino-terminal Enhancer of Split* kommt. PML-RAR α , PLZF-RAR α und AML1-ETO führen zu einer mehr als fünfzigfachen transkriptionellen Hochregulation von *Amino-terminal Enhancer of Split*. PML-RAR α bewirkt dabei die größte Expressionssteigerung (ca. 60-fach).

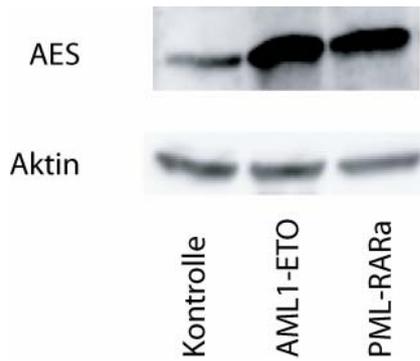


Abbildung 3.8 Induktion von *Amino-terminal Enhancer of Split* auf Proteinebene durch Fusionsproteine. Abgebildet ist eine Westernblot-Analyse von Lysaten transfizierter U937-Zellen. Die Fusionsgene wurden in einem induzierbaren Vektor (PMT) in die Zellen transfiziert und mit Zink induziert. Als Kontrolle diente U937-PMT.

Um den Einfluss von PML-RAR α und AML1-ETO auf die AES-Regulation auch auf Proteinebene zu untersuchen, wurden U937-Zellen mit AML1-ETO und PML-RAR α transfiziert und anschließend Proteinlysate hergestellt. Als Kontrolle dienten Lysate von U937-PMT. Wie in Abbildung 3.8 gezeigt, ist die Steigerung der AES-Expression durch die Fusionsproteine ebenfalls sehr deutlich auf Proteinebene nachzuweisen. In der Kontrolle U937-PMT ist nur eine vergleichsweise geringe Menge AES nachweisbar.

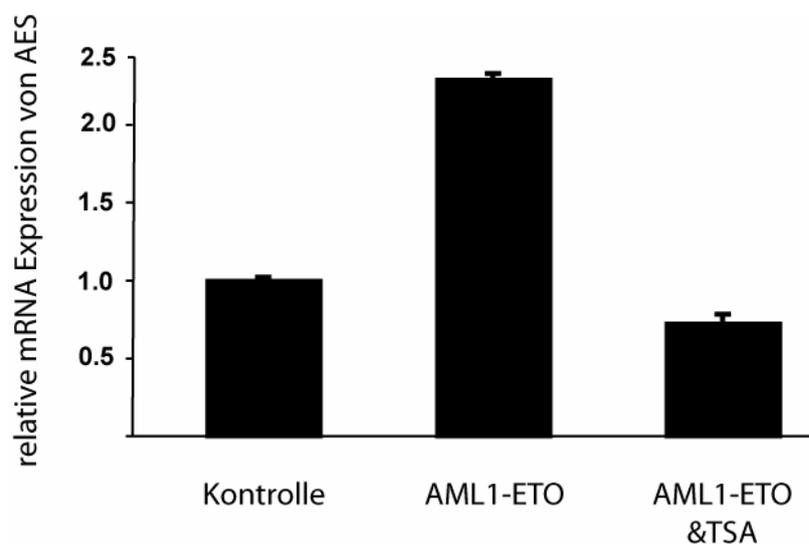


Abbildung 3.9 Beeinflussung der AES-Expression durch AML1-ETO. Dargestellt ist das Ergebnis einer Taqman-Analyse, gezeigt als Mittelwert von drei Versuchen. Die AES-Expression von U937-PMT-Zellen wurde als Bezugspunkt (=1) festgelegt. Alle Zellen wurden durch Gabe von Zn⁺ induziert. Die Hälfte der AML1-ETO exprimierenden Zellen wurde anschließend zusätzlich für 2 Stunden mit 1 μ M TSA (HDAC-Hemmer) behandelt.

Zur weiteren Analyse des Einflusses des Fusionsproteins AML1-ETO auf die Transkription von *Amino-terminal Enhancer of Split* in den verwendeten Zelllinien wurde eine Taqman-Analyse durchgeführt (siehe Abb. 3.9). Die AES mRNA-Expression von mit AML1-ETO transfizierten U937-Zellen wurde bestimmt. In einer Versuchsgruppe wurde die Wirkung von AML1-ETO durch die 2-stündige Behandlung mit TSA (Trichostatin A, ein Histondeacetylasehemmstoff) gehemmt. Als Bezugsgröße dienten U937-PMT-Zellen, hier wurde die Expression von *Amino-terminal Enhancer of Split* gleich eins gesetzt.

Wie man in Abbildung 3.9 erkennen kann, ist die mRNA von AES in den Zellen, die AML1-ETO exprimieren gegenüber der Kontrollgruppe mehr als 2-fach gesteigert ($p = 0,0003$). Bei Behandlung mit TSA und der damit verbundenen Hemmung der transkriptionellen Wirkung des Fusionsproteins, zeigt sich eine AES mRNA-Expression, die sogar niedriger ausfällt als in der Kontrollgruppe (0,8-fach, $p = 0,016$).

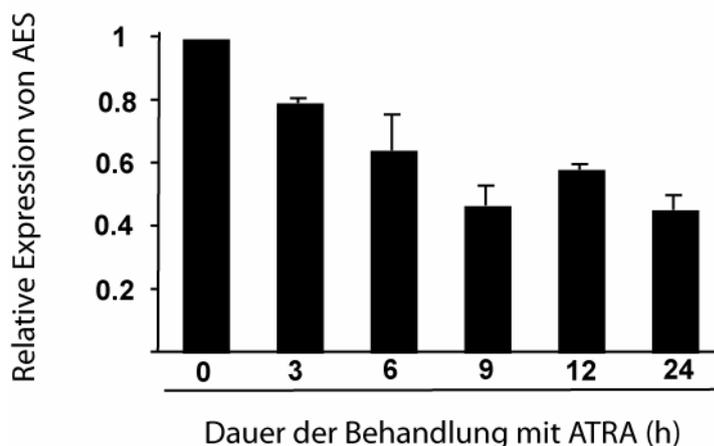


Abbildung 3.10 *real-time* RT-PCR Analyse der AES mRNA-Expression von NB4-Zellen. Gezeigt ist der Mittelwert aus drei Versuchen und die zugehörige Standardabweichung. Die PML-RAR α -exprimierenden NB4-Zellen wurden mit ATRA (10^{-6} molar) behandelt.

Im Folgenden wurde untersucht, wie sich die Expression der AES-mRNA durch Inhibition der Wirkung des Fusionsproteins PML-RAR α verändert. Dazu wurden NB4-Zellen kultiviert und mit ATRA behandelt, um die Wirkung des Fusionsproteins aufzuheben. Nach 0, 3, 6, 9 und 12 Stunden wurde mRNA isoliert und mit Hilfe einer *real-time* RT-PCR die Höhe der AES mRNA-Expression bestimmt.

In Abbildung 3.10 ist zu erkennen, dass die Hemmung vom PML-RAR α durch ATRA in einer Abnahme der AES mRNA-Expression mündet. Hierbei sinkt die Expression von AES kontinuierlich mit der Dauer der ATRA-Behandlung, nach 24h Behandlung erreicht sie ca. 50% der initialen Expression.

3.2.2 Expression von AES in 32D Zellen

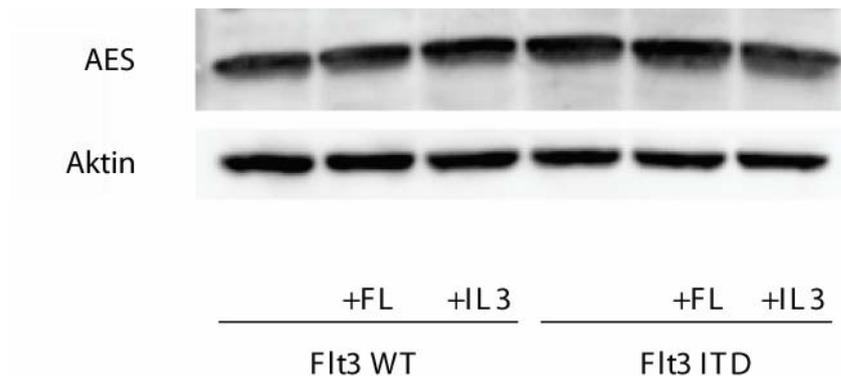


Abbildung 3.11 Expression von *Amino-terminal Enhancer of Split* in 32D-Zellen. Die Abbildung zeigt eine Westernblot-Analyse mit Zelllysaten von 32D-Flt3-wt- und 32D-Flt3-ITD-Zellen. Stimulation der Zellen durch Gabe von FL (20ng/ml) und IL-3 (1ng/ml).

Die Abbildung 3.11 zeigt, dass *Amino-terminal Enhancer of Split* in 32D-Zellen stark exprimiert wird. Wie der Westernblot zeigt, ist die Expression von AES in 32D-Zellen durch die ITD-Mutation der Rezeptortyrosinkinase Flt3 nicht weiter induziert. Die Expression ist unabhängig davon, ob die Zellen die Normalversion Flt3 oder die mutierte Variante Flt3-ITD tragen. Weder nach Zugabe von FL als natürlichem Liganden der Rezeptortyrosinkinase, noch durch IL-3 als Wachstumsfaktor ist in einer der zwei Zelllinien eine zusätzliche Steigerung der Expression zu beobachten.

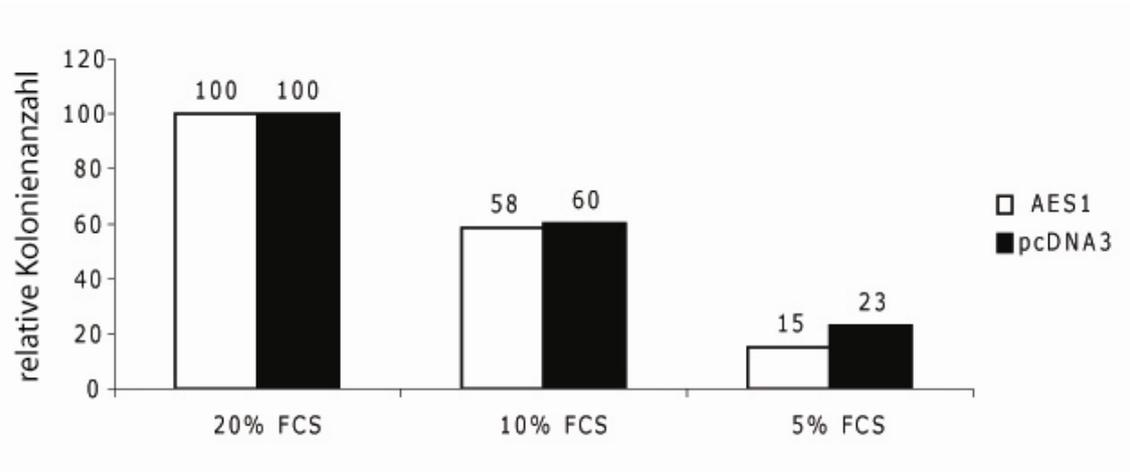


Abbildung 3.12 Kolonienwachstum von stabil mit AES transfizierten 32D-Zellen. Die Abbildung zeigt eine Gegenüberstellung der relativen Kolonienzahl von stabil mit AES transfizierten 32D-Zellen und 32D-Zellen, die mit pc-DNA3 als Leervektor transfiziert wurden. Die Kolonien wurden während des Wachstums unterschiedlichen FCS-Konzentrationen (5, 10, 20%) ausgesetzt. Die maximale Kolonienzahl in 32D-pcDNA3 und 32D-AES wurde jeweils gleich 100 gesetzt.

Nachdem nachgewiesen wurde, dass *Amino-terminal Enhancer of Split* in 32D-Zellen stark exprimiert wird, wurde im nächsten Schritt untersucht, welchen Einfluss AES auf das Kolonienwachstum von 32D-Zellen hat. Hierzu wurden 32D-Zellen stabil mit pcDNA3-AES transfiziert und in Methylcellulose ausgesät. Zur Kontrolle wurden mit pcDNA3 als Leervektor transfizierte 32D-Zellen eingesetzt. Das Kolonienwachstum wurde nun unter unterschiedlichen FCS-Konzentrationen betrachtet. Abbildung 3.12 zeigt, dass das Kolonienwachstum mit steigender FCS Konzentration zunimmt, unabhängig davon mit welchem Konstrukt die 32D-Zellen transfiziert wurden. Es ist zu erkennen, dass eine AES-Überexpression in 32D-Zellen nicht zu einem Wachstumsvorteil führt, bei niedrigeren FCS-Konzentrationen zeigen die 32D-AES-Zellen sogar eine verhältnismäßig niedrigere Kolonienzahl als die Kontrollgruppe.

3.2.3 Expression von AES in murinem Gewebe

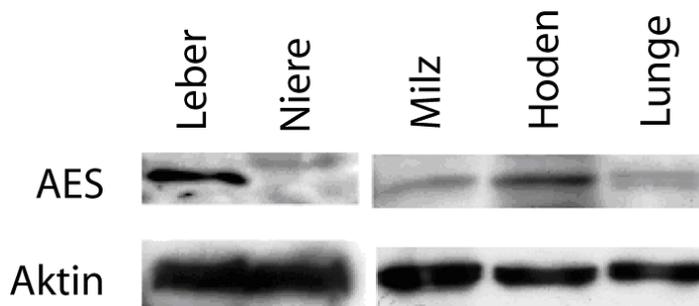


Abbildung 3.13 Expression von *Amino-terminal Enhancer of Split* in murinem Gewebe. Westernblot-Analyse mit RIPA-Lysaten von Organen von balb/c-Mäusen.

Anhand einer Westernblotanalyse (Abb. 3.13) wurde untersucht, wo und in welchem Ausmaß AES in verschiedenen Mausorganen exprimiert wird. Dazu wurden RIPA-Lysate der Organe von balb/c-Mäusen eingesetzt (RIPA-Lysate der Organe lagen in der Arbeitsgruppe vor). Eine besonders hohe Expression zeigt sich auf Proteinebene in der Leber und im Hoden. Weniger stark ausgeprägt kommt AES auch in Milz und Lunge vor, in der Niere konnte es nicht nachgewiesen werden.

3.2.4 Expression von AES in humanen Zelllinien

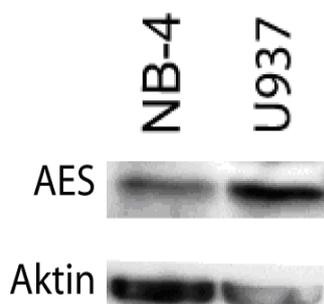


Abbildung 3.14 Expression von *Amino-terminal Enhancer of Split* in humanen Leukämiezelllinien. Westernblot- Analyse für AES in NB4- und U937-Zelllysaten.

Die Westernblot-Analyse in Abbildung 3.14 zeigt, dass *Amino-terminal Enhancer of Split* auch in der humanen Leukämiezelllinie NB4 und in U937-Zellen exprimiert wird. U937- Zellen weisen dabei eine stärkere Expression auf.

3.2.5 Expression von AES in Knochenmark von AML-Patienten

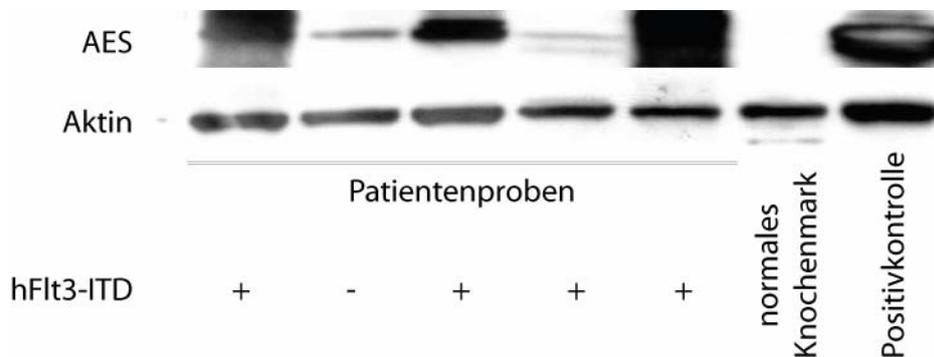


Abbildung 3.15 Expression von *Amino-terminal Enhancer of Split* in Knochenmark von AML-Patienten. Abgebildet ist eine Westernblot-Analyse von RIPA-Lysaten, die aus Patientenknorpelmark gewonnen wurden. Mit angegeben ist der Status der Rezeptortyrosinkinase Flt3 in den Patientenblasten. Als Negativkontrolle diente Knochenmark eines gesunden Spenders, als Positivkontrolle das Lysat von stabil mit AES transfizierten 32D-Zellen.

Der Westernblot in Abbildung 3.15 zeigt, dass AES im Knochenmark von AML-Patienten in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert wird, in Knochenmark des gesunden Menschen jedoch nicht. Die Höhe der Expression von AES auf Proteinebene hängt dabei in diesen wenigen Patientenproben nicht vom Vorhandensein der ITD-Mutation der Rezeptortyrosinkinase Flt3 in den AML-Blasten ab.

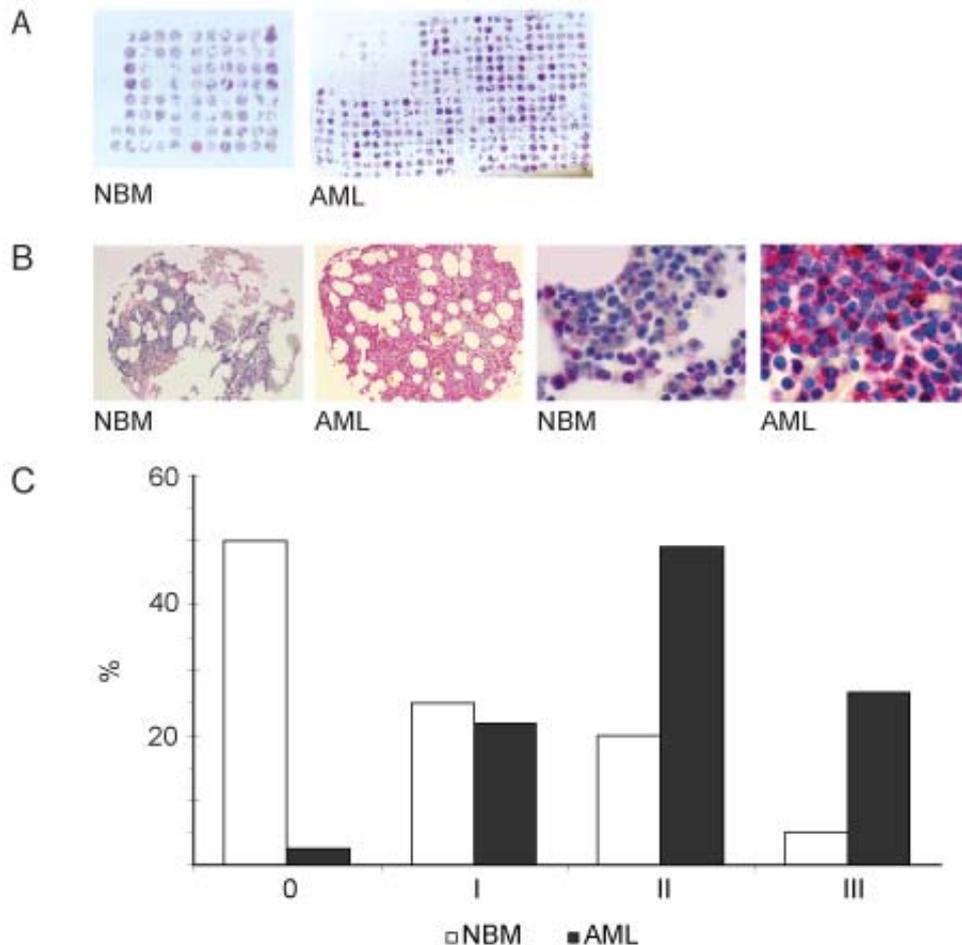


Abbildung 3.16 AES-Expression in Tissue Micro Arrays von normalem Knochenmark und Knochenmark von AML-Patienten. **A:** mit einem Antikörper gegen AES markierte Schnitte von Knochenmarkstanzen. Links normales Knochenmark (NBM = *normal bone marrow*), rechts Knochenmark von AML-Patienten. **B:** exemplarischer Ausschnitt je eines Normalbefundes (NBM) und einer AML, links in der Übersichtsvergrößerung, rechts im Detail. **C:** statistische Auswertung des Expressionsgrades von AES in den Biopsaten, eingeteilt in vier Gruppen: keine Expression (0), leichte Expression (I), mittelgradige Expression (II) und hohe Expression (III) (weiß = NBM, schwarz = AML)

Diese bisher beschriebenen Ergebnisse konnten im Wesentlichen durch *Tissue Micro Arrays* (Abbildung 3.16) einer größeren Anzahl an Knochenmarkproben von AML-Patienten bestätigt werden. Die *Tissue Micro Arrays* zeigen, dass *Amino-terminal Enhancer of Split* zwar auch in normalem Knochenmark nachgewiesen werden kann, allerdings ist die Expression deutlich schwächer ausgeprägt als in den AML-Proben. So ist in ca. 50% der Gewebeproben von normalem Knochenmark kein AES nachweisbar, eine starke Expression findet sich nur in weniger als 10% der Fälle. Bei Knochenmarkproben von AML-Patienten ist hingegen zu ca. 95% AES nachweisbar, in 80% der Fälle sogar eine mittel- oder hochgradige Expression.

3.3 Die Rolle von AES in Wachstum, Proliferation und Selbsterneuerung

3.3.1 Auswirkungen der Überexpression von AES in primären Mausknorpelmarkzellen

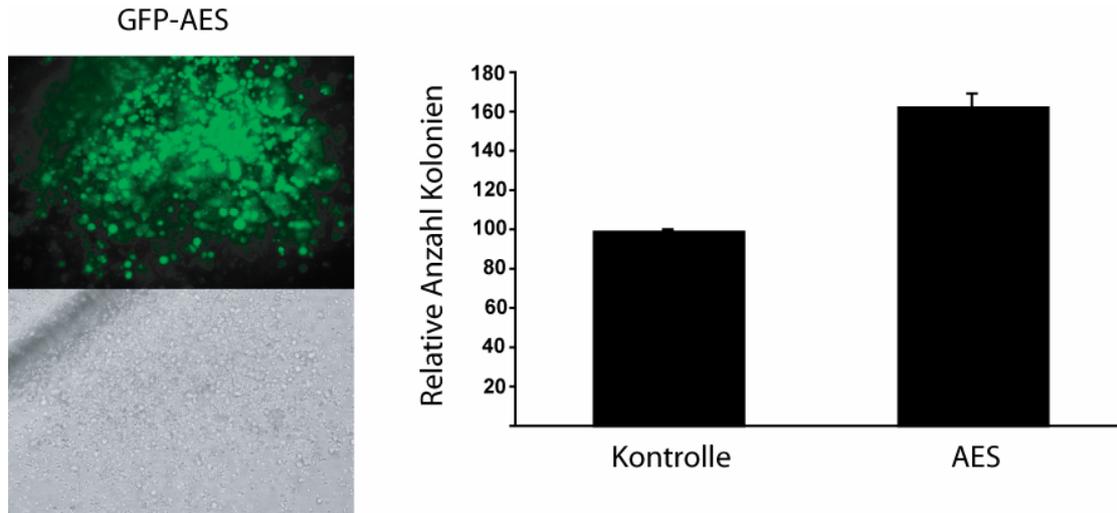


Abbildung 3.17 Auswirkungen der Überexpression von *Amino-terminal Enhancer of Split* auf primäre Mausknorpelmarkzellen. Murines Knochenmark wurde mit PMY und PMY-AES transduziert und in Methylcellulose ausgesät. Die Kolonienzahl wurde nach 7-9 Tagen bestimmt. Auf der linken Seite der Abbildung ist eine Kolonie von mit PMY-AES transduzierten primären Mausknorpelmarkszellen zu sehen. Unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigt sich, dass GFP exprimiert wird. Das Balkendiagramm gibt die relative Kolonienanzahl und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Ansätzen wieder ($p=0,0018$). Die Kolonienzahl der mit dem Leervektor transfizierten Zellen wurde = 100 gesetzt.

Zur weiteren Analyse des Einflusses von *Amino-terminal Enhancer of Split* auf Proliferation und Wachstum wurden Kolonie Assays mit primären Mausknorpelmarkzellen durchgeführt. Hierbei wurde das Wachstum von mit PMY-AES retroviral transduzierten primären Mausknorpelmarkszellen mit dem einer Kontrollgruppe (mit PMY transfizierte Zellen) verglichen. Der Erfolg der retroviralen Transduktion konnte anhand von co-transduziertem GFP mittels Fluoreszenzmikroskopie beurteilt werden.

Das Balkendiagramm in Abbildung 3.17 zeigt, dass die stabil mit AES transduzierten Zellen ungefähr 60% mehr Kolonien bilden als die Kontrollgruppe.

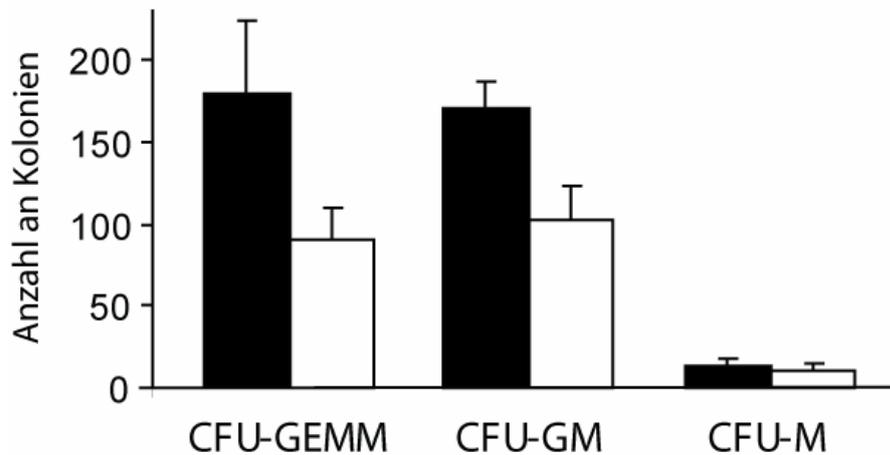


Abbildung 3.18 Die Rolle von *Amino-terminal Enhancer of Split* in der Zelldifferenzierung. Mit PMY-AES transduzierte primäre Mausknorpelmarkszellen (schwarze Balken), mit PMY als Leervektor transduzierte Zellen (weißer Balken). CFU-GEMM: unreife Zellen, CFU-GM: die Zellen dieser Kolonien können in Granulozyten oder Monozyten differenzieren, CFU-M: differenzierte, reife Zellen.

Die zuvor beschriebenen Kolonien wurden im weiteren Verlauf nach dem Reifegrad der Zellen differenziert. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe stellt sich heraus, dass *Amino-terminal Enhancer of Split* vor allem zum Wachstum von Kolonien unreifer Zellen führt (siehe Abb 3.18). Der größte Unterschied besteht in den Analysen in der Gruppe der CFU-GEMM (*Colony-forming unit* Granulozyten, Erythrozyten, Monozyten und Megakaryozyten, Zellen, die noch in alle myeloischen Reihen differenzieren können). Die mit AES transduzierten Zellen bilden doppelt so viele dieser unreifen Kolonien ($p = 0,002$).

Auch in der Gruppe CFU-GM besteht ein deutlicher Unterschied, die mit AES transduzierten Zellen bilden ungefähr 70% mehr Kolonien ($p = 0,049$). Beim Kolonienwachstum von bereits reiferen Zellen (CFU-M) findet sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,43$). Hier führt AES nicht zu einer deutlichen Proliferationszunahme.

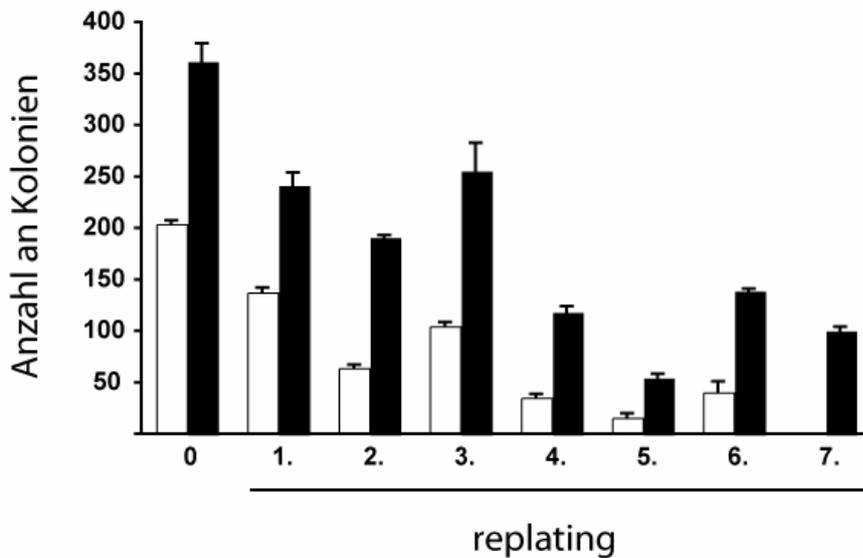


Abbildung 3.19 Der Einfluss von *Amino-terminal Enhancer of Split* auf die Selbsterneuerungsfähigkeit von primären Mausknorpelmarkszellen. Abgebildet sind sieben *replating*-Zyklen mit primären Mausknorpelmarkszellen. Weiß dargestellt ist die Kolonienanzahl der Kontrollgruppe (PMY), schwarz dargestellt sind die retroviral stabil mit AES transduzierten Mausknorpelmarkszellen (PMY-AES). Die Zellen wurden jeweils an Tag acht aus den Kolonien geerntet und erneut ausgesät. Da im siebten Zyklus keine Kontrollzellen mehr gewachsen sind, wurde kein weiteres *replating* durchgeführt. Gezeigt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Ansätzen und die zugehörige Standardabweichung.

Zur Untersuchung der Einwirkung von *Amino-terminal Enhancer of Split* auf die Fähigkeit der Selbsterneuerung von Zellen wurde ein *replating* der Kolonien durchgeführt (siehe Abb. 3.19). Bei der Kontrollgruppe nimmt die Kolonienanzahl von Runde zu Runde des erneuten *replatings* ab, ab der siebten Aussaat wachsen keine Kolonien mehr. Auch die Kolonienanzahl der stabil transduzierten Zellen nimmt von Durchgang zu Durchgang ab, es bestehen jedoch wesentliche Unterschiede. So werden durch die mit AES stabil transduzierten Zellen nach jeder Aussaat wesentlich mehr Kolonien gebildet als in der Kontrollgruppe. Dieser Unterschied nimmt proportional gesehen von Zyklus zu Zyklus weiter zu. Nach dem vierten Zyklus stellt sich bei der Anzahl der Kolonien der mit AES transduzierten Zellen eine Art Plateauphase ein. Die Kolonienanzahl nimmt nicht wesentlich weiter ab.

3.3.2 Auswirkungen der Herunterregulation von AES durch shRNA

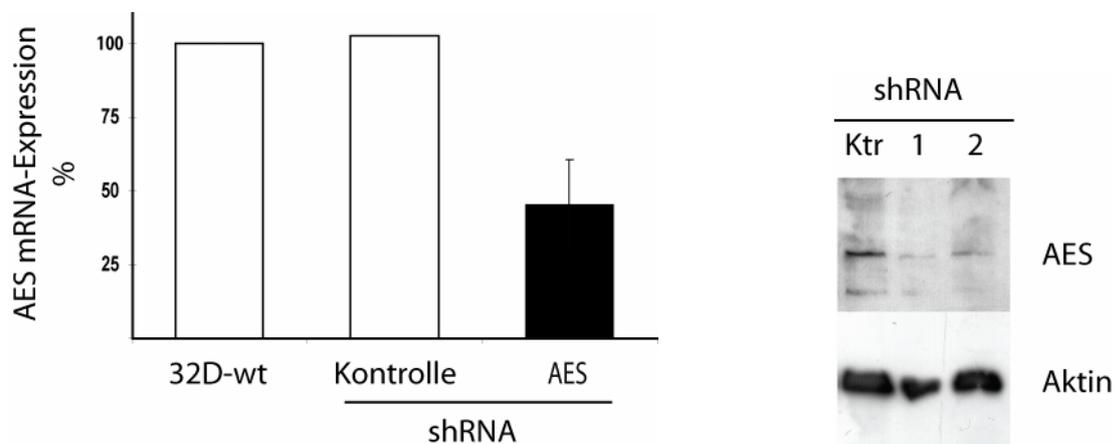


Abbildung 3.20 Nachweis der Wirksamkeit des shRNA-Konstruktes für *Amino-terminal Enhancer of Split*. Das Balkendiagramm auf der linken Seite zeigt die Ergebnisse einer Taqman-Analyse zur AES-mRNA Expression. Hierzu wurden die Expression in 32D-wt-Zellen als Bezugswert (= 100%, linker Balken) festgelegt. Eine Gruppe von 32D-Zellen wurde stabil mit einem *scrambled*-Konstrukt transfiziert (shRNA Kontrolle, weiß), eine weitere Gruppe wurde mit der shRNA für AES transfiziert (AES, schwarz). Dargestellt ist der Mittelwert aus vier Messungen und die zugehörige Standardabweichung ($p = 0,016$). Rechts zu sehen ist die Westernblot-Analyse zur Untersuchung der Translation. Als Kontrolle (Ktr) wurden auch hier Lysate der mit dem *scrambled*-Konstrukt transfizierten Zellen eingesetzt. Dazu im Vergleich zwei Versionen des shRNA-Konstruktes für AES (1,2).

Um die Wirkungen von *Amino-terminal Enhancer of Split* besser charakterisieren zu können, wurden mehrere shRNA-Expressionsvektoren für AES kloniert und in 32D-Zellen transfiziert. Hierdurch soll eine Herabregulation der AES-Expression erzielt werden. Zur Kontrolle der Wirkung wurde eine Zufalls-shRNA-Sequenz gleicher Länge ebenfalls in 32D-Zellen transfiziert. Beide Konstrukte wurden zudem mit nicht-transfizierten 32D-Zellen verglichen. Die Abbildung 3.20 zeigt, dass die Konzentration der AES-mRNA in den mit dem Kontrollkonstrukt transfizierten Zellen ungefähr so hoch ist wie in den 32D-wt-Zellen. Die AES-Expression in den Zellen mit shRNA gegen *Amino-terminal Enhancer of Split* ist demgegenüber jedoch um mehr als 50% reduziert. Noch deutlicher erkennbar ist die Reduktion auf Proteinebene. Beide AES-shRNA Konstrukte reduzieren die Expression von AES im Vergleich zum Kontrollkonstrukt somit auf mRNA und Protein-Ebene.

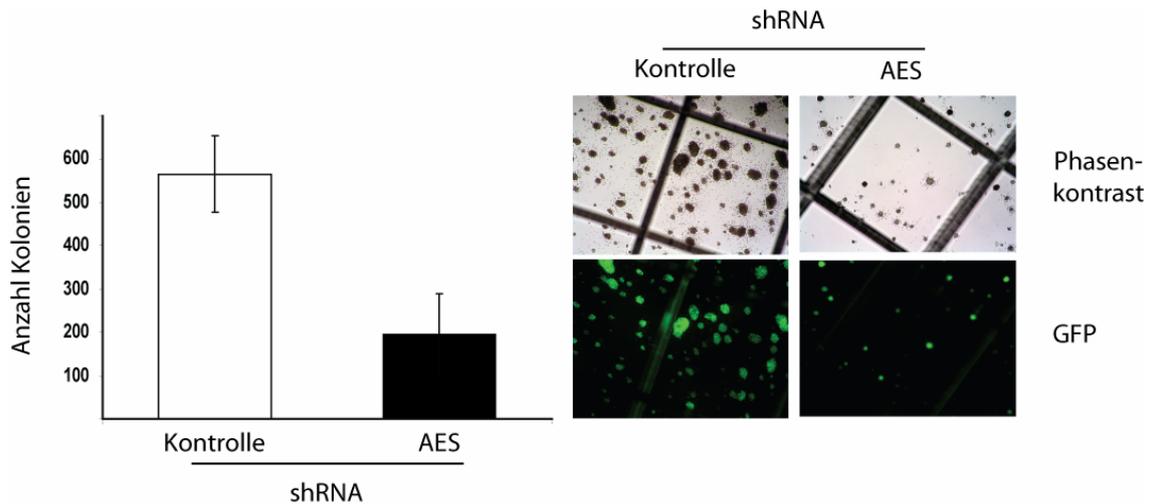


Abbildung 3.21 Auswirkung der Herunterregulation von *Amino-terminal Enhancer of Split* auf das Kolonienwachstum von 32D-Zellen. Das Balkendiagramm zeigt die Kolonienanzahl der mit der Zufalls-shRNA-Sequenz transfizierten 32D-Zellen (Kontrolle) im Vergleich zu den mit der shRNA für AES transfizierten 32D-Zellen (schwarz). Dargestellt ist der Mittelwert aus vier Experimenten sowie die zugehörige Standardabweichung. Die Photos zeigen die Kolonienmorphologie im Vergleich. Zudem zeigen die Fluoreszenzmikroskopiebilder, dass GFP exprimiert wird. Damit ist auch die Expression der shRNA nachgewiesen.

Nachdem nachgewiesen wurde, dass die shRNA-Konstrukte eine Herunterregulation von AES bewirken, wurden 32D-Zellen mit AES- und Kontroll-shRNA-Konstrukten stabil transfiziert. Diese Zellen wurden nun zur Analyse des Wachstumsverhaltens mittels Kolonie-Assays verwendet.

Erste Unterschiede zeigen sich dabei bereits in der Morphologie der Kolonien. So sind die Kolonien der mit AES-shRNA transfizierten Zellen wesentlich kleiner als die der Kontrollzellen. Die Quantifizierung der Kolonien ergab zudem, dass die mit der AES-shRNA transfizierten Zellen nur etwa 40% der Kolonienzahl der Kontrollgruppe bilden ($p = 0,004$) (siehe Abbildung 3.21).

4 Diskussion

4.1 Zyklin D1

Zyklin D1 ist ein wichtiger Regulator des Zellzyklus. Mit Aktivierung von cdk4 und cdk 6 leitet Zyklin D1 den Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus ein. Eine Dysregulation der Expression von Zyklin D1 kann die Vorgänge des Zellzyklus erheblich beeinflussen. So wird über die Aktivierung der cdk's via Zyklin D1 nicht nur die Progression des Zellzyklus durch Inhibition von pRb beeinflusst, ebenso ist der Komplex aus Zyklin D1 und cdk4 in der Lage, die Bildung von Zellzyklusinhibitoren zu unterbinden.

Es konnte gezeigt werden, dass Zyklin D1 auch Funktionen außerhalb der direkten Zellzykluskontrolle ausübt. So nimmt Zyklin D1 Einfluss auf die Aktivität einiger Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel STAT3 und DMP1 und beeinflusst auf diese Weise die Expression von potentiellen Onkogenen [26]. Des Weiteren ist bekannt, dass Zyklin D1 die Aktivität von C/EBP β beeinflussen kann und durch diese Interaktion zur Tumorentwicklung beitragen kann [60].

In einigen humanen Krebsarten ist eine Überexpression von Zyklin D1 bereits beschrieben, wobei dies in vielen Fällen durch chromosomale Alterationen hervorgerufen wird [40]. Im Fall von Mantelzell-Lymphomen liegt der aberranten Zyklin D1-Expression die chromosomale Translokation t(11;14) zugrunde.

Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass es durch die Fusionsproteine in der AML zu einer gesteigerten Aktivierung des wnt-Signalweges kommt. Diese Aktivierung führt zu einer Stabilisierung von β -catenin. In diesem Zustand bindet β -Catenin an zytosolische Transkriptionsfaktoren und führt auf diese Weise auch zur gesteigerten Transkription von Zyklin D1 [49; 96]. Zyklin D1 ist neben c-myc eines der Hauptzielgene von wnt.

Unsere Untersuchungen haben sich u.a. mit dem Einfluss von PML-RAR α auf die Expression von Zyklin D1 befasst. Unsere These besagt, dass PML-RAR α zu einer Hochregulation der Zyklin D1 Expression führt und dass diese Regulation maßgeblich auf transkriptioneller Ebene geschieht. Hierzu haben wir NB4-Zellen mit ATRA behandelt, um die Wirkung des Fusionproteins PML-RAR α aufzuheben. In meinen

Versuchen mit den NB4-Wildtypzellen konnte ich eine Herunterregulation der Zyklin D1 Transkription nach ATRA Gabe jedoch nicht nachweisen. Die Zyklin D1 Transkription nach 48-stündiger Behandlung mit ATRA war sogar etwas stärker ausgeprägt als nach 48-stündiger Behandlung mit Ethanol. Stattdessen ist eine starke Reduktion der Zyklin D1 Expression auf Proteinebene zu beobachten (siehe Abb. 3.2). Wie erwartet, ist bei Behandlung von NB4-R2 Zellen mit ATRA keine Herabregulation der Zyklin D1 Expression zu erzielen (siehe Abb 3.3). Abbildung 3.4 zeigt, dass es in NB4-ITD Zellen durch die 48-stündige Behandlung mit ATRA durchaus zu einer deutlichen Herabregulation der Zyklin D1 Expression auf transkriptioneller Ebene kommt. Ebenso führt diese Behandlung jedoch auch zu einer deutlichen Senkung der Zyklin D1 Translation.

Fang Yu *et al.* haben kürzlich publiziert, dass es durch eine ATRA-Behandlung zu einer vermehrten Expression von Apr3 (*apoptosis related protein 3*) in HL-60-Zellen kommt. Die Überexpression der membrangebunden Form von Apr3 führt zu einer deutlichen Reduktion der Zyklin D1 Expression auf mRNA- und Proteinebene und zu einem G1/S-Phase-Arrest [138]. Dies ist ein Effekt, der auch ohne das Vorliegen von PML-RAR α auftritt. Für NB4-Zellen wurde dieser Effekt im Rahmen der Arbeit nicht beschrieben. Für die Fusionsproteine in der AML konnte nachgewiesen werden, dass sie zu einer vermehrten Aktivität von MNK1 führen. Dies wiederum führt zur Phosphorylierung von eIF4E und induziert so die Translation von Zyklin D1 [98]. Auf diese Weise könnte erklärt werden, dass eine Inhibition von PML-RAR α durch ATRA auch zu einer niedrigeren Zyklin D1 Translation führen kann.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es nachzuweisen, dass Flt3-ITD an der Regulation der Zyklin D1 Expression beteiligt ist und dass maßgeblich die Translation von Zyklin D1 beeinflusst wird.

Im Rahmen der Experimente konnte nachgewiesen, dass NB4-Zellen, die eine ITD Mutation tragen, eine stärkere Expression von Zyklin D1 auf Proteinebene vorweisen (siehe Abb. 3.4). Für die mRNA-Expression konnte dies nicht nachgewiesen werden.

Des Weiteren habe ich NB4-ITD-Zellen mit PKC412, einem Tyrosinkinaseinhibitor behandelt. Durch diese Behandlung soll die Wirkung von Flt3-ITD und die Aktivierung der nachfolgenden Signalkaskaden unterbunden, bzw. minimiert werden. Es ist zu beobachten, dass es nach 48-stündiger Behandlung zu einer deutlichen Reduktion der

Zyklin D1 Expression gekommen ist. Besonders deutlich ist die Herabregulation auf Proteinebene zu erkennen. Diese Ergebnisse zeigen, dass Flt3-ITD eine Induktion von Zyklin D1 auf Translationsebene bewirkt. Diese Erkenntnisse stimmen mit den Forschungsergebnissen anderer Gruppen überein. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, konnte nachgewiesen werden, dass Flt3-ITD zu einer Aktivierung verschiedener Signalwege wie z.B. PI3K/AKT, STAT5 und RAS/MAPK führt. Über diese Wege wird eine Induktion der Zyklin D1 Translation vermittelt [27; 43; 56; 77; 125].

Den Einfluss von Flt3-ITD habe ich auch an 32D-Zellen untersucht. Hier habe ich nicht nur Zyklin D1 in der Westernblotanalyse nachgewiesen, sondern habe auch Flt3, AKT und eIF4E als einzelne Stationen des PI3K/AKT-Signalweges betrachtet.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Stimulation von Flt3-wt durch den natürlichen Liganden FL zu einer vermehrten Expression der untersuchten Proteine des PI3K/AKT Signalweges führt. Ebenso bewirkt die Aktivierung von Flt3 eine vermehrte Phosphorylierung, also Aktivierung von eIF4E und AKT. Dies mündet in einer vermehrten Expression von Zyklin D1. Die Behandlung der 32D-hFlt3-wt Zellen mit PKC412 zeigt hingegen keine Wirkung, es ist kein Absinken der Expression der untersuchten Proteine zu beobachten. Die Proteinexpression der Wildtypzellen, die mit FL stimuliert worden sind, ist genauso hoch wie die der Zellen mit Flt3-ITD.

Mit den Flt3-ITD Zellen verhält es sich anders. Durch Zugabe von FL ist keine Steigerung der Expression der untersuchten Proteine zu erkennen. Durch Gabe von PKC412 und somit Hemmung der Aktivität von Flt3-ITD kommt es jedoch zur deutlichen Reduktion der Translation und der Phosphorylierung.

Diese Ergebnisse sagen aus, dass die Zellen mit der Flt3-ITD-Mutation im Vergleich zu den Wildtypzellen eine gesteigerte Expression von eIF4E, AKT und Zyklin D1 vorweisen. ITD bewirkt eine konstitutionelle Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges. Aktiviertes AKT initiiert die Phosphorylierung von 4E-BP1. Hierdurch kommt es zur Loslösung des inhibierenden 4E-BP1 von eIF4E und somit zur Bildung des Translations-initiationskomplexes eIF4F und somit zur gesteigerten Translation von Zyklin D1 [6]. Weiterhin ist durch die Westernblotanalysen zu erkennen, dass Flt3-ITD durch Gabe von FL nicht weiter stimuliert werden kann. Es ist davon auszugehen, dass

die Rezeptortyrosinkinase durch Autophosphorylierung bereits konstitutiv aktiviert ist und dass daher eine weitere Stimulation folgenlos bleibt.

Die Gabe von PKC412 50nM führt in den 32D-Flt3-ITD-Zellen zu einer deutlichen Abnahme der Genexpression aller untersuchten Proteine. Dies bestätigt unsere These, da die Wirkung der ITD-Mutation und somit die Aktivierung der Signalwege durch Gabe von PKC412 gebremst wird. Diese deutliche Reduktion der Expression ist in den 32D-Flt3-wt-Zellen - wie bereits berichtet - nicht zu beobachten. PKC412 bewirkt nur bei Vorhandensein der ITD-Mutation eine deutliche Reduktion der Aktivität des Rezeptors, in dem es die Autophosphorylierung unterbindet und die Stimulation durch Flt3 so auf ein physiologisches Maß reduziert. So wurde auch von Odgerel *et al.* 2007 beschrieben, dass PKC412 nur bei leukämischen Zellen mit einer Mutation von Flt3 eine Wirkung zeigt [86].

Ein möglicher weiterer Mediator der Onkogenität von Flt3-ITD ist eIF4E. Die künstliche Überexpression von eIF4E allein kann zur malignen Transformation in Zelllinien und im Tiermodell führen [61; 109]. Indem die verstärkte Expression von eIF4E zu höheren Leveln von eIF4F führt, könnte eIF4E über die Förderung der Translation bestimmter mRNAs wie Zyklin D1, c-myc und VEGF an der malignen Transformation der Zelle beteiligt sein [71]. De Benedetti und Graff haben 2004 beschrieben, dass in vielen Tumoren erhöhte Level von eIF4E anzutreffen sind [21].

Der Einfluss von Flt3-ITD allein und in Kombination mit PML-RAR α auf die Transkription von Zyklin D1 in NB4-Zellen lässt sich anhand unserer Ergebnisse nicht eindeutig beurteilen. Es ist zu erkennen, dass Flt3-ITD positive NB4-Zellen eine höhere Zyklin D1 Expression auf mRNA- und Proteinebene aufweisen als normale NB4-Zellen. ITD-positive Zellen, die mit ATRA behandelt wurden, zeigen im Vergleich zu nativen NB4-Zellen eine leichtgradig verminderte mRNA-Expression von Zyklin D1. Nur mit DMSO behandelte NB4-ITD Zellen zeigen deutlich niedrigere Zyklin D1 mRNA-Level als normale NB4 Zellen. Auf Proteinebene ist durch Behandlung mit ATRA bei beiden Zellgruppen ein Reduktion der Expression zu erzielen, mit PKC erwartungsgemäß nur bei den ITD-Zellen.

In Zusammenschau deutet dies darauf hin, dass ein Zusammenwirken der beiden Mutationen bezüglich der Zyklin D1 Regulation existiert. Da die Regulation von Zyklin D1 durch das Fusionsprotein PML-RAR α und durch Flt3-ITD wie bereits dargestellt

nicht maßgeblich über dieselben Signalwege vermittelt wird, sind hier synergistische Effekte anzunehmen.

Mit diesen Untersuchungen ist nachgewiesen worden, dass die Zyklin D1 Expression durch Flt3-ITD gesteigert wird und dass dies, zumindest teilweise, über den PI3K/AKT-Signalweg vermittelt wird. Die Beeinflussung der Expression von Zyklin D1 durch ITD geschieht dabei auf Proteinebene. Die Regulation der Zyklin D1 Expression durch das Fusionsprotein PML-RAR α erfolgt durch Induktion der Transkription. Ein Zusammenwirken der Mutationsklassen bezüglich der Induktion von Zyklin D1 ist nicht eindeutig nachgewiesen worden. Aufgrund der erläuterten Mechanismen ist es jedoch möglich, dass eine solche Kooperation existiert. Insgesamt ist festzuhalten, dass die hier untersuchten Mutationen zu gesteigerter Expression von Zyklin D1 führen.

Die Rolle von Zyklin D1 in der AML bleibt weiterhin nicht vollständig geklärt. Im Gegensatz zu anderen malignen Erkrankungen ist eine Überexpression von Zyklin D1 in Proben von AML-Patienten bisher nicht beschrieben worden. Dass Zyklin D1 onkogenes Potential besitzt, ist unbestritten. Nicht unbestritten ist jedoch die Theorie, dass die onkogene Wirkung nur durch eine Überexpression vermittelt wird. Von A.B. Gladden *et al.* wurde postuliert, dass nicht die reine Überexpression, sondern auch die Lokalisierung des Proteins im Nukleus für die onkogene Aktivität ausschlaggebend sei [33]. Wie bereits beschrieben, transloziert der aktivierte Komplex aus Zyklin D1 und CDK4 in den Zellkern, wo durch die initiale Phosphorylierung von Rb die Zellzyklusprogression in Gang gesetzt wird. Damit Zyklin D1 wieder aus dem Zellkern ausgeschleust und abgebaut werden kann, bedarf es einer Poly-Ubiquitinierung. Dies wird durch eine Phosphorylierung des c-terminalen Threonins durch GSK-3b (*glycogen synthase kinase 3 beta*) initiiert [22].

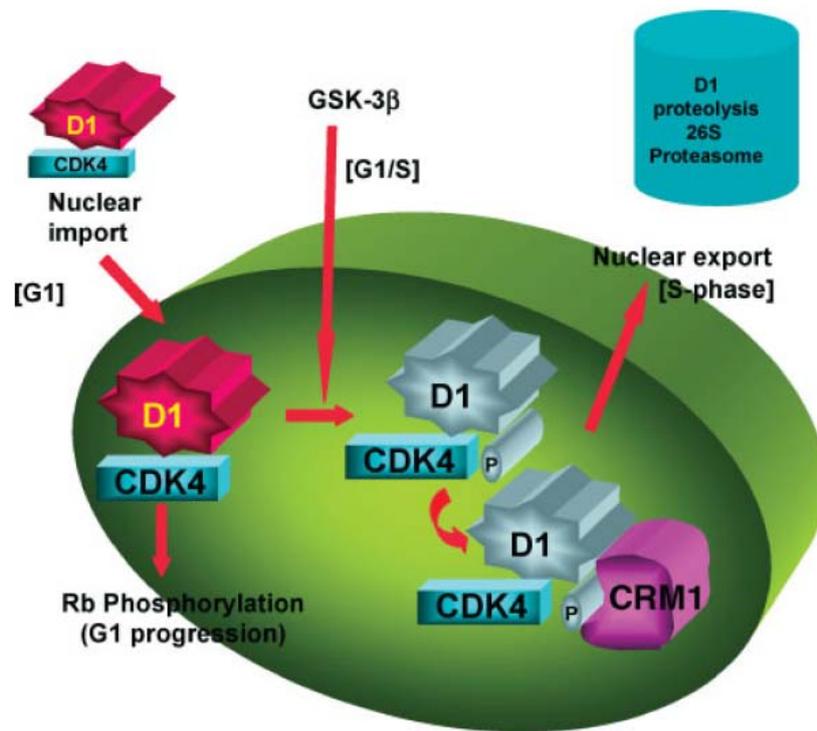


Abbildung 4.1: Regulation der Lokalisation von Zyklin D1: Während der G1-Phase tritt der Komplex aus Zyklin D1 und CDK4 in den Nukleus über und phosphoryliert Rb und leitet so den Übergang zur S-Phase ein. GSK-3b gelangt während der Übertritts in die S-Phase in den Zellkern und phosphoryliert Zyklin D1 an Thr-286, der erste Schritt der Ausschleusung aus dem Zellkern, Ubiquitinierung und Proteolyse von Zyklin D1 [22].

In der letzten Zeit wurden mehrere Mechanismen entdeckt, die einer Ausschleusung von Zyklin D1 aus dem Zellkern entgegenwirken. Alt *et al.* haben eine Mutante von Zyklin D1 beschrieben (cyclin D1-T286A), die nicht phosphoryliert werden kann und dauerhaft im Zellkern verbleibt. Es konnte gezeigt werden, dass diese Mutante unabhängig von anderen Onkogenen eine Transformation von Zellen *in vitro* bewirkt [3]. Zwei andere Arbeitsgruppen haben eine neue Isoform von Zyklin D1 beschrieben, die durch alternatives Spleißen entsteht. Dieser Isoform, Zyklin D1-b, fehlt sowohl die Bindungsstelle für GSK-3b, als auch die Bindungsstelle für Crm1, welches normalerweise für den nukleären Export von Zyklin D1 verantwortlich ist. Dies resultiert in einem dauerhaften Verbleib von Zyklin D1 im Zellkern, beeinflusst jedoch nicht dessen Funktion. Die Expression von Zyklin D1-b konnte interessanter Weise nur in malignem Gewebe nachgewiesen werden [69; 117].

Auch der bereits erwähnte PI3K/AKT-Signalweg ist in die Regulation der Lokalisation von Zyklin D1 involviert. Eine übermäßige Aktivität von AKT, - vermittelt durch Überexpression oder durch Inaktivierung von PTEN, einem direkten Gegenspieler von AKT -, mündet in einer verminderten Expression von GSK-3b [9]. All dies zeigt, dass Zyklin D1 eine wichtige Rolle in der Entstehung von Krebs zuzuschreiben ist. Welche Wirkungen von Zyklin D1 entscheidend für die maligne Transformation von Zellen sind, oder ob eine Überexpression von Zyklin D1 zur malignen Transformation vorliegen muss, wird weiterhin kontrovers diskutiert und ist gegebenenfalls auch vom jeweiligen Zelltypus abhängig.

Diese Untersuchungen haben gezeigt, wie sich in der AML dominierende Mutationen auf Zyklin D1, einem wichtigen Regulator des Zellzyklus, auswirken. Möglicherweise trägt eine Dysregulation von Zyklin D1 zur Pathogenese der AML bei.

4.2 *Amino-terminal Enhancer of Split*

Bereits seit einigen Jahren weiß man, dass eine Dysregulation des wnt-Signalweges eine große Rolle bei der Entstehung vieler Karzinome spielt [94]. In jüngerer Vergangenheit hat sich gezeigt, dass dieser Signalweg auch in die Regulation von Stammzellfunktionen involviert ist und seine Dysregulation daher zur Leukämogenese beitragen könnte [53; 111]. Neuere Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass zumindest ein Teil der leukämogenen Wirkung der Fusionsproteine in der AML über eine Aktivierung des wnt-Signalweges vermittelt wird. Ein wichtiger Schritt ist dabei die Überexpression von Plakoglobin. Die Suche nach weiteren Zielgenen der Fusionsproteine AML1-ETO, PML-RAR α und PLZF-RAR α mittels *Microarray* ergab, dass auch die Expression von *Amino-terminal Enhancer of Split* massiv induziert wird. Der Mechanismus, über den AES eine Aktivierung der Transkription der TCF/LEF (*lymphocyte enhancing factor*)-Zielgene bewirkt, wurde bereits unter Punkt 1.6.2 beschrieben. Die Aktivierung durch *Amino-terminal Enhancer of Split* ist dabei unabhängig von der Wirkung von β -catenin und Plakoglobin. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen haben zudem ergeben, dass *Amino-terminal Enhancer of Split* auch mit anderen Transkriptionsfaktoren (z.B. Runx2) interagiert [129].

Die Induktion von *Amino-terminal Enhancer of Split* durch die drei genannten Fusionsproteine konnte auf Transkriptions- und Translationsebene nachgewiesen werden. Wie unter Punkt 1.4.1 beschrieben, bewirkt AML1-ETO eine Repression der Genexpression durch Rekrutierung von Histondeacetylasen. Nach Induktion der AML1-ETO Expression durch Zn^{+} haben wir die HDAC-Funktion durch Zugabe von TSA geblockt. Wie erwartet konnte gegenüber der Kontrolle keine Induktion von *Amino-terminal Enhancer of Split* durch das Fusionsprotein mehr festgestellt werden (siehe Abb 3.9). Ebenso zeigte sich nach Behandlung von PML-RAR α exprimierenden Zellen mit ATRA eine zeitabhängige Reduktion der AES-Expression auf mRNA-Ebene (siehe Abb 3.10).

Die Fusionsproteine, deren Funktion als transkriptionelle Repressoren in der AML bekannt ist, führen über die Induktion von *Amino-terminal Enhancer of Split* zu einer vermehrten Expression von Wnt-Zielgenen. Ob diese Induktion ein indirekter Effekt ist, oder ob sie durch Interaktion der Fusionsproteine mit anderen Transkriptionsfaktoren hervorgerufen wird, ist noch unklar. Eine solche Protein-Protein-Interaktion ist bereits für AML1-ETO mit z.B. LEF-1, C/EBP α und PU-1 beschrieben worden [79; 126; 132]. Denkbar ist jedoch auch, dass die Induktion direkt durch das Fusionsprotein hervorgerufen wird. So weiß man bereits von einigen Genen (z.B. M-CSF oder Bcl-2), dass sie direkt durch AML1-ETO aktiviert werden [57].

Als nächstes haben wir untersucht, in welchen Geweben und Zelllinien *Amino-terminal Enhancer of Split* exprimiert wird. Ein besonders hohes Expressionsniveau zeigte sich im Hoden, ein Gewebe mit einer hohen physiologischen Proliferationsrate. Dies passt zur Erkenntnis, dass *Amino-terminal Enhancer of Split* den wnt-Signalweg aktiviert. Des Weiteren konnte eine hohe Expression in Lebergewebe nachgewiesen werden.

Hohe AES-Level finden sich auch in verschiedenen immortalisierten Zelllinien. Dies überrascht nicht, da man davon ausgeht, dass die Fähigkeit zur Selbsterneuerung von hämatopoetischen Zellen mit dem wnt-Signalweg im Zusammenhang steht [82; 103]. Es ist denkbar, dass die Aktivierung der wnt-Signalkaskade an der Immortalisierung der Zellen beteiligt ist. Auch in 32D-Zellen zeigte sich eine hohe Expression von *Amino-terminal Enhancer of Split*. Dabei ist die Expression von *Amino-terminal Enhancer of Split* in 32D-hFlt3-wt und -ITD-Zellen nicht vom Mutationsstatus der Rezeptortyrosinkinase Flt3 abhängig. Die Expression konnte weder durch Zugabe von

IL-3 noch durch Zugabe von FL gesteigert werden. Es scheint, dass *Amino-terminal Enhancer of Split* in Zellen, in denen der Wnt-Signalweg bereits aktiviert ist (z.B. durch Flt3-ITD) nicht noch weiter induziert werden kann. All dies ist konform mit der Annahme, dass undifferenzierte, c-kit-positive hämatopoetische Stammzellen hohe AES-mRNA Level zeigen und bereits einer Zellreihe zugehörige Zellen hingegen nur eine niedrige AES-Expression vorweisen. Die Expression von *Amino-terminal Enhancer of Split* scheint dabei auf die Zellen beschränkt zu sein, die sich durch eine Zugehörigkeit zur myeloischen und leukozytischen Reihe auszeichnen, z.B. GR1- und CD45-positive Zellen.

Ausgehend von der Vorstellung, dass *Amino-terminal Enhancer of Split* an der Leukämogenese beteiligt ist, wurde die Expression von AES im Knochenmark von AML-Patienten mittels Westernblot-Analyse und *Tissue Micro Array* untersucht. Wie in Abb. 3.15 zu sehen ist, scheint *Amino-terminal Enhancer of Split* im Knochenmark von Gesunden nicht exprimiert zu werden, oder zumindest nicht in dem Maße, dass es mittels Westernblot nachgewiesen werden konnte. Der Grad der AES-Expression scheint hierbei nicht durch Flt3-ITD beeinflusst zu werden.

Die *Tissue Micro Arrays* zeigen, dass die Expression von AES im Patientenknorpel unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Dabei wurde die AES-Expression in Knochenmarkspalten von 143 AML-Patienten analysiert. Hierbei zeigten sich hohe und sehr hohe Expressions-Level in ca. 80% der Patientenproben und ein signifikanter Unterschied zur Expression in gesundem Knochenmark (n = 40). Lediglich in 50% dieser Proben zeigte sich eine schwache AES-Expression (siehe Abbildung 3.16). Auswertungen in der Vergangenheit haben ergeben, dass Plakoglobin in den „unreiferen“ FAB-Klassen (M0-M3) signifikant stärker exprimiert wird als in den Klassen M4-M6 [79]. Das lässt vermuten, dass dies auch für die AES-Expression der Fall sein könnte.

Zur weiteren Analyse der Wirkung einer AES-Expression wurden primäre Mausknorpelzellen stabil mit *Amino-terminal Enhancer of Split* transduziert. Wie bereits berichtet, kommt es in unsterblichen Zellen, die eine hohe AES-Expression vorweisen durch weitere Stimulation nicht zu einer gesteigerten AES-Expression. Weitere Untersuchungen, die in dieser Arbeit nicht dargestellt sind, haben ergeben, dass mit *Amino-terminal Enhancer of Split* stabil transduzierte 32D-Zellen kein gesteigertes

Wachstum im *Colony Assay* zeigen. Dies gilt jedoch nicht für primäre Mausknorpelmarkzellen. Die Überexpression von *Amino-terminal Enhancer of Split* führt hier zu einer Zunahme der Kolonienzahl um ca. 60%. Die Ergebnisse zeigen, dass eine AES-Überexpression vor allem in unreifen Zellen (CFU-GEMM) zu einer gesteigerten Proliferation führt, beziehungsweise dass der Proliferationsvorteil mit steigendem Differenzierungsgrad der Zelle abnimmt. Zudem führt die Überexpression von *Amino-terminal Enhancer of Split* in primären Mausknorpelmarkzellen zu einer gesteigerten Selbsterneuerungsfähigkeit (siehe Abb.3.18 und 3.19). Diese Ergebnisse stimmen mit den Erkenntnissen überein, dass AES-Expression ein Merkmal von Zellen mit hohem Selbsterneuerungspotential ist. So haben Sekkai *et al.* nachgewiesen, dass embryonale Stammzellen, die durch Zugabe von LIF (*leukemia inhibitor factor*) an der Differenzierung gehindert werden eine hohe AES-Expression zeigen [113]. Wurde die Differenzierung der embryonalen Stammzellen durch 48-stündigen Entzug von LIF induziert, sanken die AES-Level. Überexpression von AES führt zu gesteigerter Proliferation und erhöhter Selbsterneuerungsfähigkeit, beides Eigenschaften von malignen Zellen, die über eine Induktion von Wnt-Zielgenen vermittelt werden [53; 71; 82; 103; 111; 134].

Ergänzend zur Überexpression wurde zur weiteren Charakterisierung der AES-Funktion mittels RNAi-Ansatz eine Herunterregulation von *Amino-terminal Enhancer of Split* bewirkt. Hierzu wurden 32D-Zellen, die *Amino-terminal Enhancer of Split* in hohem Maße exprimieren, mit einem shRNA-Vektor transfiziert. Im Vergleich zur Kontrolle zeigten die 32D-Zellen mit herunterregulierter AES-Expression ein massiv vermindertes Kolonienwachstum. Zudem bildeten diese Zellen wesentlich kleinere Kolonien als die Kontrollzellgruppe. Diese Ergebnisse bestärken die Erkenntnisse, dass die AES-Expression mit einer gesteigerten Proliferation verknüpft ist.

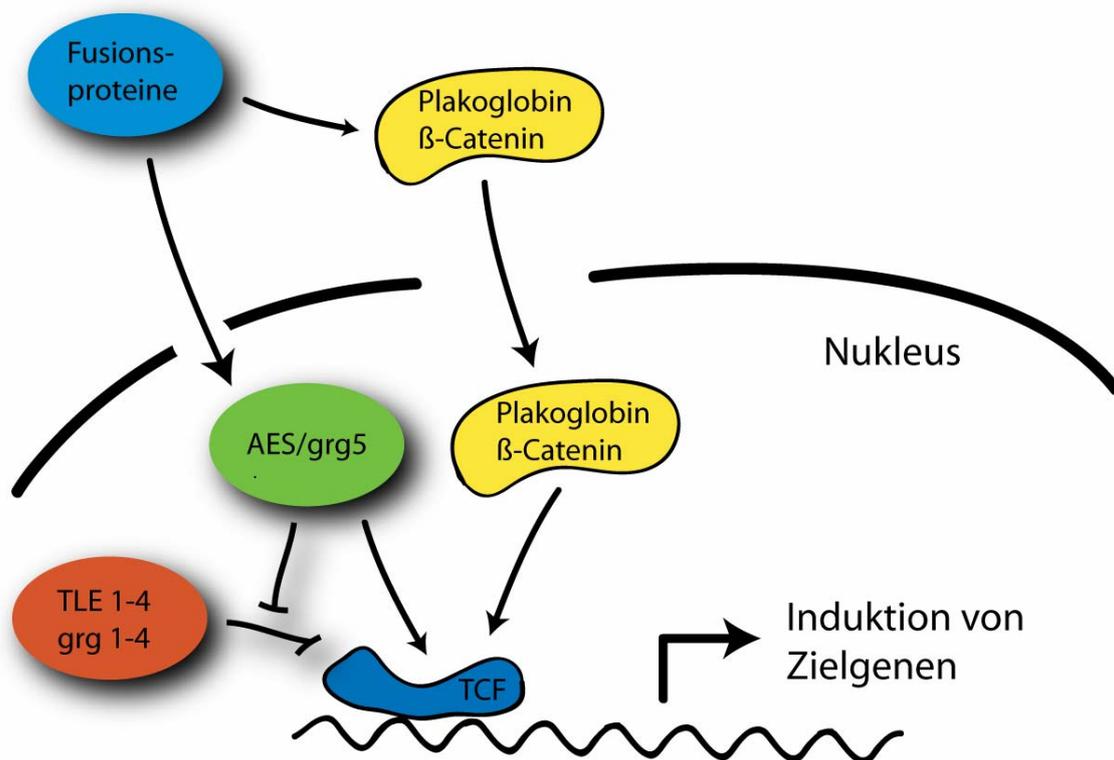


Abbildung 4.2 Induktion von Zielgenen durch die Fusionsproteine in der AML. Die Abbildung zeigt ein Modell, welches Kooperation verschiedener Mechanismen beinhaltet.

Wang *et al.* haben gezeigt, dass eine fehlende Grg5-Expression nicht letal in der Maus ist, jedoch zu einer transienten Wachstumsstörung führt. Die Grg5-Knockout-Mäuse zeigten ein gestörtes Wachstum der langen Röhrenknochen, die Zahl der proliferierenden Chondrozyten war im Schnitt um 25% reduziert [128].

Mit *Amino-terminal Enhancer of Split* konnte ein neues Zielgen der Fusionsproteine in der AML identifiziert werden. Die durch die Fusionsproteine induzierte Überexpression von *Amino-terminal Enhancer of Split* führt über die Aufhebung der durch TLE1-4 vermittelten Repression der Transkription zu einer gesteigerten Expression von TCF/LEF Zielgenen (siehe Abbildung 4.2). Die Aktivierung der Transkription über diesen Mechanismus ist nicht von der Aktivierung des Wnt-Signalweges abhängig. Ergänzend kann die Transkription durch Bindung von Plakoglobin, ebenso ein Zielgen der Fusionsproteine, weiter verstärkt werden. Die Überexpression der Wnt-Zielgene führt zu verstärkter Proliferation und erhöhter Selbsterneuerungsfähigkeit in primär nicht unsterblichen Zellen, eine Aktivierung des Wnt-Signalweges ist mit dem Prozess

der Immortalisierung, bzw. der Aufrechterhaltung der Pluripotenz in hämatopoetischen Stammzellen verknüpft [53; 82; 103; 111].

Über diese Mechanismen kann eine Überexpression von *Amino-terminal Enhancer of Split* an der Leukämogenese beteiligt sein. Eine alleinige Überexpression von *Amino-terminal Enhancer of Split* ruft jedoch keine Leukämie hervor wie Transplantationsversuche aus unserer Arbeitsgruppe ergaben. Dies passt wiederum zum *2-hit*-Modell der Leukämogenese und bestätigt die Erkenntnis, dass das Vorhandensein von Fusionsproteinen allein keine AML verursacht.

Dass *Amino-terminal Enhancer of Split* auch in AML-Zellen ohne balancierte Translokation auftritt, gibt einen Hinweis darauf, dass die Regulation der AES-Expression durch die Fusionsproteine lediglich ein Baustein zum Verständnis der AES-Funktion ist. Es müssen weitere Mechanismen existieren, die in die Regulation der Wnt-Zielgene durch *Amino-terminal Enhancer of Split* involviert sind. So zeigten Hasson *et al.*, dass Grouchos/TLEs zwei MAPK-Konsensus-Sequenzen enthalten welche durch den EGFR-Signalweg via MAPK *in vitro* phosphoryliert werden. Sekkai *et al.* haben herausgefunden, dass STAT3 direkt an den AES-Promoter bindet und so die Transkription induziert. So ist AES ein wichtiger Knotenpunkt im *crossstalk* zwischen STAT3 und dem Wnt-Signalweg. All dies sind Aspekte der möglichen Regulation von *Amino-terminal Enhancer of Split*, die jedoch noch weiterer Untersuchung bedürfen.

Die hier dargestellten Untersuchungen haben ergeben, dass *Amino-terminal Enhancer of Split* ein wichtiges Effektorprotein des Wnt-Signalweges in der AML darstellt und auf diese Weise an der Leukämogenese beteiligt sein könnte. Somit könnte sich *Amino-terminal Enhancer of Split* im Rahmen von weiteren Untersuchungen als interessantes Ziel für neuartige therapeutische Ansätze in der AML darstellen.

4.3 Zyklin D1 und AES: Effektoren in der Pathogenese der AML

Durch die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Experimente konnte gezeigt werden, dass Zyklin D1 und *Amino-terminal Enhancer of Split* eine wichtige Rolle in der Pathogenese der AML spielen können.

Eine Überexpression von Zyklin D1, wie sie bereits für viele humane Tumore nachgewiesen wurde, führt zu einer gesteigerten Proliferation der Zelle. Wie in dieser

Arbeit gezeigt wird, kommt es durch die Überexpression von AES ebenfalls zu einer gesteigerten Proliferation. Eine Hemmung der AES-Expression führt hingegen zu verminderter Kolonienbildung.

AES und Zyklin D1 sind wichtige Protagonisten des wnt-Signalweges. AES bewirkt als ein Mediator dieses Weges eine De-Repression der Transkription von wnt-Zielgenen. Zyklin D1 wiederum ist eins der wichtigsten Zielgene diese Signalweges. Auf diese Weise sind beide Proteine in die Vermittlung von Proliferation, Stammzellfunktion und Selbsterneuerungsfähigkeit eingebunden.

Die Experimente dieser Arbeit und andere Vorarbeiten haben ergeben, dass genetische Veränderungen in der AML die Expression der beiden Proteine beeinflussen. So konnte gezeigt werden, dass sowohl Zyklin D1 als auch AES durch die Fusionsproteine in der AML vermehrt exprimiert werden.

All dies deutet darauf hin, dass die Regulation dieser beiden Effektoren in der AML gestört ist. AES und Zyklin D1 sind jedoch für die physiologischen Prozesse einer Zelle wie Proliferation, Selbsterneuerungsfähigkeit und Überleben essentiell. Es ist daher anzunehmen, dass eine Dysregulation von Zyklin D1 und AES an der malignen Transformation von Zellen beteiligt ist. Beide Proteine stellen somit ein interessantes Ziel weiterer wissenschaftlicher Forschung dar.

5 Literaturverzeichnis

- 1 (1998) A systematic collaborative overview of randomized trials comparing idarubicin with daunorubicin (or other anthracyclines) as induction therapy for acute myeloid leukaemia. AML Collaborative Group. Br J Haematol **103**:S. 100-9.
- 2 Abu-Duhier, F. M., Goodeve, A. C., et al. (2000) FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukaemia define a high-risk group. Br J Haematol **111**:S. 190-5.
- 3 Alt, J. R., Cleveland, J. L., et al. (2000) Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation. Genes Dev **14**:S. 3102-14.
- 4 Aronson, B. D., Fisher, A. L., et al. (1997) Groucho-dependent and -independent repression activities of Runt domain proteins. Mol Cell Biol **17**:S. 5581-7.
- 5 Austin, T. W., Solar, G. P., et al. (1997) A role for the Wnt gene family in hematopoiesis: expansion of multilineage progenitor cells. Blood **89**:S. 3624-35.
- 6 Averous, J., Fonseca, B. D., et al. (2008) Regulation of cyclin D1 expression by mTORC1 signaling requires eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1. Oncogene **27**:S. 1106-13.
- 7 Beslu, N., LaRose, J., et al. (1996) Phosphatidylinositol-3' kinase is not required for mitogenesis or internalization of the Flt3/Flk2 receptor tyrosine kinase. J Biol Chem **271**:S. 20075-81.
- 8 Birg, F., Courcoul, M., et al. (1992) Expression of the FMS/KIT-like gene FLT3 in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages. Blood **80**:S. 2584-93.
- 9 Bjornsti, M. A. und Houghton, P. J. (2004) Lost in translation: dysregulation of cap-dependent translation and cancer. Cancer Cell **5**:S. 519-23.
- 10 Blume-Jensen, P. und Hunter, T. (2001) Oncogenic kinase signalling. Nature **411**:S. 355-65.
- 11 Brantjes, H., Barker, N., et al. (2002) TCF: Lady Justice casting the final verdict on the outcome of Wnt signalling. Biol Chem **383**:S. 255-61.
- 12 Brantjes, H., Roose, J., et al. (2001) All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors. Nucleic Acids Res **29**:S. 1410-9.
- 13 Britos-Bray, M. und Friedman, A. D. (1997) Core binding factor cannot synergistically activate the myeloperoxidase proximal enhancer in immature myeloid cells without c-Myb. Mol Cell Biol **17**:S. 5127-35.
- 14 Buchner, T., Hiddemann, W., et al. (1999) Double induction strategy for acute myeloid leukemia: the effect of high-dose cytarabine with mitoxantrone instead of standard-dose cytarabine with daunorubicin and 6-thioguanine: a randomized trial by the German AML Cooperative Group. Blood **93**:S. 4116-24.
- 15 Burel, S. A., Harakawa, N., et al. (2001) Dichotomy of AML1-ETO functions: growth arrest versus block of differentiation. Mol Cell Biol **21**:S. 5577-90.
- 16 Burnett, A. K., Goldstone, A. H., et al. (1998) Randomised comparison of addition of autologous bone-marrow transplantation to intensive chemotherapy for acute myeloid leukaemia in first remission: results of MRC AML 10 trial. UK Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. Lancet **351**:S. 700-8.

- 17 Carow, C. E., Levenstein, M., et al. (1996) Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias. Blood **87**:S. 1089-96.
- 18 Cassileth, P. A., Harrington, D. P., et al. (1998) Chemotherapy compared with autologous or allogeneic bone marrow transplantation in the management of acute myeloid leukemia in first remission. N Engl J Med **339**:S. 1649-56.
- 19 Clarke, C. A. und Glaser, S. L. (2000) Acute myeloid leukemia. N Engl J Med **342**:S. 358-9.
- 20 Dayyani, F., Wang, J., et al. (2008) Loss of TLE1 and TLE4 from the del(9q) commonly deleted region in AML cooperates with AML1-ETO to affect myeloid cell proliferation and survival. Blood **111**:S. 4338-47.
- 21 De Benedetti, A. und Graff, J. R. (2004) eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. Oncogene **23**:S. 3189-99.
- 22 Diehl, J. A., Cheng, M., et al. (1998) Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. Genes Dev **12**:S. 3499-511.
- 23 Downing, J. R. (1999) The AML1-ETO chimaeric transcription factor in acute myeloid leukaemia: biology and clinical significance. Br J Haematol **106**:S. 296-308.
- 24 Downing, J. R. (2001) AML1/CBFbeta transcription complex: its role in normal hematopoiesis and leukemia. Leukemia **15**:S. 664-5.
- 25 Drexler, H. G. (1996) Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells. Leukemia **10**:S. 588-99.
- 26 Ewen, M. E. und Lamb, J. (2004) The activities of cyclin D1 that drive tumorigenesis. Trends Mol Med **10**:S. 158-62.
- 27 Fenski, R., Flesch, K., et al. (2000) Constitutive activation of FLT3 in acute myeloid leukaemia and its consequences for growth of 32D cells. Br J Haematol **108**:S. 322-30.
- 28 Frank, D. A. (2007) STAT3 as a central mediator of neoplastic cellular transformation. Cancer Lett **251**:S. 199-210.
- 29 Frank, R., Zhang, J., et al. (1995) The AML1/ETO fusion protein blocks transactivation of the GM-CSF promoter by AML1B. Oncogene **11**:S. 2667-74.
- 30 Frohling, S., Schlenk, R. F., et al. (2002) Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. Blood **100**:S. 4372-80.
- 31 Gelmetti, V., Zhang, J., et al. (1998) Aberrant recruitment of the nuclear receptor corepressor-histone deacetylase complex by the acute myeloid leukemia fusion partner ETO. Mol Cell Biol **18**:S. 7185-91.
- 32 Gilliland, D. G. und Griffin, J. D. (2002) The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. Blood **100**:S. 1532-42.
- 33 Gladden, A. B. und Diehl, J. A. (2005) Location, location, location: the role of cyclin D1 nuclear localization in cancer. J Cell Biochem **96**:S. 906-13.
- 34 Gollnick, H. (2003) Current concepts of the pathogenesis of acne: implications for drug treatment. Drugs **63**:S. 1579-96.
- 35 Gollnick, H. P. und Krauthaim, A. (2003) Topical treatment in acne: current status and future aspects. Dermatology **206**:S. 29-36.
- 36 Griffith, J., Black, J., et al. (2004) The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. Mol Cell **13**:S. 169-78.

- 37 Grignani, F., De Matteis, S., et al. (1998) Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. Nature **391**:S. 815-8.
- 38 Grundler, R., Miething, C., et al. (2005) FLT3-ITD and tyrosine kinase domain mutants induce 2 distinct phenotypes in a murine bone marrow transplantation model. Blood **105**:S. 4792-9.
- 39 Grunstein, M. (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. Nature **389**:S. 349-52.
- 40 Hall, M. und Peters, G. (1996) Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. Adv Cancer Res **68**:S. 67-108.
- 41 Han, E. K., Ng, S. C., et al. (1999) Roles of cyclin D1 and related genes in growth inhibition, senescence and apoptosis. Apoptosis **4**:S. 213-9.
- 42 Harousseau, J. L., Cahn, J. Y., et al. (1997) Comparison of autologous bone marrow transplantation and intensive chemotherapy as postremission therapy in adult acute myeloid leukemia. The Groupe Ouest Est Leucemies Aigues Myeloblastiques (GOELAM). Blood **90**:S. 2978-86.
- 43 Hayakawa, F., Towatari, M., et al. (2000) Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. Oncogene **19**:S. 624-31.
- 44 He, L. Z., Guidez, F., et al. (1998) Distinct interactions of PML-RARalpha and PLZF-RARalpha with co-repressors determine differential responses to RA in APL. Nat Genet **18**:S. 126-35.
- 45 Herrera, R. E., Sah, V. P., et al. (1996) Altered cell cycle kinetics, gene expression, and G1 restriction point regulation in Rb-deficient fibroblasts. Mol Cell Biol **16**:S. 2402-7.
- 46 Imai, Y., Kurokawa, M., et al. (1998) TLE, the human homolog of groucho, interacts with AML1 and acts as a repressor of AML1-induced transactivation. Biochem Biophys Res Commun **252**:S. 582-9.
- 47 Jares, P., Rey, M. J., et al. (1997) Cyclin D1 and retinoblastoma gene expression in human breast carcinoma: correlation with tumour proliferation and oestrogen receptor status. J Pathol **182**:S. 160-6.
- 48 Kainz, B., Heintel, D., et al. (2002) Variable prognostic value of FLT3 internal tandem duplications in patients with de novo AML and a normal karyotype, t(15;17), t(8;21) or inv(16). Hematol J **3**:S. 283-9.
- 49 Karim, R., Tse, G., et al. (2004) The significance of the Wnt pathway in the pathology of human cancers. Pathology **36**:S. 120-8.
- 50 Keating, S., de Witte, T., et al. (1998) The influence of HLA-matched sibling donor availability on treatment outcome for patients with AML: an analysis of the AML 8A study of the EORTC Leukaemia Cooperative Group and GIMEMA. European Organization for Research and Treatment of Cancer. Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto. Br J Haematol **102**:S. 1344-53.
- 51 Kelly, L. M., Kutok, J. L., et al. (2002) PML/RARalpha and FLT3-ITD induce an APL-like disease in a mouse model. Proc Natl Acad Sci U S A **99**:S. 8283-8.
- 52 Kelly, L. M., Liu, Q., et al. (2002) FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model. Blood **99**:S. 310-8.

- 53 Kielman, M. F., Rindapaa, M., et al. (2002) Apc modulates embryonic stem-cell differentiation by controlling the dosage of beta-catenin signaling. Nat Genet **32**:S. 594-605.
- 54 Kiyoi, H., Naoe, T., et al. (1999) Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. Blood **93**:S. 3074-80.
- 55 Kiyoi, H., Naoe, T., et al. (1997) Internal tandem duplication of FLT3 associated with leukocytosis in acute promyelocytic leukemia. Leukemia Study Group of the Ministry of Health and Welfare (Kohseisho). Leukemia **11**:S. 1447-52.
- 56 Kiyoi, H., Towatari, M., et al. (1998) Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. Leukemia **12**:S. 1333-7.
- 57 Klampfer, L., Zhang, J., et al. (1996) The AML1/ETO fusion protein activates transcription of BCL-2. Proc Natl Acad Sci U S A **93**:S. 14059-64.
- 58 Knapper, S. (2007) FLT3 inhibition in acute myeloid leukaemia. Br J Haematol **138**:S. 687-99.
- 59 Kottaridis, P. D., Gale, R. E., et al. (2001) The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. Blood **98**:S. 1752-9.
- 60 Lamb, J., Ramaswamy, S., et al. (2003) A mechanism of cyclin D1 action encoded in the patterns of gene expression in human cancer. Cell **114**:S. 323-34.
- 61 Lazaris-Karatzas, A. und Sonenberg, N. (1992) The mRNA 5' cap-binding protein, eIF-4E, cooperates with v-myc or E1A in the transformation of primary rodent fibroblasts. Mol Cell Biol **12**:S. 1234-8.
- 62 Lekstrom-Himes, J. und Xanthopoulos, K. G. (1998) Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. J Biol Chem **273**:S. 28545-8.
- 63 Levis, M., Brown, P., et al. (2006) Plasma inhibitory activity (PIA): a pharmacodynamic assay reveals insights into the basis for cytotoxic response to FLT3 inhibitors. Blood **108**:S. 3477-83.
- 64 Lin, R. J. und Evans, R. M. (2000) Acquisition of oncogenic potential by RAR chimeras in acute promyelocytic leukemia through formation of homodimers. Mol Cell **5**:S. 821-30.
- 65 Lin, R. J., Nagy, L., et al. (1998) Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. Nature **391**:S. 811-4.
- 66 Linggi, B., Muller-Tidow, C., et al. (2002) The t(8;21) fusion protein, AML1 ETO, specifically represses the transcription of the p14(ARF) tumor suppressor in acute myeloid leukemia. Nat Med **8**:S. 743-50.
- 67 Lisovsky, M., Estrov, Z., et al. (1996) Flt3 ligand stimulates proliferation and inhibits apoptosis of acute myeloid leukemia cells: regulation of Bcl-2 and Bax. Blood **88**:S. 3987-97.
- 68 Lowenberg, B., Downing, J. R., et al. (1999) Acute myeloid leukemia. N Engl J Med **341**:S. 1051-62.
- 69 Lu, F., Gladden, A. B., et al. (2003) An alternatively spliced cyclin D1 isoform, cyclin D1b, is a nuclear oncogene. Cancer Res **63**:S. 7056-61.

- 70 Lutterbach, B., Westendorf, J. J., et al. (1998) ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, interacts with the N-CoR and mSin3 corepressors. Mol Cell Biol **18**:S. 7176-84.
- 71 Mamane, Y., Petroulakis, E., et al. (2006) mTOR, translation initiation and cancer. Oncogene **25**:S. 6416-22.
- 72 Mao, S., Frank, R. C., et al. (1999) Functional and physical interactions between AML1 proteins and an ETS protein, MEF: implications for the pathogenesis of t(8;21)-positive leukemias. Mol Cell Biol **19**:S. 3635-44.
- 73 Maroc, N., Rottapel, R., et al. (1993) Biochemical characterization and analysis of the transforming potential of the FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase. Oncogene **8**:S. 909-18.
- 74 Matsuura, I., Denissova, N. G., et al. (2004) Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads. Nature **430**:S. 226-31.
- 75 Mayer, R. J., Davis, R. B., et al. (1994) Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. Cancer and Leukemia Group B. N Engl J Med **331**:S. 896-903.
- 76 Melnick, A. und Licht, J. D. (1999) Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. Blood **93**:S. 3167-215.
- 77 Mizuki, M., Fenski, R., et al. (2000) Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. Blood **96**:S. 3907-14.
- 78 Muller-Tidow, C., Metzelder, S. K., et al. (2004) Expression of the p14ARF tumor suppressor predicts survival in acute myeloid leukemia. Leukemia **18**:S. 720-6.
- 79 Muller-Tidow, C., Steffen, B., et al. (2004) Translocation products in acute myeloid leukemia activate the Wnt signaling pathway in hematopoietic cells. Mol Cell Biol **24**:S. 2890-904.
- 80 Muller-Tidow, C., Wang, W., et al. (2001) Cyclin A1 directly interacts with B-myb and cyclin A1/cdk2 phosphorylate B-myb at functionally important serine and threonine residues: tissue-specific regulation of B-myb function. Blood **97**:S. 2091-7.
- 81 Muller, C., Yang, R., et al. (2000) The aberrant fusion proteins PML-RAR alpha and PLZF-RAR alpha contribute to the overexpression of cyclin A1 in acute promyelocytic leukemia. Blood **96**:S. 3894-9.
- 82 Murdoch, B., Chadwick, K., et al. (2003) Wnt-5A augments repopulating capacity and primitive hematopoietic development of human blood stem cells in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A **100**:S. 3422-7.
- 83 Nakao, M., Yokota, S., et al. (1996) Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. Leukemia **10**:S. 1911-8.
- 84 Nielsen, N. H., Loden, M., et al. (1999) G1-S transition defects occur in most breast cancers and predict outcome. Breast Cancer Res Treat **56**:S. 105-12.
- 85 Nwankwo, J. O. (2002) Anti-metastatic activities of all-trans retinoic acid, indole-3-carbinol and (+)-catechin in Dunning rat invasive prostate adenocarcinoma cells. Anticancer Res **22**:S. 4129-35.
- 86 Odgerel, T., Kikuchi, J., et al. (2008) The FLT3 inhibitor PKC412 exerts differential cell cycle effects on leukemic cells depending on the presence of FLT3 mutations. Oncogene **27**:S. 3102-10.

- 87 Oyama, T., Kashiwabara, K., et al. (1998) Frequent overexpression of the cyclin D1 oncogene in invasive lobular carcinoma of the breast. Cancer Res **58**:S. 2876-80.
- 88 Pabst, T., Mueller, B. U., et al. (2001) AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia. Nat Med **7**:S. 444-51.
- 89 Pandolfi, P. P. (2001) Oncogenes and tumor suppressors in the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. Hum Mol Genet **10**:S. 769-75.
- 90 Petkovich, P. M. (2001) Retinoic acid metabolism. J Am Acad Dermatol **45**:S. S136-42.
- 91 Piacibello, W., Fubini, L., et al. (1995) Effects of human FLT3 ligand on myeloid leukemia cell growth: heterogeneity in response and synergy with other hematopoietic growth factors. Blood **86**:S. 4105-14.
- 92 Piao, Y. F., Shi, Y., et al. (2003) Inhibitory effect of all-trans retinoic acid on human hepatocellular carcinoma cell proliferation. World J Gastroenterol **9**:S. 2117-20.
- 93 Pinheiro, R. F., Moreira Ede, S., et al. (2007) FLT3 mutation and AML/ETO in a case of Myelodysplastic syndrome in transformation corroborates the two hit model of leukemogenesis. Leuk Res **31**:S. 1015-8.
- 94 Polakis, P. (2000) Wnt signaling and cancer. Genes Dev **14**:S. 1837-51.
- 95 Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., et al. (1998) The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. Cell **92**:S. 713-23.
- 96 Prasad, C. P., Gupta, S. D., et al. (2007) Wnt signaling pathway in invasive ductal carcinoma of the breast: relationship between beta-catenin, dishevelled and cyclin D1 expression. Oncology **73**:S. 112-7.
- 97 Puccetti, E., Sennewald, B., et al. (2001) Down-stream regions of the POZ-domain influence the interaction of the t(11;17)-associated PLZF/RARalpha fusion protein with the histone-deacetylase recruiting co-repressor complex. Hematol J **2**:S. 385-92.
- 98 Pyronnet, S. (2000) Phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E by the MAPK-activated protein kinase Mnk1. Biochem Pharmacol **60**:S. 1237-43.
- 99 Quelle, D. E., Ashmun, R. A., et al. (1993) Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. Genes Dev **7**:S. 1559-71.
- 100 Randolph, T. R. (2000) Acute promyelocytic leukemia (AML-M3)--Part 1: Pathophysiology, clinical diagnosis, and differentiation therapy. Clin Lab Sci **13**:S. 98-105.
- 101 Randolph, T. R. (2000) Acute promyelocytic leukemia (AML-M3)--Part 2: Molecular defect, DNA diagnosis, and proposed models of leukemogenesis and differentiation therapy. Clin Lab Sci **13**:S. 106-16.
- 102 Reilly, J. T. (2002) Class III receptor tyrosine kinases: role in leukaemogenesis. Br J Haematol **116**:S. 744-57.
- 103 Reya, T., Duncan, A. W., et al. (2003) A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. Nature **423**:S. 409-14.
- 104 Ries LAG, E. M., Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L, Mariotto A, Feuer EJ, Edwards BK (eds). National Cancer Institute. Bethesda, MD (2004). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2001.
- 105 Rosnet, O., Buhring, H. J., et al. (1996) Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells. Leukemia **10**:S. 238-48.

- 106 Rosnet, O., Marchetto, S., et al. (1991) Murine Flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the PDGFR/CSF1R family. *Oncogene* **6**:S. 1641-50.
- 107 Rosnet, O., Schiff, C., et al. (1993) Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. *Blood* **82**:S. 1110-9.
- 108 Rozakis-Adcock, M., McGlade, J., et al. (1992) Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature* **360**:S. 689-92.
- 109 Ruggero, D., Montanaro, L., et al. (2004) The translation factor eIF-4E promotes tumor formation and cooperates with c-Myc in lymphomagenesis. *Nat Med* **10**:S. 484-6.
- 110 Sallmyr, A., Fan, J., et al. (2008) Internal tandem duplication of FLT3 (FLT3/ITD) induces increased ROS production, DNA damage, and misrepair: implications for poor prognosis in AML. *Blood* **111**:S. 3173-82.
- 111 Sato, N., Meijer, L., et al. (2004) Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* **10**:S. 55-63.
- 112 Schnittger, S., Schoch, C., et al. (2002) Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood* **100**:S. 59-66.
- 113 Sekkai, D., Gruel, G., et al. (2005) Microarray analysis of LIF/Stat3 transcriptional targets in embryonic stem cells. *Stem Cells* **23**:S. 1634-42.
- 114 Shi, Y. und Massague, J. (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**:S. 685-700.
- 115 Shoker, B. S., Jarvis, C., et al. (2001) Immunodetectable cyclin D(1) is associated with oestrogen receptor but not Ki67 in normal, cancerous and precancerous breast lesions. *Br J Cancer* **84**:S. 1064-9.
- 116 Smith, M., Barnett, M., et al. (2004) Adult acute myeloid leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol* **50**:S. 197-222.
- 117 Solomon, D. A., Wang, Y., et al. (2003) Cyclin D1 splice variants. Differential effects on localization, RB phosphorylation, and cellular transformation. *J Biol Chem* **278**:S. 30339-47.
- 118 Stacchini, A., Fubini, L., et al. (1996) Expression of type III receptor tyrosine kinases FLT3 and KIT and responses to their ligands by acute myeloid leukemia blasts. *Leukemia* **10**:S. 1584-91.
- 119 Stevens, R. F., Hann, I. M., et al. (1998) Marked improvements in outcome with chemotherapy alone in paediatric acute myeloid leukemia: results of the United Kingdom Medical Research Council's 10th AML trial. MRC Childhood Leukaemia Working Party. *Br J Haematol* **101**:S. 130-40.
- 120 Stone, R. M., DeAngelo, D. J., et al. (2005) Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood* **105**:S. 54-60.
- 121 Takahashi, Y., Lallemand-Breitenbach, V., et al. (2004) PML nuclear bodies and apoptosis. *Oncogene* **23**:S. 2819-24.
- 122 Thiede, C., Steudel, C., et al. (2002) Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* **99**:S. 4326-35.

- 123 Tonks, A., Pearn, L., et al. (2003) The AML1-ETO fusion gene promotes extensive self-renewal of human primary erythroid cells. Blood **101**:S. 624-32.
- 124 Tonks, A., Tonks, A. J., et al. (2004) Expression of AML1-ETO in human myelomonocytic cells selectively inhibits granulocytic differentiation and promotes their self-renewal. Leukemia **18**:S. 1238-45.
- 125 Tse, K. F., Mukherjee, G., et al. (2000) Constitutive activation of FLT3 stimulates multiple intracellular signal transducers and results in transformation. Leukemia **14**:S. 1766-76.
- 126 Vangala, R. K., Heiss-Neumann, M. S., et al. (2003) The myeloid master regulator transcription factor PU.1 is inactivated by AML1-ETO in t(8;21) myeloid leukemia. Blood **101**:S. 270-7.
- 127 Wang, J., Wang, M., et al. (2004) Domains involved in ETO and human N-CoR interaction and ETO transcription repression. Leuk Res **28**:S. 409-14.
- 128 Wang, W. F., Wang, Y. G., et al. (2002) Growth defect in Grg5 null mice is associated with reduced Ihh signaling in growth plates. Dev Dyn **224**:S. 79-89.
- 129 Wang, Y., Belflower, R. M., et al. (2005) Runx1/AML1/Cbfa2 mediates onset of mesenchymal cell differentiation toward chondrogenesis. J Bone Miner Res **20**:S. 1624-36.
- 130 Weinstat-Saslow, D., Merino, M. J., et al. (1995) Overexpression of cyclin D mRNA distinguishes invasive and in situ breast carcinomas from non-malignant lesions. Nat Med **1**:S. 1257-60.
- 131 Weisberg, E., Boulton, C., et al. (2002) Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412. Cancer Cell **1**:S. 433-43.
- 132 Westendorf, J. J., Yamamoto, C. M., et al. (1998) The t(8;21) fusion product, AML-1-ETO, associates with C/EBP-alpha, inhibits C/EBP-alpha-dependent transcription, and blocks granulocytic differentiation. Mol Cell Biol **18**:S. 322-33.
- 133 Whitman, S. P., Archer, K. J., et al. (2001) Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study. Cancer Res **61**:S. 7233-9.
- 134 Willert, K., Brown, J. D., et al. (2003) Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. Nature **423**:S. 448-52.
- 135 Yamamoto, Y., Kiyoi, H., et al. (2001) Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. Blood **97**:S. 2434-9.
- 136 Yang, R., Muller, C., et al. (1999) Functions of cyclin A1 in the cell cycle and its interactions with transcription factor E2F-1 and the Rb family of proteins. Mol Cell Biol **19**:S. 2400-7.
- 137 Yokota, S., Kiyoi, H., et al. (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**:S. 1605-9.
- 138 Yu, F., Yang, G., et al. (2007) Apoptosis related protein 3, an ATRA-upregulated membrane protein arrests the cell cycle at G1/S phase by decreasing the expression of cyclin D1. Biochem Biophys Res Commun **358**:S. 1041-6.

- 139 Zhang, S. und Broxmeyer, H. E. (2000) Flt3 ligand induces tyrosine phosphorylation of gab1 and gab2 and their association with shp-2, grb2, and PI3 kinase. Biochem Biophys Res Commun **277**:S. 195-9.
- 140 Zhang, S., Fukuda, S., et al. (2000) Essential role of signal transducer and activator of transcription (Stat)5a but not Stat5b for Flt3-dependent signaling. J Exp Med **192**:S. 719-28.
- 141 Zhang, Y., Xiong, Y., et al. (1998) ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. Cell **92**:S. 725-34.
- 142 Zukerberg, L. R., Yang, W. I., et al. (1995) Cyclin D1 (PRAD1) protein expression in breast cancer: approximately one-third of infiltrating mammary carcinomas show overexpression of the cyclin D1 oncogene. Mod Pathol **8**:S. 560-7.

6 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr.med. Björn Steffen für die sowohl fachlich als auch menschlich hervorragende Betreuung meiner Promotion.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Carsten Müller-Tidow herzlich für die Überlassung des Themas und die Leitung dieser Arbeit.

Fabienne Isken hat durch ihren Zuspruch, durch Motivation und technische Hilfe maßgeblich dazu beigetragen, dass ich die Dissertation niederschreiben konnte. Dafür meinen herzlichen Dank!

Ein besonderer Dank gilt Sarah Sargin für die gute Einarbeitung und Unterstützung meiner Laborarbeiten.

Weiterhin danke ich Maria Schiller, Frank Berkenfeld, Dr. Etmar Bulk, Dr. Markus Knop und allen Mitgliedern des Labors für molekulare Hämatologie und Onkologie der medizinischen Klinik und Poliklinik A für die fachliche Unterstützung, den Zuspruch und die gute und freundschaftliche Atmosphäre, in der ich meine Arbeit verrichten konnte.

Zu guter Letzt möchte ich mich auch bei meiner Familie und meinen besten Freunden für Motivation, Unterstützung und für die manchmal auch notwendige Ablenkung bedanken.

Ohne die Unterstützung der oben genannten Personen wäre mir die Vollendung der Dissertation nicht möglich gewesen.

7 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Marcel-Philipp Henrichs
 Geburtstag/-ort: 04. November 1980 in Wesel
 Familienstand: ledig
 Nationalität: deutsch

Schulzeit:

1987 –1991 Katholische Grundschule am Mühlenweg, Wesel
 1991 –2000 Konrad-Duden-Gymnasium, Wesel
 2000 Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

2000 –2001 Gesundheitszentrum, Marien-Hospital Wesel

Studium:

2001 –2008 Studium der Humanmedizin an der Westfälischen
 Wilhelms-Universität, Münster
 2003 Bestandener 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
 2006-2007 Praktisches Jahr
 2008 Bestandener 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr:

1. Tertial: Klinik und Poliklinik für Allgemeine Orthopädie der
 Westfälischen Wilhelms-Universität Münster (Orthopädie)
 2. Tertial: Tygerberg Academic Hospital, University of Stellenbosch,
 Kapstadt, Republik Südafrika (Chirurgie)
 3. Tertial: Spital Region Oberaargau, Langenthal, Schweiz
 (Innere Medizin)

Beruflicher Werdegang:

Ab 16.06.2008 Assistenzarzt in Facharztausbildung, Klinik und Poliklinik für
 Allgemeine Orthopädie der Westfälischen Wilhelms-Universität
 Münster

Marcel-Philipp Henrichs

Tierversuchsgenehmigung

vom 15.04.2005

Stadt Münster
Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt

Tierversuch: G 15/2005

Postanschrift: Stadt Münster • 48127 Münster

Universitätsklinikum Münster
Medizinische Klinik und Poliklinik A
Molekulare Hämatologie / Onkologie
Domagkstraße 3

48129 Münster

Veterinär- und Lebensmittel-
überwachungsamt

MS-Roxel, Schelmenstiege 1

Auskunft erteilt:
Frau Feldkamp
Zimmer: 105
Telefon: 02534/971 - 304
Telefax: 02534/971 - 399
E-Mail:
feldkamp@stadt-muenster.de
Sprechzeiten:
nach Vereinbarung

Datum und Zeichen Ihres Schreibens:
03.03.2005

Mein Zeichen:
39.32.5.4

Münster,
15.04.2005

Tierschutz

Tierversuch: G 15/2005

Versuchsleiter:
Prof. Dr. Hubert Serve

Stellvertreter:
Dr. Carsten Müller-Tidow
Dr. Christian Brandts
Dr. Steffen Koschmieder

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Serve,

gemäß § 11 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der z.Z. gültigen Fassung erteile ich Ihnen die Erlaubnis zur Haltung und Zucht von

maximal 5840 Mäusen für das Versuchsvorhaben.

Diese Erlaubnis ergeht unter folgenden Nebenbestimmungen:

1. Die Tiere werden im ZTE, Universitätsklinikum MS, Domagkstr. 15a, 48149 Münster, gehalten und gezüchtet.
2. Treten bei der Zucht und/oder Haltung von gentechnisch veränderten Tieren Anomalien auf, die besondere Haltungsbedingungen (Unterbringung, Ernährung, Pflege) erforderlich machen, ist dieses dem Veterinäramt der Stadt Münster umgehend mitzuteilen.
3. Es ist dafür zu sorgen, dass den Tieren - ihrer Art entsprechend - ausreichende Beschäftigungsmöglichkeiten geboten werden.
4. Es ist ein Tierbestandsbuch zu führen. Sie haben über die Herkunft und den Verbleib der Tiere Aufzeichnungen zu machen und diese drei Jahre lang aufzubewahren. Außerdem sind die Tiere zu kennzeichnen.
5. Die Verantwortung für die Zucht, Haltung, Unterbringung und Pflege der Tiere liegt bei Ihnen. Bei einem Wechsel der verantwortlichen Person erlischt diese Erlaubnis.

Konten der Stadtkasse

| | | | | | |
|---------------------------|------------------------|------------------|---------------------------------|-----------------------|------------------|
| Sparkasse Münster | Kto.-Nr. 752 | (BLZ 400 501 50) | Commerzbank Münster | Kto.-Nr. 393 210 0/00 | (BLZ 400 400 28) |
| Landeszentralbank Münster | Kto.-Nr. 40 001 700 | (BLZ 400 000 00) | Deutsche Bank Münster | Kto.-Nr. 0470 005 | (BLZ 400 700 80) |
| Postbank Dortmund | Kto.-Nr. 21 1 36-461 | (BLZ 440 100 46) | Dresdner Bank Münster | Kto.-Nr. 606 465 600 | (BLZ 400 800 40) |
| Bank für Gemeinwirtschaft | Kto.-Nr. 1 010 305 100 | (BLZ 400 101 11) | Volksbank Münster eG | Kto.-Nr. 4 200 800 | (BLZ 401 600 50) |
| Bankhaus Lampe Münster | Kto.-Nr. 306 002 | (BLZ 480 201 51) | Westdeutsche Landesbank Münster | Kto.-Nr. 61-226 | (BLZ 400 500 00) |

Zentrale Verbindungen

➔ Hauptvermittlung (0251) 492-0
Telefax (0251) 492-7700
Datex-J *0251492#
E-Mail
Stadtverwaltung@stadt-muenster.de

...

6. Für die Pflege und Betreuung sind die Tierpfleger der ZTE benannt.
7. Die medizinische Versorgung der Tiere hat durch Herrn Dr. M. Lücke, Leiter der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung des Universitätsklinikums Münster (ZTE), zu erfolgen. Über die Zucht und Haltung ist er ebenfalls zu informieren.
8. **Änderungen und Erweiterungen im Personalbereich, bei der Tierart und der Tierzahl sowie der Unterbringung sind umgehend dem Veterinäramt der Stadt Münster mitzuteilen.**
9. Für den Fall von erheblichen oder wiederholten Verstößen gegen die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes behalte ich mir den Widerruf dieser Erlaubnis vor.
10. Die nachträgliche Aufnahme, Änderung und Ergänzung von Nebenbestimmungen behalte ich mir vor.
11. Diese Genehmigung gilt für die Versuchsdauer, längstens jedoch bis zum **30. April 2008**.

Hinweis:

Bei Arbeiten mit genmanipulierten Tieren müssen die Vorschriften nach dem Gentechnikrecht eingehalten werden.

Rechtsbehelfsbelehrung

Gegen diese Erlaubnis können Sie innerhalb eines Monats, nachdem Ihnen die Erlaubnis bekannt gegeben worden ist, schriftlich oder zur Niederschrift bei dem Oberbürgermeister der Stadt Münster (Postanschrift: Der Oberbürgermeister, 48127 Münster) Widerspruch erheben. Der Nachbriefkasten befindet sich am Stadthaus I, Klemensstraße 10. Sie können den Widerspruch auch direkt beim Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt (Postanschrift: Der Oberbürgermeister, Amt 39, 48127 Münster, Hausanschrift: Schelmenstiege 1, 48161 Münster) erheben.

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag



Dr. Otto
Städt. Veterinärdirektor