

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Michael von Bergwelt

**Charakterisierung der Rolle von KDM6A-Zielgenen
hinsichtlich der Zytostatikaresistenz in AML-Patient*innen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
ANNA-LI HANNEFORTH

aus
Essen

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Karsten Spiekermann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. Torsten Haferlach
PD Dr. med. Christian Wichmann
PD Dr. rer. nat. Hanna-Mari Baldauf

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 22.12.2022

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Akute myeloische Leukämie	1
1.1.1	Therapie der AML	2
1.2	KDM6A	4
1.2.1	Rolle von KDM6A als epigenetischer Regulator und Tumorsuppressorgen	6
1.2.2	Rolle von KDM6A in der Vermittlung der Zytostatikaresistenz bei AML-Patient*innen	6
1.2.3	Potenzielle KDM6A-Zielgene	7
1.3	Zielsetzung der Arbeit	11
2	Material & Methoden	13
2.1	Material	13
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien	13
2.1.2	Puffer und Lösungen	15
2.1.3	Inhibitoren und Zytostatika	16
2.1.4	Kitsysteme	16
2.1.5	Antikörper	17
2.1.6	Plasmide	17
2.1.7	Oligonukleotide	18
2.1.8	Zelllinien	19
2.1.9	Verbrauchsmaterialien	19
2.1.10	Geräte	20
2.1.11	Software	21
2.2	Methoden	22
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	22
2.2.2	Zellbiologische Methoden	25
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	31
2.2.4	Statistische Auswertung	37
3	Ergebnisse	39
3.1	Identifikation von potenziellen KDM6A-Zielgenen	39
3.2	NT5C2	40
3.2.1	NT5C2-Expression in Abhängigkeit von der KDM6A-Expression	40
3.2.2	Effekt von NT5C2-Überexpression auf die Zytostatikaresistenz und Proliferationsgeschwindigkeit	40
3.3	SPARC	43
3.3.1	SPARC-Expression in Abhängigkeit von der KDM6A-Expression	43
3.3.2	Effekt von SPARC-Überexpression auf die Zytostatikaresistenz und Proliferationsgeschwindigkeit	44
3.4	ENT1	45
3.4.1	ENT1-Expression in Abhängigkeit von der KDM6A-Expression	45
3.4.2	Effekt von ENT1-Inhibition auf die Zytostatikaresistenz	47
3.4.3	ZCCHC7-ENT1	50
3.5	PiggyBac KDM6A-Re-Expression	51

3.5.1	SPARC-Expression unter KDM6A-Re-Expression	52
3.5.2	ENT1-Expression unter KDM6A-Re-Expression	53
3.5.3	Effekt der KDM6A-Re-Expression auf Zytostatikaresistenz und Proliferationsgeschwindigkeit	54
3.6	KDM6A-Interaktionspartner	58
4	Diskussion	63
4.1	NT5C2.....	63
4.2	SPARC.....	65
4.3	ENT1.....	67
4.4	PiggyBac KDM6A-Re-Expression.....	70
4.5	KDM6A-Interaktionspartner	73
5	Zusammenfassung.....	75
6	Literaturverzeichnis.....	77
7	Anhang	83
7.1	Abkürzungsverzeichnis	83
7.2	Abbildungsverzeichnis	87
7.3	Tabellenverzeichnis	87
7.4	Danksagung.....	88
	Curriculum Vitae	91
	Publikation.....	92

1 Einleitung

1.1 Akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne hämatologische Erkrankung, die durch die rapide klonale Expansion von myeloischen Vorläuferzellen charakterisiert ist. Obwohl sich die Therapie in den letzten Jahrzehnten verbessert hat, ist die Prognose weiterhin insgesamt schlecht. Fortschritte wurden primär in der supportiven Therapie erzielt, während es in der zytoreduktiven Therapie in den letzten Jahrzehnten wenige Veränderungen gab. Die Inzidenz beträgt etwa 4/100.000 (2016) und steigt mit dem Lebensalter¹; die Prognose verschlechtert sich mit steigendem Alter. Fast 80% der Patient*innen mit Diagnosealter über 65 Jahren sterben innerhalb eines Jahres nach Diagnosestellung², wobei das mittlere Erkrankungsalter bei 72 Jahren liegt³. Mit 24% hat die AML die fünftschlechteste 5-Jahres-Überlebensrate aller Krebsarten (2016)².

Bekannte ätiologische Faktoren der AML sind unter anderem eine Knochenmarksschädigung durch Exposition mit ionisierender Strahlung, Benzol, Zytostatika und Tabak. Außerdem kann die AML sekundär aus Vorläufererkrankungen der hämatopoetischen Zellen wie dem myelodysplastischen Syndrom (MDS) oder myeloproliferativen Neoplasien entstehen^{4,5}.

Leukämien werden je nach klinischem Verlauf in akute und chronische Formen eingeteilt. Chronische Leukämien verlaufen langsam und sind anfangs oft lange Zeit subklinisch. Akute Leukämien hingegen sind durch einen rapiden klinischen Verlauf gekennzeichnet und führen ohne Therapie nach wenigen Monaten zum Tod⁶. Definitionsgemäß liegt bei ihnen der Blastenanteil im Knochenmark oder peripheren Blut bei $\geq 20\%$ ⁷. Die AML ist mit etwa 80% die häufigste der akuten Leukämien im Erwachsenenalter³.

Die Einteilung der AML erfolgte ursprünglich nach der 1976 veröffentlichten French-American-British(FAB)–Klassifizierung anhand von zytomorphologischen Merkmalen in 8 Subgruppen M0-M7⁸. Nachdem durch Weiterentwicklung molekulargenetischer Methoden neue relevante Informationen für Diagnosestellung, Therapie und Prognose verfügbar waren, wurde 2008 durch die WHO eine durch weitere genetische, immunphänotypische und klinische Kriterien erweiterte Klassifikation eingeführt, die 2016 nochmals aktualisiert wurde^{7,9}.

Klinisch manifestiert sich die AML vor allem durch die Verdrängung der normalen Hämatopoese durch starke Vermehrung der abnormen Blasten im Knochenmark. Symptome sind Zeichen der Anämie, wie Müdigkeit und verringerte Leistungsfähigkeit, der

Leukopenie, vor allem Infektanfälligkeit, und der Thrombopenie, wie erhöhte Blutungsneigung.

1.1.1 Therapie der AML

Bei der Therapie der AML wird grundsätzlich zwischen der Induktionstherapie mit dem Ziel einer kompletten Remission (CR) und der Konsolidierungstherapie zur Erhaltung der Remission unterschieden. Die CR wird durch die Reduktion der Blasten im Knochenmark auf $< 5\%$ und die Normalisierung des peripheren Blutbilds definiert. 70-80% der Patient*innen < 60 Jahren bzw. 40-65% der Patient*innen > 60 Jahren erreichen eine CR. Allerdings entwickelt sich trotz Konsolidierungstherapie entsprechend bei 50-55% bzw. 85% dieser Patient*innen ein Rezidiv¹⁰. Dieses entsteht aus wenigen verbleibenden malignen Zellen, der minimal residual disease (MRD), und ist oft resistenter gegen Chemotherapeutika, was eine der größten Herausforderungen in der AML-Therapie darstellt.

Die seit Langem eingesetzte Standard-Induktionstherapie ist das sogenannte 7+3-Schema, bei dem Cytarabin (AraC, 100-200 mg/m²) intravenös kontinuierlich über 7 Tage und an 3 Tagen mit einem Anthrazyklin wie Daunorubicin (DNR, 60 mg/m²), Idarubicin (10-12 mg/m²) oder Mitoxantron (10-12 mg/m²) kombiniert verabreicht wird⁵. Beim TAD-Schema kommt zusätzlich auch 6-Thioguanin (6-TG, 100-200 mg/m²) an 7 Tagen zur Anwendung, das jedoch verglichen mit dem 7+3-Schema keinen nachgewiesenen therapeutischen Vorteil für das Gesamtüberleben erbringt¹⁰.

AraC ist ein Analogon des Nukleosids Desoxycytidin, das nach Aufnahme in die Zelle durch drei verschiedene Kinasen zum aktiven Metaboliten Ara-CTP triphosphoryliert wird. Ara-CTP wird während der DNA-Synthese in proliferierenden Zellen fälschlicherweise statt Desoxy-CTP in die DNA eingebaut und führt dadurch zum Elongationsstopp, zur Blockade der DNA-Synthese und zum Zelltod. 6-TG ist ein Analogon des Nukleosids Guanin, welches nach dem gleichen Prinzip wie AraC wirkt und ebenfalls intrazellulär triphosphoryliert und in die DNA eingebaut wird¹¹. DNR hingegen hemmt die DNA-Topoisomerase II, was mit weiteren anderen molekularen Mechanismen zur Induktion der Apoptose führt¹² (Abbildung 1).

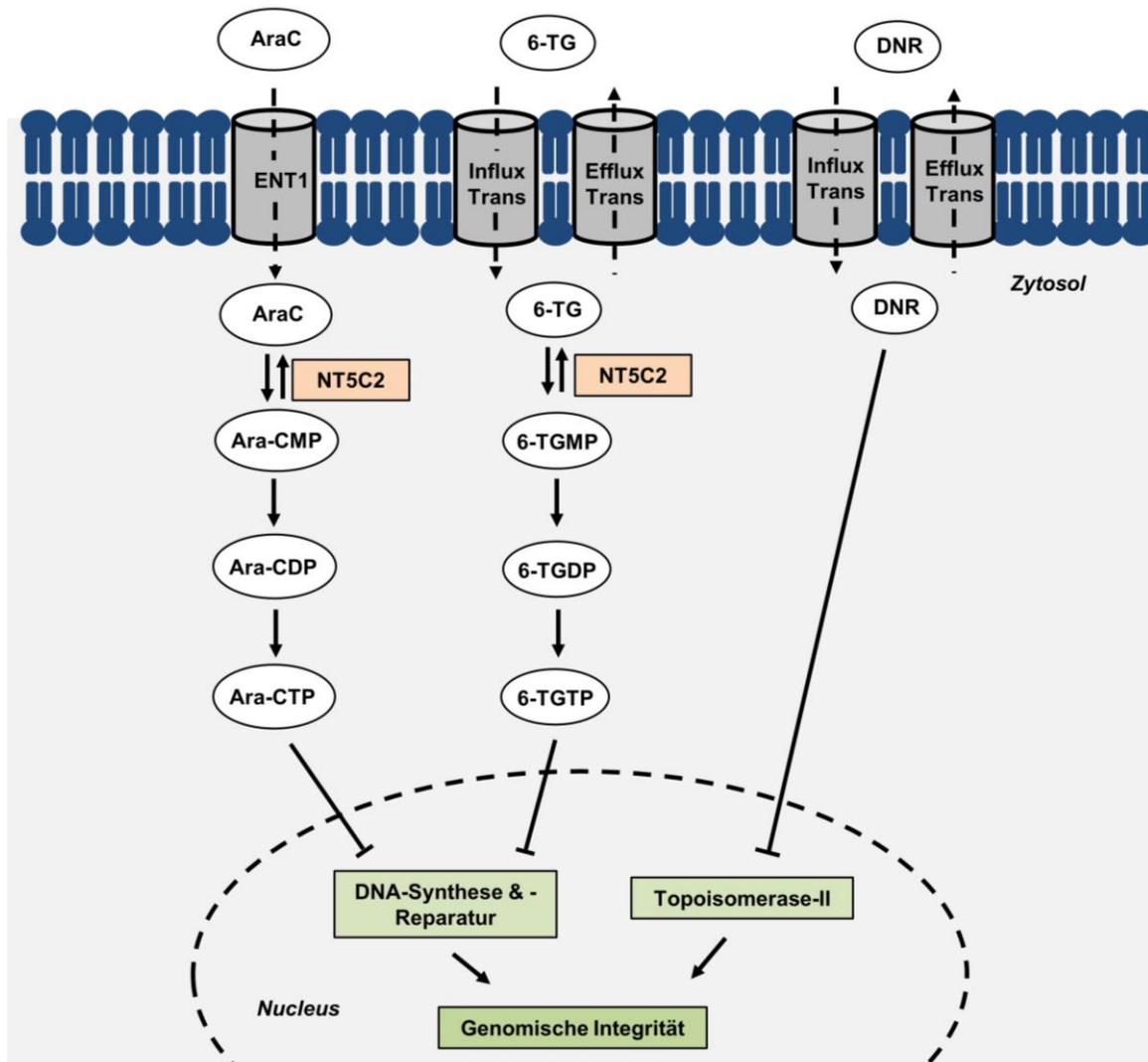


Abbildung 1 Vereinfachtes Schema des Metabolismus von AraC, 6-TG und DNR. 6-TG, 6-Thioguanin; 6-TGDP, 6-Thioguanindiphosphat; 6-TGMP, 6-Thioguanosinmonophosphat; 6-TGTP, 6-Thioguanintriphosphat; AraC, Cytarabin; Ara-CDP, Cytarabindiphosphat; Ara-CMP, Cytarabinmonophosphat; Ara-CTP, Cytarabintriphosphat; DNR, Daunorubicin; ENT1, Equibrilative Nucleoside Transporter 1; NT5C2, 5'Nucleotidase; Trans, Transporter.

Adaptiert nach Lamba *et al.*¹³, de Boer *et al.*¹⁴, Megías-Vericat *et al.*¹⁵, Stief¹⁶.

Je nach individuellem Risiko- und genetischem Profil wird die Induktionstherapie angepasst, indem bei unfitten Patient*innen weniger intensive Therapieprotokolle verwendet und bei bestimmten Patient*innen-Subgruppen zielgerichtete Therapeutika eingesetzt werden (Abbildung 2). Daher wird zu Therapiebeginn das Mutationsprofil der Patient*innen bestimmt, die die Zuordnung in Subgruppen erlaubt. Konkret wird bei Patient*innen mit bestimmten Mutationen der Rezeptortyrosinkinase FLT3 der FLT3-Inhibitor Midostaurin von Tag 8 bis 21 zusätzlich zum 7+3-Schema gegeben. Bei MDS-assoziiierter und therapieassoziiierter AML wird das 7+3-Schema durch CPX-351 ersetzt, welches eine liposomal abgekapselte Kombination von Cytarabin und Daunorubicin ist. Beim Nachweis

von CD33-Positivität soll der mit einem Zytotoxin gekoppelte CD33-Antikörper Gemtuzumab-Ozagamicin (GO) zum 7+3-Schema ergänzt werden, wenn bestimmte weitere Faktoren vorliegen, bei denen ein durch GO verbessertes Therapieergebnis gezeigt werden konnte. Die AML-Subgruppe der akute Promyelozytenleukämie (APL) wird durch eine auf All-Trans-Retinsäure und Arsentrioxid basierende Induktionstherapie behandelt.

Bei unfitness Patient*innen mit höherem Alter > 75 Jahren oder Komorbiditäten sind Hydroxyurea, niedrigdosiertes Cytarabin oder die hypomethylierenden Nukleosidanaloga Decitabin oder 5-Azacitidin mögliche Therapeutika^{4,5}.

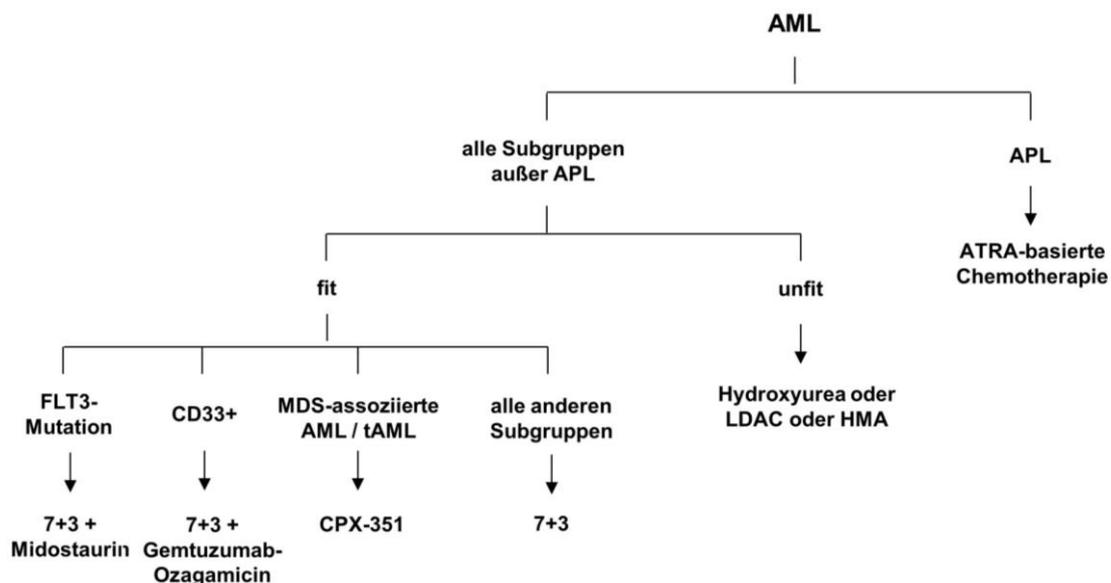


Abbildung 2 Vereinfachtes Schema der AML-Induktionstherapie. Darstellung verschiedener AML-Subgruppen und deren Induktionstherapie. 7+3, 7+3-Schema; APL, akute Promyelozytenleukämie; ATRA, All-trans-Retinsäure; HMA, hypomethylierende Substanzen; LDAC, niedrigdosiertes AraC; tAML, therapieassoziierte AML. Adaptiert nach Röllig *et al.*⁵.

Die Konsolidierungstherapie kann abhängig von Konstitution und Rezidivrisiko der Patient*innen mit hochdosiertem AraC oder einer allogenen Stammzelltransplantation erfolgen⁵.

1.2 KDM6A

KDM6A, auch bekannt als ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome (UTX), ist eine ubiquitär exprimierte Histondemethylase. Sie entfernt mit der enzymatisch aktiven JmjC-Domäne spezifisch Di- und Trimethylgruppen von Histon 3 an Lysin 27 (H3K27)¹⁷⁻¹⁹. Dies führt im Rahmen der epigenetischen Regulation zur transkriptionellen Aktivierung^{20,21}.

KDM6A gehört mit KDM6B (JMJD3) und KDM6C (ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, Y chromosome, UTY), die starke Sequenzhomologie zeigen, zur KDM6 Subfamilie der Jumonji C(JmjC)-Domänen enthaltenden Proteine²². KDM6A hat eine Länge von 1401 Aminosäuren und besitzt wie UTY zusätzlich zur C-terminalen JmjC-Domäne 6 N-terminale tetratricopeptide repeat(TPR)-Domänen, welche Protein-Protein-Interaktionen vermitteln^{23,24}. Die TPR-Domänen kommen bei KDM6B allerdings nicht vor²². Das auf dem X-Chromosom lokalisierte *KDM6A* unterliegt anders als die meisten X-chromosomalen Gene nicht der X-Inaktivierung, sodass bei weiblichen Individuen höhere Expressionslevel nachgewiesen werden können^{25,26}.

Gemeinsam mit KMT2C (MLL3), KMT2D (MLL4) und weiteren Proteinen ist KDM6A ein Bestandteil des „complex of proteins associated with SET1“(COMPASS)-Komplexes. Dieser mono-, di- und trimethyliert Lysin 4 von Histon 3 (H3K4) und führt dadurch zur transkriptionellen Aktivierung²⁷⁻²⁹. KMT2C und KMT2D agieren vor allem als Mono- und Dimethyltransferasen von H3K4 an Enhancern³⁰. Dies führt durch weitere KMT2D-vermittelte Acetylierung von H3K27 durch die Acetyltransferase p300 zur Enhanceraktivierung³¹⁻³³.

Für die Methyltransferasefunktion an H3K4 sind auch die weiteren Bestandteile des COMPASS-Komplexes WDR5, RbBP5, ASH2L und DPY30, welche gemeinsam den Subkomplex WRAD bilden, relevant³⁴. Dabei ist die Anwesenheit von KMT2D wichtig für die Stabilisierung des Komplexes und von UTX in den Zellen. Außerdem ist KMT2D essentiell für die frühe embryonale Entwicklung von Mäusen^{30,35}.

KDM6A scheint in diesem Komplex durch die Entfernung der Trimethylierung an H3K27 die Interaktion zwischen Histon 3 und den COMPASS-Komponenten WDR5 und RbBP5 zu vermitteln und erklärt möglicherweise die inverse Korrelation zwischen der Trimethylierung von H3K4 und H3K27³⁶.

Darüber hinaus kontrolliert KDM6A auch die Acetylierung von Histon 3, Lysin 27 (H3K27ac), wobei der Knockdown (KD) von KDM6A zu verringerten H3K27ac-Leveln führt³⁷.



Abbildung 3 Schematische Proteinstruktur von KDM6A. Aminosäurepositionen sind angegeben. TPR, tetratricopeptide, JmjC, Jumonji C. Illustration mit der *IBS Software*³⁸. Adaptiert nach Hong *et al.*¹⁹.

1.2.1 Rolle von KDM6A als epigenetischer Regulator und Tumorsuppressorgen

KDM6A hat eine Vielzahl von sowohl Katalyse-abhängigen als auch Katalyse-unabhängigen Funktionen. In verschiedenen Studien wurde die Relevanz von KDM6A in der embryonalen Differenzierung wie der kardialen Entwicklung und der Hämatopoese gezeigt³⁹⁻⁴³. Diese geschieht unter anderem durch die Regulation von *HOX*-Genen mittels Verringerung der H3K27me3-Level und Erhöhung der H3K4me3-Level durch Rekrutierung des MLL3/4-Komplexes an den entsprechenden Promotoren^{17,44}. Als Histondemethylase agiert KDM6A als epigenetischer Regulator, welcher auf die Transkription verschiedener Gene Einfluss nimmt. Die DNA in eukaryotischen Zellen ist um Histone aufgewickelt und dadurch in Form von Chromatin komprimiert verpackt. Epigenetische Modifikationen an den Histonen, zum Beispiel durch Methylierung oder Acetylierung, und an der DNA können die Konfiguration des Chromatins beeinflussen und dadurch die Transkription der DNA regulieren.

2009 wurde erstmals die Rolle von *KDM6A* als Tumorsuppressorgen postuliert⁴⁵. Inaktivierende somatische Mutationen von *KDM6A* wurden in einer Reihe von verschiedenen Tumoren beobachtet, darunter das multiple Myelom, das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus, das klarzellige Nierenzellkarzinom, das Urothelkarzinom, das Medulloblastom und myeloische Leukämien⁴⁵⁻⁴⁸. Auch bei T-ALL-Patient*innen wurden gehäuft somatische Loss-of-function(LOF)-Mutationen gefunden, die vor allem in der katalytischen JmjC-Domäne vorkamen und damit die kritische Rolle der Demethylase-Funktion von KDM6A für die ALL-Leukämogenese zeigten^{26,49}. In anderen Tumorarten wie auch der AML kommen inaktivierende *KDM6A*-Mutationen auch an anderen Positionen außerhalb der JmjC-Domäne vor^{50,51}, was auf weitere, Demethylase-unabhängige Mechanismen der Tumorsuppressorfunktion hindeutet. 2018 zeigten Gozdecka *et al.*⁵², dass LOF-*KDM6A*-Mutationen durch nicht-katalytische KDM6A-Funktionen wie differenzielle bidirektionale H3K27-Acetylierung zur myeloischen Leukämogenese führen⁵².

1.2.2 Rolle von KDM6A in der Vermittlung der Zytostatikaresistenz bei AML-Patient*innen

Greif *et al.*⁵³ untersuchten 2018 in einer Exomsequenzierung 50 zytogenetisch normale (CN-) AML-Patient*innen zum Zeitpunkt von Diagnose, Remission und Rezidiv. Dabei wurden bei zwei Patientinnen somatische Mutationen von *KDM6A*, L1103R und V1113Sfs*38, entdeckt. Bei beiden Patientinnen konnten die *KDM6A*-Mutationen bei Diagnose als

subklonal (variant allele frequency (VAF) relativ zur Blastenzahl < 4,8%) detektiert werden, während sie im Rezidiv zum Hauptklon (VAF > 41%) herausgewachsen waren^{51,53}. Als Induktionstherapie wurde bei den Patientinnen das TAD-Schema mit 6-TG, AraC, und DNR eingesetzt. Eine weitere Mutation mit starker VAF-Erhöhung im Rezidiv (bei Diagnose 0,58% VAF, im Rezidiv 68,2% VAF), *KDM6A* E1325X, wurde in einem von 8 PDX-Mausmodellen von AML-Patient*innen^{54,55} gefunden. Die entsprechende Patientin mit dieser *KDM6A*-Mutation erhielt AraC und DNR, gefolgt von hochdosiertem AraC und Mitoxantron, als Induktionstherapie.

Daher wurde weiterhin untersucht, ob die Induktionstherapie mit den Chemotherapeutika AraC, 6-TG und DNR zur Selektion von *KDM6A*-mutierten Klonen im Rezidiv geführt haben könnte. Stief *et al.*⁵¹ aus der Arbeitsgruppe von Karsten Spiekermann zeigten in *KDM6A* short hairpin RNA(shRNA)-KD- und CRISPR/Cas9-Knockout(KO)-Zellen der myeloischen Zelllinie K562 im Vergleich zur Kontrolle eine erhöhte Resistenz gegen AraC und DNR, nicht jedoch gegen 6-TG. Auch in der AML-Zelllinie MONO-MAC 1 (MM-1) zeigte sich der Zusammenhang von *KDM6A*-KO und erhöhter AraC-Resistenz⁵¹.

1.2.3 Potenzielle *KDM6A*-Zielgene

1.2.3.1 NT5C2

NT5C2 (5'-Nucleotidase, Cytosolic II oder cN-II) ist ein zytoplasmatisch ubiquitär exprimiertes Enzym⁵⁶, das durch Dephosphorylierung von Nucleosidmonophosphaten, bevorzugt GMP, IMP und XMP, am Purinabbau beteiligt ist^{57,58}. Dadurch nimmt NT5C2 an der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen intra- und extrazellulärem Nucleotidpool teil, welches für eine normale Zellfunktion relevant ist^{59,60}. Durch Dephosphorylierung von Ara-CMP¹³ und 6-Thio-GMP⁶¹ ist NT5C2 auch im AraC- und 6-TG-Metabolismus involviert (Abbildung 1).

Die prognostische Relevanz von NT5C2 in der AML-Therapie wurde erstmals 2001 beschrieben. Galmarini *et al.*⁶²⁻⁶⁷ konnten zeigen, dass eine höhere *NT5C2*-mRNA-Expression in AML-Blasten bei Diagnose mit einer schlechten Prognose korreliert⁶²⁻⁶⁷. Außerdem wurde eine signifikante Korrelation zwischen hohen *NT5C2* mRNA-Leveln in AML-Blasten bei Diagnose und höheren *in vitro*-IC₅₀-Werten für AraC festgestellt⁶⁴, was darauf hindeuten könnte, dass die Inhibition von NT5C2 den zytotoxischen Effekt von AraC verstärkt⁶⁸.

Rezidiv-spezifische Gain-of-function(GOF)-Mutationen von *NT5C2* wurden in verschiedenen Untersuchungen bei 20% der T-ALL-Rezidiv-Patient*innen, 3-10% der

Vorläufer-B-ALL-Rezidiv-Patient*innen und 35-45% der ALL-Patient*innen mit frühem Rezidiv nachgewiesen⁶⁹. Durch Überexpression der mutierten *NT5C2*-Konstrukte in ALL-Zelllinien, welche eine erhöhte Resistenz gegen 6-TG und 6-Mercaptopurin (6-MP), nicht aber gegen AraC aufwiesen, wurden die *NT5C2*-Mutationen als GOF-Mutationen charakterisiert^{70,71}. Die am häufigsten vorkommende rezidiv-assoziierte Mutation *NT5C2* R367Q^{69,72} wurde auch in dieser Arbeit untersucht.

Des Weiteren spielen Alterationen in der *NT5C2*-Expression eine Rolle bei der hereditären spastischen Paraplegie, der Schizophrenie und der Blutdruckregulation⁷³.

1.2.3.2 SPARC

Das Gen secreted protein acidic and rich in cysteine (*SPARC*) kodiert für ein hochkonserviertes matrizelluläres Protein. Matrizelluläre Proteine sind extrazelluläre Proteine, die nicht direkt strukturgebend sind, sondern Zell-Matrix-Interaktionen und Zellfunktionen modulieren⁷⁴. *SPARC* wirkt antiproliferativ⁷⁵ und antiadhäsiv⁷⁴, wird vermehrt bei Gewebeerneuerung oder -umbau exprimiert⁷⁵ und ist relevant für die Zellmigration⁷⁶.

Untersuchungen von *SPARC*-KO-Mäusen zeigen, dass *SPARC* ebenfalls eine wichtige Rolle für die Adipogenese⁷⁷, Wundheilung⁷⁸ und das Wachstum von implantierten Tumorzellen⁷⁹ spielt. In verschiedenen menschlichen Tumorgeweben und im Tumorstromagewebe ist *SPARC* im Vergleich zum normalen Gewebe differenziell exprimiert und scheint unterschiedliche tumorbiologische Funktionen zu haben^{80,81}. So sind höhere Expressionslevel von *SPARC* in Brustkrebs⁸², Melanomen⁸³ und Gliomen⁸⁴ bekannt und tragen dort möglicherweise zur Tumorprogression bei. Andererseits sind in Ovarial-⁸⁵, Kolorektal-⁸⁶ und Pankreaskarzinomen⁸⁷ geringere *SPARC*-Expressionslevel nachweisbar, die eine Rolle von *SPARC* als Tumorsuppressoren vermuten lassen. *SPARC*-Expression im Tumorstromagewebe von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen⁸⁸ und Pankreaskarzinomen⁸⁹ ist mit einer schlechteren Prognose verbunden. 2014 wurde die klinische Relevanz der *SPARC*-Expression auch in der AML beschrieben, wobei eine höhere *SPARC*-Expression mit einem schlechteren Outcome bei CN-AML-Patient*innen assoziiert ist⁹⁰.

Interessant ist auch der Zusammenhang zwischen *SPARC* und dem MDS, einer hämatologischen Erkrankung, die zur sekundären AML fortschreiten kann. Die partielle Deletion des langen Arms von Chromosom 5 (del(5q)) gehört mit 10-15% zu den häufigsten chromosomalen Aberrationen beim MDS und kommt auch bei der AML vor⁹¹. Del(5q)-

MDS-Patient*innen sprechen meist gut auf eine Therapie mit Lenalidomid an. Zwar ist der genaue Mechanismus dafür noch nicht geklärt, aber die antiproliferative Wirkung von SPARC könnte dazu beitragen. *SPARC* ist nämlich innerhalb der beim del(5q)-MDS fehlenden Region von Chromosom 5 lokalisiert und wird unter Lenalidomid-Behandlung in del(5q)-MDS-Patient*innen um mehr als 4-fach hochreguliert. Die Normalisierung der SPARC-Expression könnte ursächlich sein für die Proliferationshemmung der del(5q)-Klone^{92,93}.

1.2.3.3 ENT1

Physiologische Nucleoside und die meisten in der Chemotherapie verwendeten Nucleosidanaloga sind hydrophile Moleküle und benötigen daher membranständige Nucleosidtransporter, um durch die hydrophobe Zellmembran in die Zelle aufgenommen zu werden^{68,94}. In humanen Zellen sind zwei Familien von Nucleosidtransportern bekannt, die equilibrative nucleoside transporter(ENT)- und die concentrative nucleoside transporter(CNT)-Familie⁹⁵. Die Nucleosidaufnahme für den Salvage-Pathway ist in Leukozyten für die zelluläre Biosynthese essentiell, da sie im Gegensatz zu Zellen anderer Gewebe keine De-Novo-Purinnucleotidsynthese besitzen⁹⁶.

Der Nucleosidtransporter human equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1), auch bekannt als solute carrier family 29 member 1 (SLC29A1), gehört zur ENT-Proteinfamilie mit den Mitgliedern ENT1-4 und ist ein Membrantransporter für Purin- und Pyrimidinnucleoside⁹⁷. Die Expression von ENT1 ist ubiquitär, hauptsächlich in der Zellmembran, aber in geringerem Ausmaß auch in den intrazellulären Membranen von Mitochondrien, Nucleus und endoplasmatischem Retikulum⁹⁸⁻¹⁰⁰. ENT1 funktioniert bidirektional passiv, d.h. ENT1 transportiert Nucleoside entlang ihrer Konzentrationsgradienten¹⁰¹. Auch sorgt ENT1 für die zelluläre Aufnahme von synthetischen Nucleosidanaloga und macht als Haupttransporter von AraC einen Anteil von etwa 80% der zellulären AraC-Aufnahme aus^{13,102}. Daher spielt eine herunterregulierte ENT1-Expression mit konsekutiv geringerem AraC-Transport in die Zelle auch als Mechanismus für eine herabgesetzte AraC-Zytotoxizität eine Rolle⁹⁵. Der Nucleosidtransport durch ENT1 wird selektiv und mit hoher Affinität durch nanomolare Konzentrationen des Nucleosidanalogs Nitrobenzylmercaptapurin Ribonucleosid (NBMPR) inhibiert^{103,104}.

Ein Zusammenhang zwischen der ENT1-Transportfunktion und der AraC-Sensitivität von AML-Patient*innen wurde bereits in verschiedenen Studien gezeigt. Geringe mRNA-

Expressionslevel von *ENT1* bei AML-Patient*innen korrelierten mit einem kürzeren krankheitsfreien Überleben⁶⁶ und einem höheren Risiko für ein frühes Rezidiv⁶³. Außerdem wurde in *in vitro*-Zytotoxizitätsassays mit Blasten von AML-Patient*innen eine signifikant inverse Korrelation zwischen *ENT1* mRNA-Expression und mittlerer letaler Konzentration (LC₅₀) von AraC festgestellt¹⁰². Dies deutet auf eine durch geringe *ENT1*-Expression vermittelte erhöhte AraC-Resistenz hin.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) handelt es sich um eine maligne klonale Expansion myeloischer Vorläuferzellen mit insgesamt schlechter Prognose. Insbesondere Rezidive aufgrund von Zytostatikaresistenz stellen eine Herausforderung in der AML-Therapie dar. KDM6A ist eine Histondemethylase und wurde als Tumorsuppressorgen in verschiedenen Tumorarten identifiziert⁴⁵. Auch in der AML konnte in Arbeiten aus der Arbeitsgruppe von Karsten Spiekermann gezeigt werden, dass KDM6A-inaktivierende Mutationen zu einer erhöhten Resistenz gegen die in der AML-Therapie verwendeten Zytostatika Cytarabin (AraC) und Daunorubicin (DNR) führen⁵¹. Möglicherweise führt dies bei den entsprechenden Subklonen zum Selektionsvorteil und Herauswachsen im Rezidiv⁵¹. KDM6A reguliert zahlreiche Zielgene epigenetisch. Um einen genaueren Mechanismus für die KDM6A-vermittelte erhöhte Zytostatikaresistenz aufzudecken, wurden in dieser Arbeit drei potenziell durch KDM6A regulierte Zielgene, *NT5C2*, *SPARC* und *ENT1*, untersucht. Diese wurden in *KDM6A*-Knockdown oder -Knockout-Zellen differenziell reguliert. Arbeitshypothese war dabei, dass die bekanntermaßen im Zytostatikametabolismus oder in der Tumorgenese involvierten Gene eine erhöhte Resistenz gegen AraC und DNR in der AML vermitteln könnten. Die Gene wurden in verschiedenen myeloischen Zelllinien hinsichtlich ihrer Regulation im *KDM6A*-Knockdown und -Knockout und des Effekts ihrer Überexpression oder Inhibition auf die Zytostatikasensitivität getestet. Außerdem wurde KDM6A in *KDM6A*-Knockout-Zellen re-exprimiert und diese auf eine differenzielle Regulation der Zielgene, die Wiederherstellung der Zytostatikaresistenz sowie die diesbezügliche Relevanz der Demethylase-Aktivität von KDM6A untersucht. Schließlich wurden mit der Massenspektrometrie Interaktionspartner von KDM6A untersucht. Dadurch sollten weitere möglicherweise im Zusammenhang mit der Zytostatikaresistenz stehende Gene identifiziert und der Einfluss verschiedener *KDM6A*-Mutationen auf die Bindung der Interaktionspartner untersucht werden.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie / Reagenz	Hersteller	Verwendung
1 kb DNA ladder	Promega (Madison, WI, USA)	DNA-Leiter
1,4-Dithiothreit (DTT)	Carl Roth (Karlsruhe)	Massenspektrometrie
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	SDS-Gelelektrophorese, RNA-Isolation
2-Propanol	AppliChem (Darmstadt)	RNA-Isolation
4',6-Diamidin-2-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	Immunfluoreszenz
Acetonitril	Carl Roth (Karlsruhe)	Massenspektrometrie
Acrylamid 30% + Bisacrylamid 0.8%	Carl Roth (Karlsruhe)	SDS-Gelelektrophorese
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth (Karlsruhe)	Agarosegelelektrophorese
Ameisensäure	Carl Roth (Karlsruhe)	Massenspektrometrie
Ammoniaklösung 25%	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	Massenspektrometrie
Ammoniumhydrogencarbonat	Carl Roth (Karlsruhe)	Massenspektrometrie
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Serva Electrophoresis (Heidelberg)	SDS-Gelelektrophorese
Ampicillin-Natriumsalz	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	DNA-Plasmid-Präparation
Aprotinin	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	Zelllyse
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)	Bradford-Test
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	SDS-Gelelektrophorese
Calciumchlorid-Dihydrat	AppliChem (Darmstadt)	Transfektion
Chloracetamid	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	Massenspektrometrie
Coulter CLENZ Cleaning Agent	Beckman Coulter (Brea, CA, USA)	Zellzählgerät
Coulter Isoton II Diluent	Beckman Coulter (Brea, CA, USA)	Zellzählgerät
CutSmart® Buffer	New England BioLabs (Ipswich, MA, USA)	Plasmidverdau
DEPC-treated water	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	RNA-Isolation
DH5α kompetente Bakterien	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	Retransformation
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	Einfrieren von Zellen, Lösen von wasserunlöslichen Substanzen
DMEM, high glucose	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	Zellkulturmedium
D-PBS, ohne Calcium, Magnesium	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach)	Waschpuffer für Zellen
Ethanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	Desinfektion

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	Western-Blot
Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	Zelllyse
Fetales Bovines Serum (FBS)	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach)	Zellkultur
Fluorescence Mounting Medium	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)	Immunfluoreszenz
Formaldehyd-Lösung 37%	AppliChem (Darmstadt)	Immunfluoreszenz
HEPES	AppliChem (Darmstadt)	Zelllyse
HEPES buffered saline 2x (HBS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	Transfektion
HiMark™ Pre-Stained Protein Standard	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	Proteinleiter
Iodacetamid	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	Massenspektrometrie
Isopropanol	AppliChem (Darmstadt)	Western-Blot, Massenspektrometrie
Kanamycinsulfat	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	Retransformation
LB-Agar (Lennox)	Carl Roth (Karlsruhe)	Retransformation
LB-Medium (Lennox)	Carl Roth (Karlsruhe)	Retransformation
Lysyl-Endopeptidase®	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation (Osaka, Japan)	Massenspektrometrie
Magermilchpulver	Carl Roth (Karlsruhe)	Western-Blot
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe)	Massenspektrometrie
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	SDS-Gelelektrophorese
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	Zelllyse
Natriumpyruvat 100 mM	Biochrom GmbH (Berlin)	Zusatz für Zellkulturmedium
NEBuffer™ 2.1	New England BioLabs (Ipswich, MA, USA)	Plasmidverdau
NEBuffer™ 3.1	New England BioLabs (Ipswich, MA, USA)	Plasmidverdau
Non-essential amino acids 10x	Biochrom GmbH (Berlin)	Zusatz für Zellkulturmedium
Opti-MEM I Reduced Serum Medium, Gibco™	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	Transfektion
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	Proteinleiter
PBS w/o Mg ²⁺ , Ca ²⁺	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach)	Zellkultur, Immunfluoreszenz
Penicillin-Streptomycin	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach)	Zusatz für Zellkulturmedium
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	Zelllyse
Pierce® Anti-HA Agarose	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	Immunpräzipitation
Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	Western-Blot
Plasmocin™ prophylactic	InvivoGen (San Diego, CA, USA)	Zusatz für Zellkulturmedium
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	FACS
Quick-Load Purple 50 bp DNA ladder	New England BioLabs (Ipswich, MA, USA)	DNA-Leiter
Recombinant Human IL-3 (rhIL3)	R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)	Zusatz für Zellkulturmedium

Recombinant Human Insulin (E. coli-derived)	PromoCell (Heidelberg)	Zusatz für Zellkulturmedium
Restriktionsenzyme	New England BioLabs (Ipswich, MA, USA)	Plasmidverdau
RNase away	Carl Roth (Karlsruhe)	RNA-Isolation
RPMI 1640 + Glutamax, Gibco	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	Zellkulturmedium
S.O.C. Medium	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	Transformation
SYBR™ Safe DNA gel stain	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	Agarosegelelektrophorese
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth (Karlsruhe)	SDS-Gelelektrophorese
Trifluoressigsäure	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	Massenspektrometrie
Tris-(2-carboxyethyl) phosphinhydrochlorid (TCEP)	Carl Roth (Karlsruhe)	Massenspektrometrie
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Carl Roth (Karlsruhe)	SDS-Gelelektrophorese
Triton-X-100	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	Zellyse
Trypanblau	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	Zellzählgerät
Trypsin	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	Massenspektrometrie
Trypsin-EDTA (0.05%)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	Ablösung von adhärennten Zellen
Tween 20	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	Western-Blot
Urea	Carl Roth (Karlsruhe)	Massenspektrometrie

2.1.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 2 Verwendete Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung / Herkunft	Verwendung
Agarosegel 1-3%	1-3% Agarose in 1 x TAE Puffer + SYBR™ Safe (1:10000)	Agarosegelelektrophorese
Elektrophoresepuffer 10x	5 l: 151.4 g Tris, 720.65 g Glycin, 50 g Natriumdodecylsulfat, gereinigtes Wasser	SDS-Gelelektrophorese
FACS-Puffer	50 ml: 48.5 ml PBS, 1.5 ml FBS, 50 µl Propidiumiodid	FACS
KCM 5x	13 ml: 5 ml 3 M KCl, 4.5 ml 1 M CaCl ₂ , 7.5 ml 1 M MgCl ₂ , gereinigtes Wasser	Transformation
Lämmli-Puffer (4x)	10 ml: 1.33 ml 1.5 M Tris-HCl (pH 6.8), 0.8 g SDS, 4 ml Glycerol, 0.4 ml 14.3 M 2-Mercaptoethanol, 146 mg EDTA, 8 mg Bromphenolblau	SDS-Gelelektrophorese
LB Agar (Lennox)	32 g in 1 l gereinigtem Wasser, autoklaviert**	Bakterienkultur
LB _{Ampicillin} -Platten	Platten mit 20 ml LB-Agar mit 100 µg/ml Ampicillin	Bakterienkultur
Lysispuffer*	500 ml: 25 ml 1 M HEPES, 75 ml 1 M NaCl, 10 ml 50 mM EGTA, 50 ml Glycerol 100%, 5 ml Triton X-100, 2.1 g NaF, 2.23 g Na ₄ P ₂ O ₇ ·10H ₂ O	Zellyse
TAE-Puffer	5 l: 242.3 g Tris, 18.61 g Natriumedetat, 57.1 ml Essigsäure 100%, gereinigtes Wasser	DNA-Gelelektrophorese
TBS 10x	5 l: 12.11 g Tris (pH 8.0), 87.66 g NaCl, gereinigtes Wasser	Western-Blot

TBS-T	TBS 1x mit 0.1% Tween 20	Waschpuffer für Western-Blot Membranen
Transblotpuffer 1x	5 l: Tris 15 g, Glycin 71 g, Methanol 790 g, gereinigtes Wasser	Western-Blot
Tris-HCl 1.5 M pH 6.8	5 l: 908.55 g Tris, gereinigtes Wasser, pH 6.8	SDS-Gelelektrophorese
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	5 l: 908.55 g Tris, gereinigtes Wasser, pH 8.8	SDS-Gelelektrophorese

* wurde vor der Verwendung mit den Inhibitoren 5 mM PMSF, 25 µg/ml Aprotinin und 50 µg/ml Natriumorthovanadat versetzt

** wurde für 20 min autoklaviert bei 120°C und 2 bar

2.1.3 Inhibitoren und Zytostatika

Tabelle 3 Verwendete Inhibitoren und Zytostatika

Name	Hersteller	verwendete Konzentrationen	Stammlösung
6-Thioguanin	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	5 nM - 1750 nM	20 mM in DMSO
Cytarabin	Selleck Chemicals (Houston, TX, USA)	8.3 nM - 7290 nM	20 mM in DMSO
Daunorubicin	Apotheke LMU-Klinikum	0.5 nM - 80 nM	3.8 mM in NaCl
NMBPR	Tocris Bioscience (Bristol, UK)	0.1 µM - 10 µM	750 µM in DMSO

2.1.4 Kitsysteme

Tabelle 4 Verwendete Kitsysteme

Kit	Hersteller	Katalognummer	Verwendung
Amaxa® Cell Line Nucleofector® Kit V	Lonza Group (Basel, CH)	VCA-1003	Nukleofektion
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)	12362	Plasmid-Extraktion
In-Fusion® HD Cloning Kit	Takara Bio (Kusatsu, JP)	639648	Klonierung
Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	L3000008	Transfektion
MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit	Lonza (Basel, CH)	LT07-318	Mykoplasmentest
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)	27106	Plasmid-Extraktion
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)	28706	DNA-Isolation aus Agarosegelen
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen (Hilden)	204141	qRT-PCR
QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)	200523	Ortsgerichtete Mutagenese
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)	74104	RNA-Isolation
SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	18091050	cDNA-Synthese

2.1.5 Antikörper

Tabelle 5 Verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller	Hersteller-nummer	Verdünnung	Inkubation
Anti β -Actin	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	A5441	1:20000	1 h, RT
Anti-ENT 1	St John's Laboratory (London, UK)	STJ96396	1:750	über Nacht, 4°C
Anti-FLAG	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	F3165-1MG	1:10000 (WB), 1:1000 (IF)	1 h, RT
Anti-HA-TAG	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)	2367	1:600	1 h, RT
Anti-KDM6A	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)	33510S	1:3000	1 h, RT
Anti-mouse IgG (H+L), F(ab') ₂ Fragment (Alexa Fluor® 488 Conjugate)	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)	4408	1:500	1 h, RT
Anti-Mouse-IgGK BP-HRP, goat	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)	sc-516102	1:10000	1 h, RT
Anti-NT5C2	Abnova (Taipeh, Taiwan)	H00022978-M02	1:500	1 h, RT
Anti-Rabbit IgG-HRP, goat	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	A0545	1:10000	1 h, RT
Anti-SPARC	Abcam (Cambridge, UK)	ab207743 / ERP20121	1:600*	über Nacht, 4°C
Anti- α -Tubulin	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	T6199-200UL	1:20000	1 h, RT

* in Kombination mit *Anti-Mouse-IgGK BP-HRP, goat*
1:6000

2.1.6 Plasmide

Tabelle 6 Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Verwendung	Herkunft
CMV 3x N-FLAG ENT1	Expressionsvektor	AG I. Coe (Toronto, CA)
pcDNA 6 HA GFP	Expressionsvektor	AG K. Spiekermann
pcDNA 6 HA KDM6A 880-1401	Expressionsvektor	AG K. Spiekermann
pcDNA 6 HA KDM6A E1325X	Expressionsvektor	AG K. Spiekermann
pcDNA 6 HA KDM6A H1146A	Expressionsvektor	AG K. Spiekermann
pcDNA 6 HA KDM6A L1103R	Expressionsvektor	AG K. Spiekermann
pcDNA 6 HA KDM6A Q880X	Expressionsvektor	AG K. Spiekermann
pcDNA 6 HA KDM6A V1113Sfs*38	Expressionsvektor	AG K. Spiekermann
pcDNA 6 HA KDM6A	Expressionsvektor	AG K. Spiekermann
PiggyBac Transposase	Expressionsvektor	AG S. Bultmann (München)
PiggyBac-KDM6A-H1146A	Expressionsvektor	Diese Arbeit
PiggyBac-KDM6A-WT	Expressionsvektor	Diese Arbeit
pMIY-ENT1-N48Q	retroviraler Expressionsvektor	Diese Arbeit

pMIY-ENT1-WT	retroviraler Expressionsvektor	Diese Arbeit
pMIY-NT5C2-R367Q	retroviraler Expressionsvektor	Diese Arbeit
pMIY-NT5C2-WT	retroviraler Expressionsvektor	Diese Arbeit
pMIY-SPARC	retroviraler Expressionsvektor	Diese Arbeit
pMIY-ZCCHC7-ENT1 C-Flag	retroviraler Expressionsvektor	Diese Arbeit
pMIY-ZCCHC7-ENT1 N-Flag	retroviraler Expressionsvektor	Diese Arbeit
pMSCV-IRES-EYFP (pMIY)	retroviraler Expressionsvektor	R.K. Humphries (Vancouver, CA)

2.1.7 Oligonukleotide

Tabelle 7 Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' - 3')	Verwendung
ENT1_FOR	AGCCAGGGAAAACCGAGA	qRT-PCR ENT1
ENT1_REV	ACCCAGCATGAAGAAGATAAGC	qRT-PCR ENT1
GAPDH_FOR	AATGAAGGGGTCATTGATGG	qRT-PCR GAPDH
GAPDH_REV	AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA	qRT-PCR GAPDH
InFus MIY NT5C2_FOR	CTAGGCGCCGGAATTGACTGGATCCGG TACCGAGGAGATCTG	InFusion Klonierung NT5C2 bzw. SPARC in pMIY-Vektor
InFus MIY NT5C2_REV	TCGAGTTTTTCTCGAGGCCGTTTAAACC TTATCGTCGT	InFusion Klonierung NT5C2 bzw. SPARC in pMIY-Vektor
InFus MIY ENT1.FOR	CTAGGCGCCGGAATTCAACCATGGACT ACAAAGACCATGAC	InFusion Klonierung ENT1 in pMIY-Vektor
InFus MIY ENT1.REV	TCGAGTTTTTCTCGAGCGACTGGTACCT CACACAATTG	InFusion Klonierung ENT1 in pMIY-Vektor
InFus PiggyBac UTX.F	CTCTGAGGCCACCCGCTAGCCACCATG AAATCCTGCGGAGT	InFusion Klonierung KDM6A in Piggybac Vektor
InFus PiggyBac UTX.R	AGGCTTACCGCGGCCGCTACTAAGAT GAGGCGGATGGTAATGGA	InFusion Klonierung KDM6A in Piggybac Vektor
MIY ZCCHC7-ENT1 C-FLAG.R	TCGAGTTTTTCTCGAGGCATCTTAAACC TTATCGTCGTCATC	InFusion Klonierung ZCCHC7- ENT1 C-FLAG in pMIY-Vektor
MIY ZCCHC7-ENT1 N-FLAG.R	TCGAGTTTTTCTCGAGACCTCCTGCATC TCACACAAT	InFusion Klonierung ZCCHC7- ENT1 N-FLAG in pMIY-Vektor
MIY ZCCHC7- ENT1.FOR	CTAGGCGCCGGAATTCATCGGTACCGA GGAGATCTG	InFusion Klonierung ZCCHC7- ENT1 FLAG in pMIY-Vektor
NT5C2 R367Q_FOR	GGAATCACCAAAAAGTTTGCCACCCT TGCCGTTTC	NT5C2 R367Q Mutagenese
NT5C2 R367Q_REV	GAAACGGCAAGGGTGGCAAACTTTTTT GGTGATTCC	NT5C2 R367Q Mutagenese
Seq_NT5C2_FOR1	GATGGGGACCTCTTCATGTC	NT5C2 & NT5C2 R367Q Sequenzierung
Seq_NT5C2_FOR2	CACTTTTCGAAGAACTTCAGAGC	NT5C2 Sequenzierung
Seq_NT5C2_REV1	GGGAGCCCTTGTAATGAACC	NT5C2 & NT5C2 R367Q Sequenzierung
Seq_SLC29A1_FOR1	GCTGGATGCTCTGCCCTTCT	ENT1 Sequenzierung
Seq_SLC29A1_FOR2	GGGAACGTTACTTCATTCTG	ENT1 Sequenzierung
Seq_SLC29A1_REV	CCAAATGAATTAATGAGCACGA	ENT1 & ZCCHC7-ENT1 Sequenzierung
Seq_SPARC_FOR1	CCCTTGCTGGACTCTGA	SPARC Sequenzierung

Seq_SPARC_REV	CTCTCATACAGGGTGACCAGG	SPARC Sequenzierung
Seq_ZCCHC7_FOR1	GGTGATAATGTGGAAAGCTGG	ZCCHC7-ENT1 Sequenzierung
SPARC_FOR	GTGCAGAGGAAACCGAAGAG	qRT-PCR SPARC
SPARC_REV	AAGTGGCAGGAAGAGTCGAA	qRT-PCR SPARC

2.1.8 Zelllinien

Tabelle 8 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Geschlecht
Ba/F3	murine Pro-B-Zellen	nicht bekannt
HEK293T	humane embryonale Niere	weiblich
K562	humane CML in Blastenkrisis	weiblich
MONO-MAC-1 (MM-1)	humane AML	männlich
MONO-MAC-6 (MM-6)	humane AML	männlich
THP-1	humane AML	männlich
Phoenix-ECO	humane embryonale Niere	weiblich

Alle Zelllinien wurden von der DSMZ bezogen.

2.1.9 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
3M™ Empore™ SDB-RPS PN 2241	Agilent Technologies
Axygen® PCR 8-Strip Tubes	Corning (Corning, NY, USA)
Brand™ Autoklavierbare Entsorgungsbeutel	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Combitips advanced® 0.5 ml, 1.0 ml, 5.0 ml	Eppendorf (Hamburg)
Filterpipettenspitzen	Sorenson Multiguard, Biozym
Gel Blotting Papier	GE Healthcare (Chicago, IL, USA)
Glaswaren	DWK Life Sciences (Wertheim)
Handschuhe	B. Braun (Melsungen), Halyard Health (Alpharetta, GA, USA)
Kryoröhrchen Nunc™ Cryo Tube	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Küchentücher	Tapira (Friedewald)
Lightcyclerplatten (96-Well)	Sarstedt (Nümbrecht)
Massenspektrometrie Container	BGB (Rheinfelden)
Mr. Frosty™ Einfriercontainer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Multipipettenspitzen 0.1 ml	Eppendorf (Hamburg)
Nitrozellulosemembran 0.45 µM	GE Healthcare (Chicago, IL, USA)
Novex™ Gelkassetten 1.0 mm	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
PARAFILM® M	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
PCR-Reaktionsgefäße 0.2 ml	Biozym Scientific (Oldendorf)
Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Corning (Corning, NY, USA)
Pipettenspitzen Nachfüllsystem Diamond Tower Pack	Gilson (Madison, WI, USA)

Pipettenspitzen zur Gelbeladung, 200 µl	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
QIAshredder	Qiagen (Hilden)
Reagiergefäße 1.5 ml, 2 ml	Sarstedt (Nümbrecht) & Eppendorf (Hamburg)
Sterilfilter 0.22 µm	Merck Millipore (Billerica, MA, USA)
Weißer 96-Well-Feststoffplatten	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Zellkulturflaschen, -platten, -schalen	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturplatten (48-Well)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Zellkulturplatten, V-Bottom (96-Well)	Greiner Bio One (Kremsmünster, AT)
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Zentrifugenröhrchen mit Rundboden 5 ml, 14 ml	Corning (Corning, NY, USA)

2.1.10 Geräte

Tabelle 10 Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller (Hauptsitz)
Agarosegelelektrophoresekammer	PEQLAB Biotechnologie (Erlangen)
Autoklaven VARIOKLAV® 500, Vertical Autoclave VX-150	HP Medizintechnik (Oberschleißheim), Systec (Linden)
Bakterienbrutschrank	Infors (Bottmingen, CH)
CO ₂ -Inkubator 9040-0013	Binder (Tuttlingen)
DNA-Thermocycler	Peqlab (Erlangen)
Drehrad	Kisker Biotech (Steinfurt)
Drucker / Kopierer / FAX	Konica Minolta (Chiyoda, JP)
Eismaschine FM-170AKE-SB	Hoshizaki (Toyoake, JP)
Entwicklermaschine für DNA-Gelelektrophorese	Vilber Lourmat (Eberhardzell)
Entwicklermaschine für Western-Blot Fusion SL4	Vilber Lourmat (Eberhardzell)
Fluoreszenzmikroskop Leica DMI8	Leica (Wetzlar)
Flüssigkeitschromatograph UltiMate™ 3000 RSLCnano	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Flüssigstickstofftank	Cryoson (Schöllkrippen)
Gefrierschränke (-20°C)	Liebherr (Ochsenhausen), Bosch (Gerlingen Schillerhöhe)
Gefrierschränke (-80°C)	GFL (Burgwedel), Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Heizblock	Heap Labor Consult (Bovenden)
Kühlschränke (4°C)	Tritec (Hannover), Bosch (Stuttgart)
Kühlzentrifuge Centrifuge 5424R	Eppendorf (Hamburg)
Lebendzellzählgerät Vi-Cell XR	Beckman Coulter (Brea, CA, USA)
Luminometer GloMax discover	Promega (Madison, WI, USA)
Magnetrührer MR3001	Heidolph (Schwabach)
Massenspektrometer Q Exactive™ HF Hybrid Quadrupol-Orbitrap™	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Mikroskop ID03	Carl Zeiss (Oberkochen)
Multipipette Xstream	Eppendorf (Hamburg)
Nukleofektor Amaxa Nucleofector™ 2b Device	Lonza Group (Basel, CH)

pH-Meter inoLab® pH 7110	WTW (Weilheim)
Photometer BioPhotometer 6131	Eppendorf (Hamburg)
Pipetten 0.25-2.00 µl, 2.0-20.0 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl	Gilson (Madison, WI, USA)
Pipettierhelfer accu-jet pro	Brand (Wertheim)
Präzisionswaage PCB2500-2	Kern (Balingen-Frommern)
Proteingelelektrophoresekammer Xcell SureLock Mini Cell	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Rollenmischer RS-TR05	Phoenix Intrument (Garbsen)
RT-PCR-Thermocycler LightCycler 480 II	Roche (Basel, CH)
Schüttler Ika SA 260 basic	Merck (Darmstadt)
Sicherheitswerkbank FlowSafe B-[MaxPro] ² -130	Berner (Elmshorn)
SpeedVac Konzentrator	Eppendorf (Hamburg)
Spektralphotometer Nanodrop 1000	Peqlab (Erlangen)
Thermomixer Eppendorf 5350	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge 5430	Eppendorf (Hamburg)
Transblotkammer	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
Vortexer	Cenco (Breda, NL)
Wasseraufbereitungssystem Milli-Q® Reference Wasseraufbereitungssystem, Q-POD® Reinstwasser-Entnahmeeinheit	Merck (Darmstadt)
Wasserbad Typ 1003, 1092	GFL (Burgwedel), Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Zentrifugen Heraeus™ Multifuge™ X1R	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

2.1.11 Software

Tabelle 11 Verwendete Software

Software	Hersteller	Verwendung
E-Capt 15.06	Vilber Lourmat (Eberhardzell)	Agarosegeldokumentation
FusionCapt Advance 16.11	Vilber Lourmat (Eberhardzell)	Western-Blot-Analyse
GraphPad Prism 6.07	GraphPad Software (La Jolla, CA, USA)	Datenvisualisierung & statistische Analyse
IBS 1.0.3	The CUCKOO Workgroup ³⁸	Visualisierung von Proteinstrukturen
ImageJ	ImageJ developers	Western-Blot-Analyse
Mendeley Desktop 1.19.4	Mendeley Ltd., Elsevier	Literaturverwaltung
Microsoft Office 2010	Microsoft (Redmond, WA, USA)	Erstellung von Abbildungen und des Manuskripts
Perseus 1.6.0.2	Cox <i>et al.</i> ⁷⁶ , MPI für Biochemie	Massenspektrometrieanalyse
SnapGene 4.1	GSL Biotech LLC (Chicago, IL, USA)	Visualisierung von DNA-Vektorkarten

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Chemische Retransformation

Die Retransformation wurde durchgeführt, um DNA-Plasmide in Bakterien zu vermehren und aus diesen zu isolieren. Dafür wurden 14 µl steriles Wasser, 10 µl 5x KCM, 0,5-1 µl Plasmid-DNA und 25 µl kompetente *Escherichia coli* (E.coli)-Bakterien vom Stamm DH5α in ein 1,5 ml Reagiergefäß pipettiert und für 20 min auf Eis und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 250 µl SOC-Medium dazugegeben und die kompetenten Bakterien für 60 min bei 37°C mit 350 rpm in einem Thermomixer geschüttelt. 110 µl der Bakterien wurden auf eine auf 37°C vorgewärmte LB_{Ampicillin}-Platte gegeben. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag einzelne Kolonien für die Präparation von Plasmid-DNA gepickt und expandiert.

2.2.1.2 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Isolation von Plasmid-DNA wurde die Methode der alkalischen Lyse verwendet.

2.2.1.2.1 Plasmid-Minipräparation

Für die Vermehrung von Plasmid-DNA in geringem Umfang wurden Plasmid-Minipräparationen durchgeführt. Eine einzelne Kolonie transformierter Bakterien wurde von der Agarplatte gepickt und über Nacht in 2 ml LB_{Ampicillin}-Medium bei 37°C und 220 rpm geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde die Plasmid-Minipräparation mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* von *Qiagen (Hilden)* nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die gewonnene DNA wurde in 50 µl EB-Puffer gelöst und die Ausbeute im *Spektralphotometer Nanodrop 1000* von *Peqlab (Erlangen)* bestimmt.

2.2.1.2.2 Plasmid-Maxipräparation

Um DNA-Plasmide in großem Umfang zu vermehren, wurde die Plasmid-Maxipräparation durchgeführt. Dazu wurde eine einzelne Kolonie transformierter Bakterien gepickt und für 6-8 h in 2 ml LB_{Ampicillin}-Medium bei 220 rpm und 37°C geschüttelt. Anschließend wurde diese Bakteriensuspension in 200 ml LB-Medium überführt und für 16 h bei 220 rpm und 37°C geschüttelt.

Mit der entstandenen Bakterienkultur wurde eine endotoxinfreie Plasmidpräparation mithilfe des *EndoFree Plasmid Maxi Kit* von *Qiagen (Hilden)* nach Herstellerangaben

durchgeführt. Die isolierte Plasmid-DNA wurde über Nacht bei 4°C in 200 µl TE-Puffer gelöst und die Konzentration im Spektralphotometer gemessen.

Plasmid-DNA wurde in Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

2.2.1.3 DNA-Spaltung durch Restriktionsenzyme

Alle DNA-Plasmidkonstrukte wurden durch einen Restriktionsenzymverdau auf korrekte Größe des Vektors und Inserts, Orientierung des Inserts und ggf. korrekte Mutagenese überprüft. Dafür wurden je 30000 U der Restriktionsenzyme mit passendem Restriktionspuffer und 3 µg der Plasmid-DNA, aufgefüllt mit Wasser auf 50 µl Endvolumen, für mindestens 3 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die entstandenen DNA-Fragmente durch eine DNA-Gelelektrophorese aufgetrennt.

2.2.1.4 DNA-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden nach ihrer Größe in einem mit *SYBRTM Safe DNA gel stain* von *Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)* gefärbten, je nach DNA-Länge 1-3%igen Agarosegel aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde in *Agarosegelelektrophoresekammern* von *PEQLAB Biotechnologie (Erlangen)* bei einer Spannung von 100 V für 30 – 60 min durchgeführt. Als Elektrophoresepuffer wurde 1x TAE-Puffer verwendet. Die DNA wurde mit 6x Loading Dye vermischt und ein DNA-Leiter passender Größe mit aufgetragen.

Nach der Elektrophorese konnten die DNA-Banden durch das *SYBRTM Safe* im UV-Licht sichtbar gemacht werden.

2.2.1.5 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Nach der DNA-Gelelektrophorese wurde die gewünschte DNA-Bande aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mithilfe des *QIAquick Gel Extraction Kit* von *Qiagen (Hilden)* nach Herstellerangaben extrahiert und in 30–50 µl H₂O eluiert.

2.2.1.6 RNA-Isolation aus Zellen

RNA wurde aus 5-10x10⁶ Zellen mithilfe des RNeasy Mini Kits von Qiagen unter Verwendung der optionalen *QIAshredder* nach Herstellerprotokoll isoliert. Dabei wurde RNase-frei gearbeitet. Die gewonnene RNA wurde bei -80°C aufbewahrt.

2.2.1.7 cDNA-Synthese

cDNA wurde mithilfe des *SuperScriptTM IV First-Strand Synthesis System Kits* von *Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)* nach Protokoll synthetisiert. Dabei wurde 1 µg Template-RNA verwendet. Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.2.1.8 Quantitative Real-Time-PCR

Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) zur Untersuchung der Genexpression auf RNA-Level wurde mit dem *LightCycler 480 II* von *Roche* und der entsprechenden Software durchgeführt. Hierfür wurde das *QuantiTect SYBR Green PCR Kit* von *Qiagen* entsprechend des Protokolls verwendet. Das enthaltene SYBR Green I bindet dabei an alle doppelsträngigen DNA-Moleküle und emittiert dann ein Fluoreszenzsignal. Es wurden 500 ng cDNA eingesetzt.

Die relative Änderung (Fold Change) wurde mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet und auf die GAPDH-Expression normalisiert. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 7 aufgelistet.

2.2.1.9 DNA-Klonierung

Für diese Arbeit wurden die untersuchten Gene *KDM6A*, *KDM6A H1146A*, *NT5C2*, *SPARC* und *ENT1* in die Expressionsvektoren pMIY (*R.K. Humphries, Vancouver, CA*) und PiggyBac (*AG Bultmann, München*) kloniert. Die Klonierungen wurden mit dem *In-Fusion® HD Cloning Kit* von *Takara Bio (Kusatsu, Präfektur Shiga, JP)* nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

2.2.1.10 Ortsgerichtete Mutagenese

Mit der ortsgerichteten Mutagenese wurden Punktmutationen in DNA-Vektoren eingefügt. Sie wurde mithilfe des *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kits* von *Agilent Technologies (Santa Clara, USA)* nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Es wurden 10 ng DNA-Template verwendet. Die Mutagenese wurde durch eine Sanger-Sequenzierung bestätigt.

2.2.1.11 DNA-Sequenzierung

DNA wurde nach der Sanger-Methode durch die Firma *Sequiseive (Vaterstetten)* sequenziert.

2.2.1.12 RNA-Sequenzierung

Die RNA-Sequenzierung wurde durchgeführt, um im *KDM6A*-KD oder -KO differenziell regulierte Gene festzustellen und darunter potenzielle *KDM6A*-Zielgene zu identifizieren, die für die erhöhte Zytostatikaresistenz im *KDM6A*-KD verantwortlich sein könnten.

Für die RNA-Sequenzierung wurde ein bereits beschriebenes Protokoll verwendet, das an die SCRB-Methode angelehnt ist^{16,105}.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Zellkultur

Die Zellkulturen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und Wasserdampfsättigung im *CO₂-Inkubator C 170 von Binder (Tuttlingen)* und nach Herstellerangaben der *DSMZ (Braunschweig)* inkubiert. Die gesamte Zellkulturarbeit wurde steril unter *FlowSafe B-[MaxPro]²-130 Sicherheitswerkbänken von Berner (Elmshorn)* durchgeführt. Medium und Trypsin wurden vor der Verwendung im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Suspensionszellen wurden in RPMI-Medien unter Zusatz von 20% FBS, 60 U/ml Penicillin und 60 µg/ml Streptomycin und adhärenente Zellen in DMEM-Medien mit 10% FBS und 50 µg/ml *PlasmocinTM prophylactic* von *InvivoGen (USA)* kultiviert. Zusätzlich wurde das RPMI-Medium für die MM-1- und MM-6-Zellen mit 1 mM Natriumpyruvat und 1 x Nicht-essenziellen Aminosäuren und das für die Ba/F3-Zellen mit 10% FBS und 10% WEHI-Medium versetzt. Dem MM-6-Medium wurde außerdem 10 µg/ml rekombinantes Insulin hinzugefügt.

Das FBS wurde vor der Verwendung aufgetaut, im Wasserbad bei 56°C für 30 min erhitzt, um noch vorhandene hitzeempfindliche Bestandteile des Komplementsystems zu inaktivieren, und anschließend steril filtriert. Es wurde bei -20°C gelagert.

Zur Herstellung von Medium für die IL-3-abhängigen Ba/F3-Zellen wurden IL-3-produzierende WEHI-Zellen genutzt. Diese geben in Kultur IL-3 an ihr Medium ab, welches zentrifugiert, steril filtriert und bei -20°C aufbewahrt wurde.

Alle 2-3 Tage wurden die Zellzahl und Zellkonzentration der Zellkulturen mit dem Zellzählgerät *Vi-Cell XR* von *Beckman Coulter (USA)* bestimmt und entsprechend der Empfehlungen der *DSMZ* gesplittet. Beim Splitten wurde gegebenenfalls ein Teil der Zellkultur verworfen und durch frisches Medium ersetzt.

Zum Splitten adhärenenter Zellen wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS abgespült und mit 4 ml Trypsin abgelöst. Zur Inaktivierung des Trypsins wurde die doppelte

Menge Medium hinzugegeben. Die Zellkonzentration wurde bestimmt, die Zellsuspension bei 300 g für 5 min zentrifugiert und das Zellpellet entsprechend der Zellzahl in frischem Medium resuspendiert.

Einmal pro Woche wurden die Zellkulturen unter dem *Lichtmikroskop ID03* von *Carl Zeiss (Oberkochen)* kontrolliert. Mindestens alle 2 Wochen wurden die Zellkulturflaschen gewechselt.

2.2.2.2 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Ein bei -80 oder langfristiger bei -260°C gelagertes Kryoröhrchen mit gefrorenen Zellen wurde rasch im 37°C Wasserbad aufgetaut und die Zellsuspension in 10 ml Medium aufgenommen. Die Zellzahl wurde mithilfe des Vi-Cells bestimmt und die Zellen bei 300 g 5 min lang abzentrifugiert, um das Einfriermedium zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen entsprechend der Zellzahl in Medium resuspendiert und zunächst in einer 48-Well-Platte, dann in größeren Well-Platten und schließlich in Zellkulturflaschen expandiert.

Beim Einfrieren der Zellen wurden $4-5 \times 10^6$ Zellen in 1 ml Einfriermedium, bestehend aus 90% FBS und 10% DMSO, aufgenommen. Dieses wurde in einem *NuncTM* Kryoröhrchen von *Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)* bei -80°C in einem mit Isopropanol befüllten *Mr. FrostyTM* Einfriercontainer von *Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)* eingefroren. Für die langfristige Aufbewahrung wurden die Zellen nach einigen Tagen in Flüssigstickstoff eingelagert.

2.2.2.3 Bestimmung der Lebenszellzahl

Die Lebendzellzahl und Viabilität der Zellkulturen wurde zum Splitten alle 2-3 Tage und für Ansätze von Experimenten mit definierter Zellzahl mit dem Vi-Cell bestimmt. Dazu wurden 600 µl der Zellkultur in die Probenbehälter gegeben. Das Gerät misst die Zellzahl und Viabilität automatisiert mittels der Trypanblau-Ausschluss-Methode.

2.2.2.4 Mykoplasmentest

Alle 2 Wochen wurde mit den Zellkulturen ein Test auf Mykoplasmen mit dem *MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit* von *Lonza (Basel, CH)* durchgeführt. Dieser Test detektiert die Aktivität von mykoplasmatischen Enzymen, welche nicht in eukaryotischen Zellen vorkommen. Es wurde 1 ml der zu testenden Zellkultur entnommen und bei 100 g für 5 Minuten zentrifugiert. 25 µl des Überstands wurden zusammen mit 25 µl des Reagens in

eine *Corning™ Costar™ 96-Well-Feststoffplatte* pipettiert und für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Lumineszenz A mit dem *GloMax discover Luminometer* von *Promega (USA)* gemessen und die Zellsuspension mit 25 µl des Substrats für 10 min inkubiert. Währenddessen wandeln mykoplasmatische Enzyme ADP aus dem Substrat in ATP um, welches durch eine im Reagens enthaltene Luciferase in ein Lichtsignal umgewandelt wird und durch eine erneute Messung als Lumineszenz B erfasst wird. Der Test war negativ, wenn der Quotient zwischen den beiden Lumineszenzmessungen B/A kleiner 0.9 war. Im Falle eines positiven Tests wurde die Zellkultur entsorgt.

2.2.2.5 Durchflusszytometrie

Vor der Zellsortierung im Durchflusszytometer (fluorescence-activated cell sorting, FACS) wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 0.5 ml FACS-Puffer aufgenommen. Dieser enthält Propidiumiodid, welches tote Zellen anfärbt und dadurch im Zellsortierungsprozess erkennbar macht.

Die Durchflusszytometrie wurde angewandt, um transduzierte Zellen nach ihrem Fluoreszenzmarker zu sortieren oder um Einzelzellklone herzustellen.

2.2.2.6 Proliferationsassays

2.2.2.6.1 72 und 96 h Proliferationsassay

Bei den Proliferationsassays mit Ba/F3-Zellen wurden je 5×10^4 Zellen in 1 ml Ba/F3-Medium in die Wells einer 48-Well-Platte ausgesät. Dafür wurde die Zellkonzentration im Vi-Cell bestimmt, anschließend die Zellen für 5 min bei 300 g abzentrifugiert und in einem der Zellzahl angepassten Volumen frischen Mediums aufgenommen. Die Zellen wurden zu unterschiedlichen Konzentrationen der Zytostatika AraC (10-600 nM), 6-TG (5-600 nM) und DNR (0.5–8 nM) gegeben. Mit dem lichtinstabilen DNR wurde im Dunklen gearbeitet. Als Kontrollen wurden die Ba/F3-Zellen in reinem Medium und in Medium mit der höchsten im Assay verwendeten DMSO-Konzentration angesetzt.

Bei den K562-Zellen wurden pro Well 2×10^5 Zellen in 1 ml Medium ausgesät und sonst wie bei den Ba/F3-Zellen verfahren. Die verwendeten Zytostatikakonzentrationen lagen bei 8.3–1350 nM AraC, 250–1750 nM 6-TG und 5–80 nM DNR.

Für Versuche mit MONO-MAC-Zellen wurden pro Well 2×10^5 Zellen in 1 ml Medium angesetzt und AraC-Konzentrationen von 30-7290 nM verwendet.

Nach 72 oder 96 h Inkubationszeit bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen im Well durch Auf- und Abpipettieren gut vermischt und anschließend die Lebendzellzahl durch das Vi-Cell bestimmt.

Die Versuche wurden jeweils in Duplikaten und mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

2.2.2.6.2 *Langzeitproliferationsassay*

Um die Proliferation von Ba/F3- und K562-Zellen unter Zytostatikabehandlung über einen längeren Zeitraum zu untersuchen, wurden Proliferationsassays über 8 bzw. 14 Tage durchgeführt.

An Tag 0 wurden 5×10^4 Ba/F3- bzw. 2×10^5 K562-Zellen in 5 ml Medium unbehandelt oder in mit unterschiedlichen Konzentrationen der Zytostatika AraC und DNR oder mit 0.5 µg/ml Doxycyclin versetztem Medium ausgesät. Die Zellkonzentrationen wurden alle 2 Tage mit dem Vi-Cell bestimmt und die Zellkulturen anschließend abhängig von der Zelldichte 1:1.33 bis 1:20 gesplittet und erneut mit der entsprechenden Zytostatika- oder Doxycyclinkonzentrationen behandelt.

2.2.2.7 **IL3-Entzug**

Die IL-3-abhängigen Ba/F3-Zelllinien wurden normalerweise in Medium kultiviert, das durch den Zusatz von WEHI-Medium IL-3 enthält. Zur Untersuchung des Effekts des IL-3-Zusatzes auf die Proliferation verschiedener Ba/F3-Zelllinien wurde ein IL-3 Entzug durchgeführt.

Dazu wurden 2×10^5 Ba/F3-Zellen pro ml in 5 ml RPMI-Medium ausgesät. Parallel dazu wurde einem weiteren Ansatz 10 ng/ml rekombinantes IL-3 hinzugefügt. Nach 72 h wurde die Zellzahl und Viabilität der beiden Ansätze mit dem Vi-Cell bestimmt.

2.2.2.8 **Transiente Transfektion**

Transfektionen wurden mit HEK293T-Zellen entweder in einem 6-Well oder in einer Zellkulturschale mit 10 cm Durchmesser durchgeführt. Dazu wurden zunächst nachmittags 2×10^6 Zellen in 2 ml Medium in ein 6-Well bzw. 6.5×10^6 Zellen in 10 ml Medium in eine Zellkulturschale ausgesät. Am nächsten Vormittag wurde das Medium gewechselt und vier Stunden später die Transfektion durchgeführt. Die Konfluenz der Zellen betrug dabei 70-90%. Die Transfektion wurde entweder mit dem *Lipofectamine™ 3000 Transfection*

Reagent Kit von *Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)* nach Protokoll oder mit der $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -DNA-Kopräzipitationsmethode durchgeführt. Für die Kopräzipitation wurde 13 μg Plasmid zu 450 μl sterilem Wasser gegeben und anschließend 50 μl einer 2 M CaCl_2 -Lösung hinzugefügt und gemischt. Die vorbereitete DNA-Lösung wurde tröpfchenweise zu 500 μl phosphathaltigem HBS-Puffer gegeben und für 3-4 min bei Raumtemperatur inkubiert, wodurch DNA-Kalziumphosphat-Komplexe ausfielen. Diese wurden über die HEK293T-Zellen gegeben und konnten von ihnen auf diese Weise leichter durch Endozytose in die Zellen aufgenommen werden.

Bei beiden Transfektionsmethoden wurde das Medium am nächsten Vormittag erneut gewechselt und die Zellen 48-96 h nach der Transfektion lysiert.

2.2.2.8.1 Nukleofektion

Die Nukleofektionen wurden mit dem *Amaxa® Cell Line Nucleofector® Kit V* und dem *Nucleofector™ 2b Device* von *Lonza Group (Basel, CH)* nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Es wurden 0.5–2 μg DNA verwendet.

2.2.2.8.2 Stabile Nukleofektion mit PiggyBac-Vektor

Zur Herstellung eines weiteren Modells wurde in *KDM6A*-KO-Zelllinien stabil *KDM6A*-Wildtyp (*KDM6A*-WT) sowie die Demethylase-tote Mutante *KDM6A* H1146A^{18,19} re-exprimiert. Dazu wurde *KDM6A* in einen PiggyBac(PB)-Vektor kloniert.

K562 und THP-1 wurden mit dem *KDM6A*-PiggyBac-Vektor und der PiggyBac-Transposase nukleofiziert und inkubiert. Die genauen Nukleofektionsbedingungen sind Tabelle 12 zu entnehmen. Nach 72 h wurden die Zellen auf eine Konzentration von $0,3 \times 10^6$ Zellen pro ml verdünnt und mit 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Puromycin behandelt. Der PiggyBac-Vektor enthält eine Puromycinresistenzkassette, mit der Zellen, die den Vektor aufgenommen haben, selektiert werden können. 72 h nach der ersten Puromycinselektion wurde eine Einzelzellsortierung mithilfe der Durchflusszytometrie in V-Bottom-96-Well Platten durchgeführt.

In den einzelnen Wells wurden Zellklone herangezogen, die für weitere Experimente verwendet wurden. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen immer mit 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Puromycin kultiviert. Zur Induktion der *KDM6A*-Expression wurden 0.5–3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Doxycyclin verwendet.

Tabelle 12 Stabile Nukleofektion mit PiggyBac-Vektor

Zelllinie	vorgelegtes Medium	Zellzahl	Nukleofektionsprogramm	DNA-Menge
K562	1.5 ml	1x10 ⁶	T-16	2 µg
THP-1	1 ml	1x10 ⁶	U-001 / V-001	0.5 µg

2.2.2.9 Stabile Transduktion von Ba/F3-Zellen

Um die potenziellen KDM6A-Zielgene *SPARC*, *ENT1* und *NT5C2* zu charakterisieren, wurden stabile Ba/F3-Zelllinien generiert, die diese Gene als Wildtyp oder Mutanten überexprimieren. Dafür wurden retrovirale Transduktionen durchgeführt.

Als retroviraler Expressionsvektor wurde der Vektor MSCV-IRES-EYFP (pMIY) verwendet, in den das gene of interest kloniert wurde. Durch den Vektor wurde der Fluoreszenzmarker YFP exprimiert.

Zunächst wurden in Phoenix-ECO Zellen Retroviren produziert. Dazu wurden diese in einer 10 cm Zellkulturschale wie unter 2.2.2.8 beschrieben durch die Ca₃(PO₄)₂-DNA-Kopräzipitationsmethode mit dem retroviralen Expressionsvektor transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde die Transfektionseffizienz durch das YFP-Fluoreszenzsignal mit dem *Fluoreszenzmikroskop dMi8* von *Leica (Wetzlar)* überprüft. Der Überstand, in dem sich die produzierten Retroviren befanden, wurde abgenommen und mit einem 0,22 µm Filter filtriert. Das Filtrat wurde in einem 6-Well zu 1.5x10⁶ frisch aufgetauten Ba/F3-Zellen gegeben. Es wurden 10 µg/ml Protaminsulfat und 50 ng/ml IL-3 hinzugefügt und die Zellkulturplatte bei 31°C und 2500 rpm für 90 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C inkubiert und unter Zugabe von Ba/F3-Medium expandiert. 4-5 Tage nach der Transduktion wurden die Zellen nach YFP-Marker im Durchflusszytometer sortiert und erneut expandiert. Die Zellsortierung wurde nach einer Woche wiederholt.

2.2.2.10 Generierung von *KDM6A*-Knockdown und -Knockout-Zelllinien

K562 wurden zweimal für je 72 h mit einer siRNA gegen *KDM6A* (siKDM6A) bzw. der Kontrolle *scrRNA* nukleofiziert. Stabile K562 *KDM6A*-Knockdown-Zelllinien wurden durch lentivirale Transfektion mit shRNA gegen *KDM6A* wie zuvor beschrieben generiert¹⁶. Die K562 *KDM6A*-KO-Klone wurden wie bereits beschrieben CRISPR/Cas9-vermittelt erzeugt¹⁶. Die in dieser Arbeit untersuchten *KDM6A*-KD- und -KO-Zelllinien wurden im Rahmen eines Projekts aus der Arbeitsgruppe von Karsten Spiekermann von Stief, 2019¹⁶ etabliert und freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

2.2.2.11 Immunfluoreszenzfärbung

Die Methode der Immunfluoreszenzfärbung wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um ENT1 mithilfe eines mit einem fluoreszierenden Farbstoff markierten Antikörpers zu detektieren. Dafür wurde der dreifach FLAG-getagte Vektor CMV 3x N-FLAG ENT1 in Phoenix ECO-Zellen transient überexprimiert.

Zunächst wurden 6-Wells mit Deckgläsern ausgestattet und darauf Phoenix ECO-Zellen bis zu einer Konfluenz von 50% kultiviert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläser in 6-Wells mit 2% Formaldehyd in PBS als Fixationslösung transferiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Fixationslösung gegen PBS-T ausgetauscht und die Zellen mit 0.5% TritonX-100 in PBS für 10 min bei Raumtemperatur permeabilisiert.

Anschließend wurden die Zellen mit der Blockierlösung, 2% BSA in PBS-T, für 1 h bei Raumtemperatur in einem 6-Well geblockt, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Danach folgten Inkubationen von je 1 h bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper gegen FLAG 1:1000 in Blockierlösung in einer dunklen und feuchten Kammer und danach mit dem sekundären Antikörper Anti-mouse IgG (H+L), F(ab')₂ Fragment 1:500 in Blockierlösung. Des Weiteren wurde mit 1 µg/ml DAPI, einem DNA-Farbstoff, welcher die Zellkerne blau anfärbt, für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach den Inkubationen wurde jeweils dreimal mit PBS-T gewaschen.

Zuletzt wurden die Zellen zwischen dem Deckglas und einem trockenen Objektträger in *Fluorescence Mounting Medium* von *Agilent Technologies (Santa Clara, USA)* mit transparentem Nagellack fixiert. Die gefärbten Zellen wurden unter dem *Fluoreszenzmikroskop dMi8* von *Leica (Wetzlar)* betrachtet.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Herstellung von Zelllysaten

Um Proteine mit der SDS-PAGE auftrennen und im Western-Blot nachweisen zu können, wurden von mindestens 3×10^6 Zellen Ganzzelllysate hergestellt. Die Proteinisolation fand auf Eis statt, um den Proteinabbau durch Proteasen zu minimieren. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend je nach Größe des Zellpellets mit 30–150 µl Lysispuffer für mindestens 30 min bei 4°C auf einem Drehrad lysiert. Die unlöslichen Zellfragmente wurden anschließend für 30 min bei 4°C und 16000 g mit der *Zentrifuge 5424R* von *Eppendorf (Hamburg)* abzentrifugiert und die im Überstand gelösten Proteine in Aliquots bei –20°C aufbewahrt.

2.2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Methode nach Bradford wurde verwendet, um die Proteinkonzentration der Zellysate zu bestimmen. Hierfür wurde entsprechend des Protokolls von *Bio-Rad Laboratories (USA)* die Absorption der Bradford-Lösung *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate* im Photometer *BioPhotometer 6131* von *Eppendorf (Hamburg)* bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Die Lysate wurden 1:10 mit H₂O auf 20 µl und anschließend 1:50 mit 980 µl 1:5 verdünnter Bradford-Lösung gemischt und in die Messküvetten gegeben. Die Messung der Extinktion fand gegen H₂O als Leerwert statt. Die Proteinkonzentration wurde automatisch errechnet durch Auftragen gegen eine zuvor mit unterschiedlich konzentrierten BSA-Lösungen (200-1000 µg/ml) erstellte Eichkurve.

2.2.3.3 SDS-PAGE

Mit der Methode SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) können Proteine in einem elektrischen Spannungsfeld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. SDS dient dabei der Denaturierung der Proteine und der Abschirmung ihrer Ladungen, die die Laufgeschwindigkeit beeinflussen und so verhindern würden, dass die Proteine ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Die Gele wurden in *NovexTM Gelkassetten* von *Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)* gegossen. Je nach Molekulargewicht des untersuchten Proteins wurden 8-12%ige Trenngele verwendet. Zunächst wurde das Trenngel in einem Falcon angesetzt, in die Kassette gegossen und mit Isopropanol abgedeckt, um eine gerade Trennlinie zu schaffen und den Kontakt zum Luftsauerstoff zu verhindern. Nach 30 min wurde das Isopropanol vom fest gewordenen Trenngel abgegossen, das Sammelgel aufgegossen und ein Probenkamm eingesetzt. Nach weiteren 30 min Trocknungszeit wurde das Gel in eine *Xcell SureLock Mini Cell Gelelektrophoresekammer* von *Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)* eingesetzt oder feucht bis zu einer Woche lang bei 4°C gelagert.

Von den Proteinlysaten wurde jeweils die gleiche Masse (20-150 µg) entsprechend der im Bradford gemessenen Proteinkonzentration verwendet, mit H₂O auf das gleiche Volumen von 12–24 µl gebracht und mit 4xLämmli vermischt. Anschließend wurden die Lysate bei 95°C für 5 min im *Thermomixer 5350* von *Eppendorf (Hamburg)* denaturiert.

Die Elektrophoresekammer wurde mit Gelelektrophorese-Puffer befüllt und die Lysate sowie ein Proteinleiter wurden in die Geltaschen geladen. Die Spannung wurde während der Passage des Sammelgels auf 70 V und anschließend auf 110 V angelegt, bis die Proteine

über das gesamte Gel aufgetrennt waren und die Lämmli-Bande am unteren Rand des Gels erkennbar war.

Trenngel (z.B. 12%):

H ₂ O	1.6 ml
Acrylamid-Mix 30%	2.0 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3 ml
SDS 10%	0.05ml
Ammoniumpersulfat 10%	0.05 ml
TEMED	0.002 ml

Sammelgel:

H ₂ O	1.4 ml
Acrylamid-Mix 30%	0.33 ml
1.0 M Tris (pH 6.8)	0.25 ml
SDS 10%	0.02 ml
Ammoniumpersulfat 10%	0.02 ml
TEMED	0.002 ml

2.2.3.4 Western-Blot

Die mit der SDS-PAGE im Elektrophoresegel aufgetrennten Proteine wurden mittels Tank-Blot-Elektrotransfer bei 4°C über Nacht bei einer konstanten Stromstärke von 100 mA auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Am folgenden Morgen wurde die Stromstärke für 1 h auf 200 mA erhöht. Es wurden mit Transferpuffer gefüllte Transblotkammern von *Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)* verwendet. Das Gel wurde dazu auf die Nitrozellulosemembran gebracht und zwischen je zwei Filterpapieren und je einem Schwamm auf beiden Seiten in einen Western-Blot-Schlitten gepresst.

Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulosemembran in 5-10 ml 5% Magermilch in TBS-T für 60-90 min bei Raumtemperatur in einem Falcon auf dem Rollenmischer *RS-TR05* von *Phoenix Instrument (Garbsen)* geblockt, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper in entsprechender Verdünnung (siehe Tabelle 5) in 5% Milch in TBS-T für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde sie dreimal für 10 min auf einer Schüttelplatte *Ika SA 260 basic* von *Merck (Darmstadt)* mit TBS-T gewaschen, um die ungebundenen Antikörper zu entfernen, und nach der gleichen Methode mit dem passenden sekundären Antikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die Membran für 2 min im Dunkeln mit der Entwicklerlösung *Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate* von *Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)* inkubiert und in der Entwicklermaschine *Fusion SL* von *Vilber (Eberhardzell)* belichtet. Das

Chemilumineszenzsignal weist die Aktivität eines an die sekundären Antikörper gekoppelten Enzyms und damit indirekt die daran gebundenen primären Antikörper und Proteine nach.

Nach dreimaligem Waschen wurde die Membran wie oben dargestellt mit einem Antikörper für eine Ladungskontrolle passender Molekulargröße (β -Actin oder α -Tubulin) inkubiert. Durch die Ladungskontrolle war ein relativer Vergleich der Proteinexpressionen möglich. Falls es die Größenunterschiede zwischen dem auf der Membran darzustellenden Protein und der verwendeten Ladungskontrolle erlaubt haben, wurde die Membran geschnitten und parallel mit den unterschiedlichen Antikörpern inkubiert.

Zur Quantifizierung der Proteinexpression wurde die Software *Image J* verwendet.

2.2.3.5 Immunpräzipitation & Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie wurde durchgeführt, um Interaktionspartner von KDM6A zu identifizieren und zu untersuchen, ob verschiedene *KDM6A*-Mutationen einen Einfluss auf die Bindung zu den Interaktionspartnern haben.

Hierfür wurden zunächst verschiedene pcDNA6-Vektoren hergestellt, die unterschiedliche Konstrukte von *KDM6A* und jeweils ein HA-Tag enthielten. Neben dem *KDM6A*-Wildtyp wurden der N-terminale (Q880X) und der C-terminale Teil (880-1401) separat exprimiert, um Hinweise auf die Bindungslokalisation der *KDM6A*-Bindungspartner zu erhalten. Außerdem wurden drei in AML-Patientinnen identifizierte *KDM6A*-Mutanten E1325X, L1103R und V1113Sfs*38⁵¹ in die Vektoren kloniert.

2.2.3.5.1 Immunpräzipitation

HEK293T-Zellen wurden in 10 cm Zellkulturschalen mit den verschiedenen *KDM6A*-Konstrukten transfiziert und zelluläre Lysate hergestellt. Als Kontrolle diente ein HA-GFP-Konstrukt.

Mit den Lysaten wurde zur Kontrolle der Proteinexpression zunächst eine SDS-Gelelektrophorese durchgeführt. Nach Bestätigung einer ausreichenden Expression der verschiedenen *KDM6A*-Konstrukte wurde mit den Lysaten eine Immunpräzipitation (IP) mit 40 μ l *Pierce*® *Anti-HA Agarose* von *Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)* nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Dabei handelt es sich um Beads, die an einen HA-Antikörper gekoppelt sind und das überexprimierte HA-getagte *KDM6A* binden. Auf diese Weise sollte kein endogenes *KDM6A* detektiert werden.

Um Detergenzien und unspezifische Bindungspartner zu entfernen, wurde dreimal mit 800 μ l 50 mM Tris (pH 8) gewaschen, zentrifugiert und möglichst viel Überstand verworfen. Nach dem letzten Waschvorgang wurden die Beads in ein sauberes Eppendorfgefäß überführt und auf Eis transportiert.

Die Vorbereitung und Durchführung der Massenspektrometrie fand im Zentrallabor für Proteinanalytik der LMU mit dort gestellten Reagenzien statt.

Dabei wurden zwei verschiedene Protokolle verwendet. Protokoll 1 wurde für die Analyse von KDM6A-WT vs. GFP-Kontrolle verwendet. Protokoll 2 wurde mit allen oben genannten KDM6A-Konstrukten und GFP-Kontrolle durchgeführt.

2.2.3.5.2 Massenspektrometrie Protokoll 1:

Zunächst wurden 200 μ l 8 M Urea zu 100 μ l Proteineluat hinzugefügt. Anschließend wurde Tris(2-Carboxyethyl)phosphinhydrochlorid (TCEP) in 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat (NH_4HCO_3) für eine Konzentration von 5 mM hinzugegeben und zentrifugiert (20 min, 37 °C, 1000 rpm). Nach der Zugabe von 10 mM Chloracetamid wurde erneut zentrifugiert (40 min, 37 °C, 1000 rpm). Lysyl-Endopeptidase 0.4 μ g/ μ l in 50 mM NH_4HCO_3 wurde im Verhältnis Enzym:Protein 1:50 hinzugegeben und zentrifugiert (2 h, 37 °C, 1000 rpm). Anschließend wurde 1400 μ l 50 mM NH_4HCO_3 bis zu einer finalen Ureakonzentration unter 1 M und Trypsin im Verhältnis Enzym:Protein 1:50 hinzugegeben. Die Peptide wurden über Nacht zentrifugiert (37 °C, 1000 rpm) und am nächsten Morgen zur Beendigung des Verdaus mit Trifluoressigsäure (TFA) versetzt, bis eine Endkonzentration von 0.1% erreicht war. Die Pipettenspitzen wurden mit je 2 Schichten C18-Matrix gestopft und durch Beladung und Zentrifugation (1000 g, 1-2 min) mit 50 μ l Methanol, 50 μ l Puffer B und zweimal 50 μ l Puffer A äquilibriert. Anschließend wurden die Peptide durch Zugabe von TFA bis zu einer Konzentration von 0.1 - 1% angesäuert. Die C18-Säulen wurden mit den Peptiden beladen und diese langsam durch Zentrifugation (200 g, 15 min) filtriert. Anschließend wurde mit 100 μ l Puffer A gewaschen und die Peptide mit zweimal 30 μ l Puffer B eluiert. Zuletzt wurde eine Speedvac-Konzentrierung durchgeführt, bis das Volumen auf 1 μ l reduziert war, und dieses in Puffer C resuspendiert.

Verwendet wurden folgende Puffer:

- Puffer A: 0.5% Ameisensäure (FA) in H_2O
- Puffer B: 80% Acetonitril (ACN), 0.5% FA
- Puffer C: 2% ACN, 0.1% TFA

2.2.3.5.3 Massenspektrometrie Protokoll 2:

Zur Vorbereitung des Verdau wurden zu den Beads zunächst 100 µl 2 ng/µl Trypsin in 1 M Urea 50mM NH₄HCO₃ gegeben und geschüttelt (30 min, 25°C, 1400 rpm). Anschließend wurden die Beads abzentrifugiert (1 min, 1000 rpm) und der Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß gegeben. Die Beads wurden zweimal mit 40 µl 50 mM NH₄HCO₃ gewaschen und der Überstand jeweils im Eppendorf gesammelt. Anschließend wurde ein entsprechendes Volumen von 100 mM DTT hinzugegeben, um eine Endkonzentration von 1 mM DTT zu erreichen. Der Verdau wurde über Nacht fortgeführt (25°C, 500 rpm).

Am nächsten Morgen wurden 3µl 130 mM Iodacetamid hinzugegeben und im Dunkeln inkubiert (30 min, 25°C). Anschließend wurden 2 µl 1M DTT hinzugefügt, erneut inkubiert (10 min, 25°C) und 6 µl TFA hinzugegeben. StageTips wurden mit je 2 Schichten SDB-RPS-Säulen (3M Empore PN 2241) gestopft und die Schichten durch Zentrifugation zusammengepresst (5 min, 14000 g). Danach wurden die Membranen entsalzt, indem sie mit je 50 µl Puffer A, B und C nacheinander beladen und zentrifugiert (2 min, 3000 g) wurden. Anschließend wurden die StageTips zweimal mit den Proben beladen und zentrifugiert (erst 50 min, dann 20 min lang, bei jeweils 1000 g und zum Schluss bei maximaler Geschwindigkeit).

Die StageTips wurden mit je 100 µl SDB-RPS Waschpuffer 1 und 2 gewaschen und zentrifugiert (5 min, 500 g). Die Eluation erfolgte mit 60 µl frisch hergestellten Eluationspuffer in ein frisches Eppendorf-Gefäß durch Zentrifugation (5 min, 500 g).

Danach wurde eine SpeedVac-Konzentrierung bei 42°C durchgeführt, bis die Peptide komplett trocken waren. Diese wurden durch Sonifizierung mit 15 µl MS-Ladungspuffer für 5 min im Wasserbad resuspendiert, in die Massenspektrometrie-Container überführt und bei -20°C bis zur Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS) aufbewahrt.

Verwendete Puffer:

Puffer A 100 % Acetonitril (ACN)

Puffer B 30% Methanol

Puffer C 0.2% TFA

SDB-RPS Waschpuffer 1 (99% Isopropanol, 1% TFA)

SDB-RPS Waschpuffer 2 (0.2% TFA)

Eluationspuffer 80% ACN, 1.25% NH₄OH (25%, HPLC grade)

MS-Ladungspuffer 2% ACN, 0.3% TFA

2.2.4 Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse sind, sofern nicht anders angegeben, Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Signifikanzen wurden mithilfe des ungepaarten, zweiseitigen t-Tests und IC₅₀-Werte mit der Software *GraphPad Prism* berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Identifikation von potenziellen KDM6A-Zielgenen

Um die durch KDM6A regulierten Zielgene zu identifizieren, die für die KDM6A-vermittelte Zytostatikaresistenz verantwortlich sein könnten, wurde eine genomweite RNA-Expressionsanalyse (RNA-Seq) mit verschiedenen *KDM6A*-KD und -KO-Verfahren durchgeführt^{16,51}. Es wurden MM-1 mit MM-6 verglichen, wobei diese Geschwisterzelllinien aus dem peripheren Blut eines Patienten mit rezidivierter AML etabliert wurden¹⁰⁶. Interessanterweise exprimiert MM-6 im Vergleich zu MM-1 aufgrund einer zusätzlichen KDM6A-Exondeletion kein KDM6A^{45,53} bei einem sonst identischen Mutationsprofil¹⁶.

Außerdem wurden K562-Zellen untersucht, die mit siRNA oder shRNA gegen *KDM6A* transfiziert wurden. Die K562 sh*KDM6A*-Zellen wurden zusätzlich unter Behandlung mit 150 nM AraC 72 h vor der RNA-Seq untersucht.

Unter den im *KDM6A*-KD differenziell regulierten Genen wurden die beiden Gene *ENT1* und *NT5C2*, welche bereits bekannte Funktionen im AraC-Metabolismus haben, zur näheren Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit ausgewählt. *ENT1* wurde durch *KDM6A*-KD und in MM-6-*KDM6A*-KO-Zellen herunterreguliert, während *NT5C2* hochreguliert wurde. Als drittes potenzielles KDM6A-Zielgen wurde *SPARC* ausgewählt. *SPARC* wurde im *KDM6A*-KD und -KO herunterreguliert. Die AraC-Behandlung führte zu weiteren differenziell regulierten Genen im Vergleich zu den unbehandelten K562 sh*KDM6A* #7¹⁶, wobei die Herunterregulation von *SPARC* und *ENT1* bestehen blieb. *NT5C2* wurde allerdings in den Analysen von K562 si*KDM6A* und den AraC-behandelten K562 sh*KDM6A* #7 nicht detektiert.

Tabelle 13 Differenzielle Regulation von potenziellen KDM6A-Zielgenen im *KDM6A*-Knockdown

Gen	MM-6 vs. MM-1	K562 si <i>KDM6A</i> vs. si <i>SCR</i>	K562 sh <i>KDM6A</i> #7 vs. sh <i>GFP</i>	K562 sh <i>KDM6A</i> #7+AraC vs. sh <i>Renilla</i> +AraC
NT5C2	1.17	-	1.20	-
SPARC	-0.72	-0.79 ¹⁶¹	-1.30 ¹⁶¹	-0.98
ENT1	-0.76 ¹⁶	-0.49 ¹⁶¹	-0.75 ¹⁶¹	-1.10

Log₂ fold change für die drei ausgewählten potenziellen KDM6A-Zielgene NT5C2, SPARC und ENT1 in MM-6 (*KDM6A*-KO) verglichen mit MM-1 (*KDM6A*-WT), *KDM6A* si*KDM6A* und K562 sh*KDM6A* verglichen mit jeweiligen Kontrollzellen und für mit 150 nM AraC 72 h lang behandelte K562 sh*KDM6A* #7 verglichen mit AraC-behandelten Kontrollzellen, letztere jeweils verglichen mit unbehandelten Zellen. Einige der Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht in Stief, 2019¹⁶. n = 6, p<0,05.

3.2 NT5C2

3.2.1 NT5C2-Expression in Abhängigkeit von der KDM6A-Expression

Bei vorausgegangenen RNA-Sequenzierungsanalysen konnte gezeigt werden, dass die Nukleotidase *NT5C2* in K562 *shKDM6A* #7 im Vergleich zur Kontrolle K562 *shGFP* sowie in MM-6 im Vergleich zu MM-1 auf RNA-Ebene hochreguliert wird.

Die stärkere Expression von *NT5C2* in MM-6 verglichen mit MM-1 konnte im Western-Blot auf Proteinebene bestätigt werden (Abbildung 4a). Bei einer Western-Blot-Analyse der *NT5C2*-Proteinexpression in verschiedenen K562 *shKDM6A*-KD-Zelllinien #3, #4, #7 und dem K562 *KDM6A*-KO-Klon #2 wurde im Vergleich zu den Kontrollen K562 *shRenilla*, *shGFP* und zu K562 nativ jedoch keine differenzielle Expression festgestellt (Abbildung 4b).

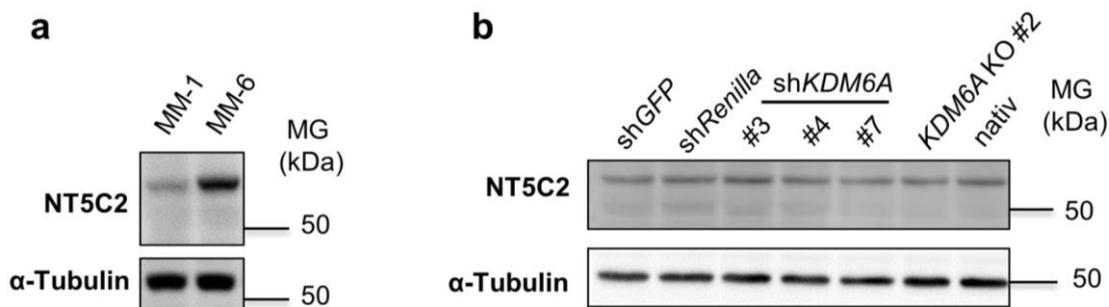


Abbildung 4 NT5C2-Expression im *KDM6A*-Knockdown und -Knockout. **a**, *NT5C2* ist stärker exprimiert in der *KDM6A*-KO-Zelllinie MM-6 als in der *KDM6A*-WT Schwesterzelllinie MM-1. α -Tubulin wurde im Western-Blot als Ladungskontrolle verwendet. MG, Molekulargewicht. **b**, *NT5C2*-Expression in K562 im Western-Blot; K562 nativ, *shGFP*, *shRenilla* sowie drei verschiedene K562 *shKDM6A* #3, #4, #7 und ein K562 *KDM6A*-KO-Klon wurden aufgetragen. K562 wurden lentiviral mit drei verschiedenen *shKDM6A* #3, #4 und #7 transduziert; *shRenilla* und *shGFP* dienen als Kontrollen MG, Molekulargewicht; α -Tubulin, Ladungskontrolle.

3.2.2 Effekt von *NT5C2*-Überexpression auf die Zytostatikaresistenz und Proliferationsgeschwindigkeit

Um *NT5C2* funktionell zu untersuchen, wurden *NT5C2* WT und die Gain-of-Function(GOF)-Mutante *NT5C2* R367Q^{70,71} in Ba/F3-Zellen durch retrovirale Transduktion stabil überexprimiert. Dabei wurde *NT5C2* WT etwa 3.4-mal so stark exprimiert wie *NT5C2* R367Q (Abbildung 5a). Die endogene *NT5C2*-Expression in Ba/F3-Zellen wurde als schwächere Bande detektiert.

Die Ba/F3-Zellen wurden für 72 h mit unterschiedlichen Konzentrationen der Zytostatika AraC und 6-TG behandelt. Abbildung 5b zeigt, dass die *NT5C2*-überexprimierenden Zellen unter AraC-Behandlung im Vergleich zu den Leervektor exprimierenden Kontrollzellen Ba/F3 pMIY nicht signifikant unterschiedlich proliferierten. Die Behandlung mit 6-TG bestätigte die bereits beschriebene erhöhte Resistenz von *NT5C2* R367Q-

überexprimierenden Zellen gegenüber 6-TG^{70,71} (Abbildung 5c) und zeigte zusätzlich eine geringer ausgeprägte 6-TG-Resistenzhöhung durch NT5C2 WT-Überexpression.

Basierend auf diesen Proliferationsassays wurde die mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) nach 72 h für AraC und 6-TG berechnet. Die IC₅₀ ist bei den NT5C2-überexprimierenden Ba/F3 für AraC leicht und für 6-TG stark erhöht: Ba/F3 NT5C2 WT ist 1.6-fach resistenter als Ba/F3 pMIY und Ba/F3 NT5C2 R367Q ist 9.1-fach resistenter als Ba/F3 pMIY gegen 6-TG (Abbildung 6).

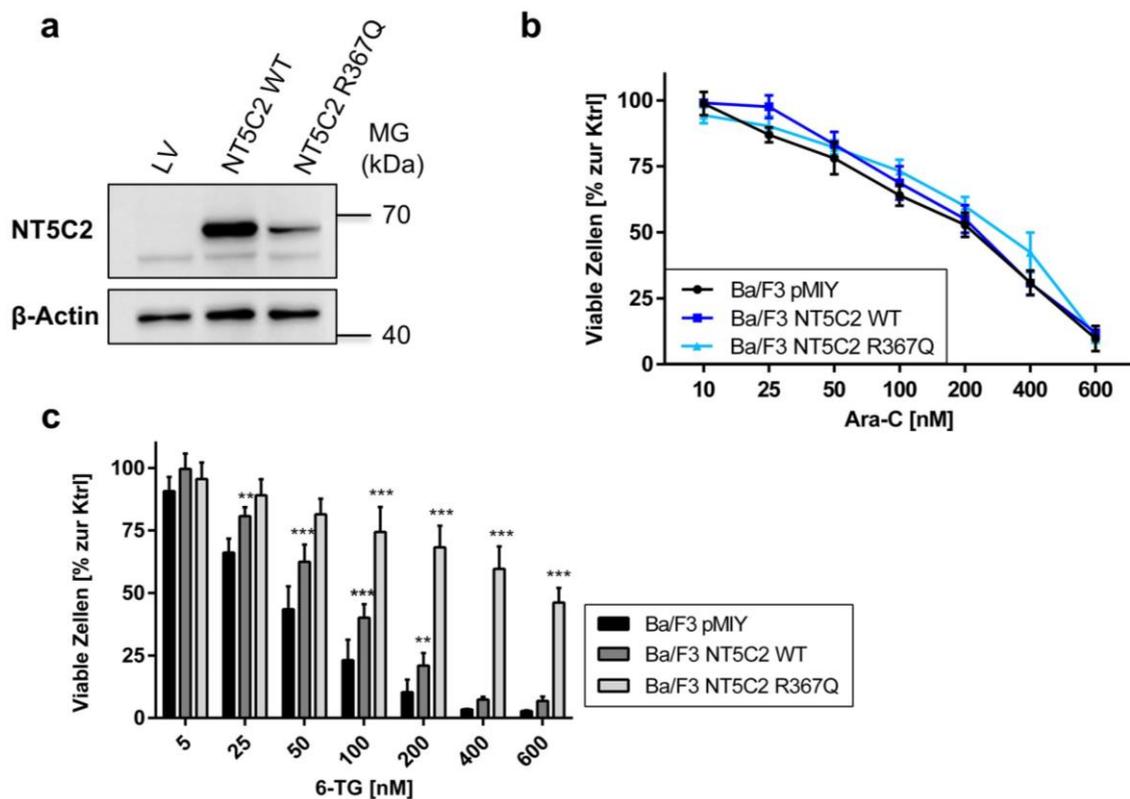


Abbildung 5 Proliferationsassays mit NT5C2-überexprimierenden Ba/F3-Zellen zeigen erhöhte Resistenz gegen 6-TG, aber nicht gegen AraC. **a**, Western-Blot zeigt Überexpression von NT5C2 WT und der GOF-Mutante NT5C2 R367Q in Ba/F3 durch retrovirale Transduktion. Die schwache Bande zeigt die endogene NT5C2-Expression auch in den Leervektor-Zellen (LV). Ladungskontrolle β -Actin; MG, Molekulargewicht. **b**, **c**, Ba/F3 pMIY, NT5C2 WT und NT5C2 R367Q wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen AraC (**b**) und 6-TG (**c**) für 72 h behandelt. Gezeigt werden Mittelwerte $M \pm$ Standardabweichung SD von fünf (**b**) bzw. sechs (**c**) unabhängigen Versuchen. Ungepaarter, zweiseitiger t-Test; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

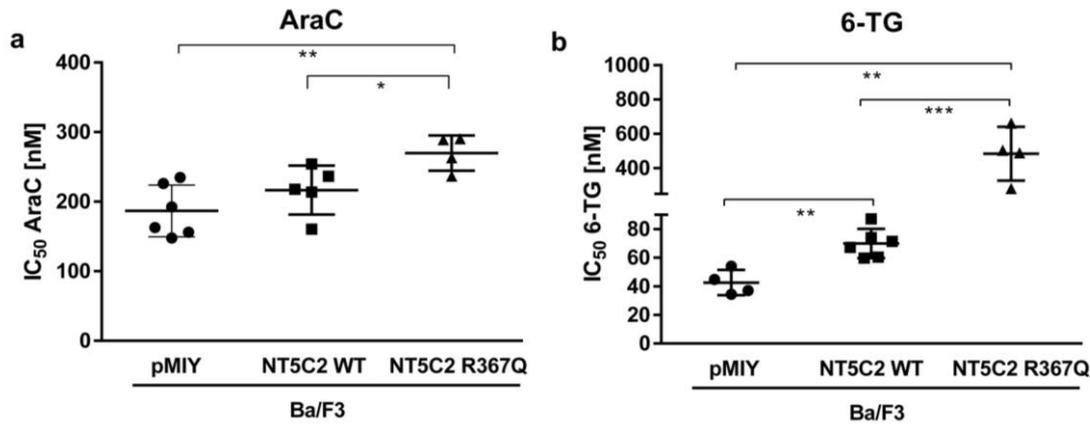


Abbildung 6 IC₅₀-Werte von NT5C2-überexprimierenden Ba/F3-Zellen für AraC und 6-TG nach 72 h. **a, b**, Mittlere IC₅₀-Werte zugehörig zu den Proliferationsassays in Abbildung 5b, c werden gezeigt. Ungepaarter, zweiseitiger t-Test; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

Außerdem wurde untersucht, ob die NT5C2-Überexpression bei wiederholter AraC-Behandlung über einen längeren Zeitraum einen Effekt auf die AraC-Sensitivität hat. Da AML-Induktionsbehandlungen normalerweise über 7 (7+3-Schema) bzw. 8-10 Tage (TAD-Schema)^{107,108} durchgeführt werden, modellieren diese Langzeitproliferationsassays die physiologische Situation bei der AML-Behandlung besser als die 72 h-Proliferationsassays. Es wurden Proliferationsassays über einen Zeitraum von 8 Tagen durchgeführt. Die Zellen wurden alle 2 Tage gezählt, gesplittet und mit 100 nM AraC behandelt. Die NT5C2-überexprimierenden Zellen proliferierten unbehandelt langsamer als die Leervektor-Kontrolle, wobei der Effekt für die Mutante stärker war und durch AraC-Behandlung abgeschwächt wurde. Auch bei längerer Behandlung wurde bei Ba/F3 NT5C2 WT und R367Q keine veränderte AraC-Resistenz festgestellt (Abbildung 7).

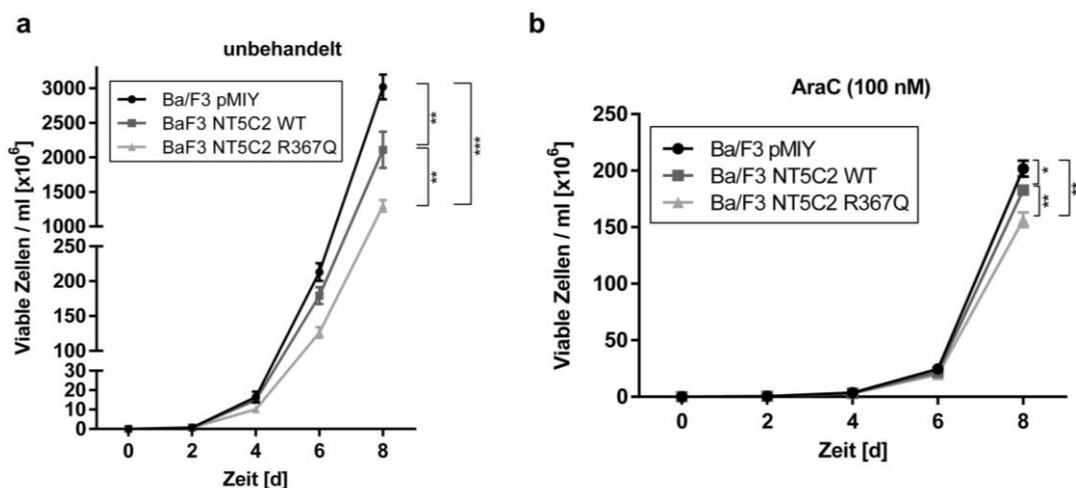


Abbildung 7 NT5C2-überexprimierende Ba/F3-Zellen zeigen verlangsamtes Wachstum über 8 Tage. **a, b**, Langzeitproliferationsassays wurden über einen Zeitraum von 8 Tagen durchgeführt. Die Zellzahl wurde alle 2 Tage unbehandelt (**a**) oder unter Zugabe von 100 nM AraC (**b**) bestimmt und dementsprechend gesplittet. $M \pm SD$ von drei unabhängigen Versuchen. Ungepaarter, zweiseitiger t-Test; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

3.3 SPARC

3.3.1 SPARC-Expression in Abhängigkeit von der KDM6A-Expression

Die RNA-Sequenzierungsdaten zeigten, dass SPARC im *KDM6A*-KD (K562 *shKDM6A* #7 vs. *shGFP* und K562 *siKDM6A* vs. *siSCR*) herunterreguliert wurde. Dies konnte auf RNA-Ebene in der qRT-PCR-Analyse (Abbildung 8a) sowie auf Proteinebene im Western-Blot für K562 (Abbildung 8b) bestätigt werden. Die Stärke der SPARC-Expression bei den verschiedenen K562 *shKDM6A* korrelierte mit der *KDM6A*-Expression: Die stärkste SPARC-Herunterregulation auf RNA- und Proteinebene fand sich im *KDM6A*-KO-Klon #2 und bei K562 *shKDM6A* #7. Bei K562 *shKDM6A* #7 wurde auch der stärkste *KDM6A*-KD um 90% erreicht⁵¹. Interessanterweise wurde auch beobachtet, dass *SPARC* auf RNA-Ebene unter Vorbehandlung mit 150 nM AraC für 72 h hochreguliert wurde (Abbildung 8a).

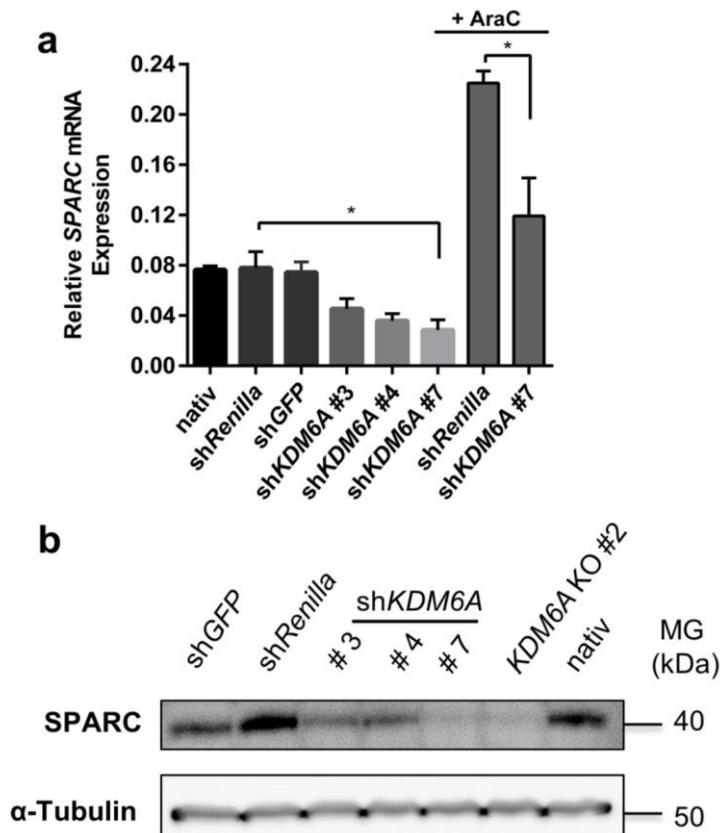


Abbildung 8 SPARC-Expression wird im *KDM6A*-Knockdown und -Knockout herunterreguliert. **a, b**, Korrespondierende qRT-PCR- (**a**) und Western-Blot- (**b**) Daten zeigen herunterregulierte SPARC-Expression auf RNA- (**a**) und Proteinebene (**b**) in K562 *shKDM6A*-KD-Zellen. *shRenilla* und *shGFP* als Kontrollen sowie drei verschiedene K562 *shKDM6A*-KD (#3, #4, #7) wurden untersucht. **a**, K562 *shRenilla* und *shKDM6A* #7 wurden zusätzlich für 72 h mit 150 nM AraC behandelt. $M \pm SD$ der *SPARC*-RNA relativ zur *GAPDH*-Expression wird von zwei unabhängigen Versuchen dargestellt. Ungepaarter, zweiseitiger t-Test; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. **b**, Ein K562 *KDM6A*-KO-Klon wurde mit aufgetragen. α -Tubulin dient als Ladekontrolle; MG, Molekulargewicht.

3.3.2 Effekt von SPARC-Überexpression auf die Zytostatikaresistenz und Proliferationsgeschwindigkeit

Zu NT5C2 korrespondierende funktionelle Untersuchungen wurden auch für SPARC durchgeführt. In Ba/F3-Zellen wurde SPARC-WT durch retrovirale Transduktion überexprimiert. Im Western-Blot ist eine Doppelbande erkennbar (Abbildung 9a).

In den 72 h Proliferationsassays zeigte sich kein Effekt der SPARC-Überexpression auf die Resistenz gegen die Zytostatika AraC, 6-TG und DNR (Abbildung 9b-d).

Auch bei der Langzeitbehandlung mit AraC, DNR oder im unbehandelten Versuchsansatz über 14 Tage proliferierten Ba/F3 SPARC nicht signifikant unterschiedlich zu Leervektor-Kontrollzellen (Abbildung 10).

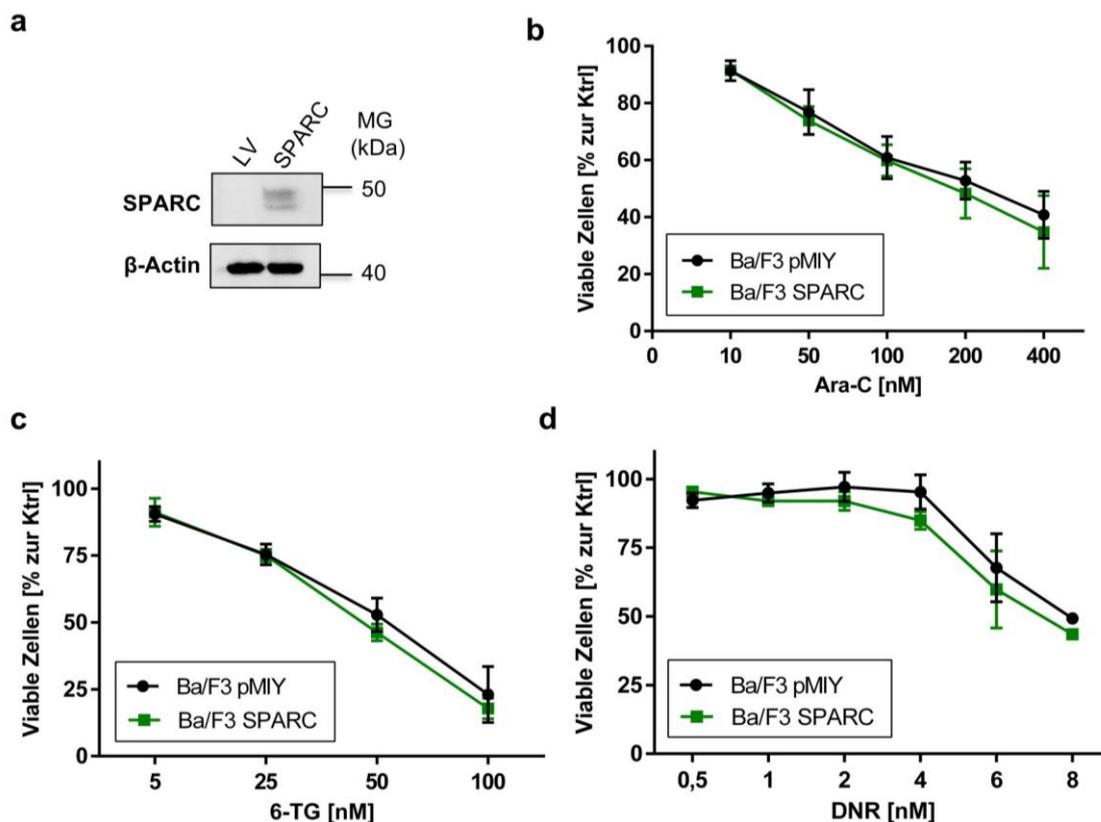


Abbildung 9 SPARC-Überexpression in Ba/F3-Zellen führt zu keinem veränderten Phänotyp hinsichtlich der AraC-, 6-TG- und DNR-Resistenz. **a**, Western-Blot zeigt SPARC-Expression in Ba/F3 Zellen, die mit Leervektor (LV) pMIY bzw. pMIY-SPARC retroviral transduziert wurden. Ladungskontrolle β-Actin; MG, Molekulargewicht. **b**, **c**, **d**, Proliferationsassays über 72 h; Ba/F3 pMIY und Ba/F3 pMIY-SPARC wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen AraC (**b**), 6-TG (**c**) und DNR (**d**) behandelt. $M \pm SD$ von drei unabhängigen Versuchen. Ungepaarter, zweiseitiger t-Test; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

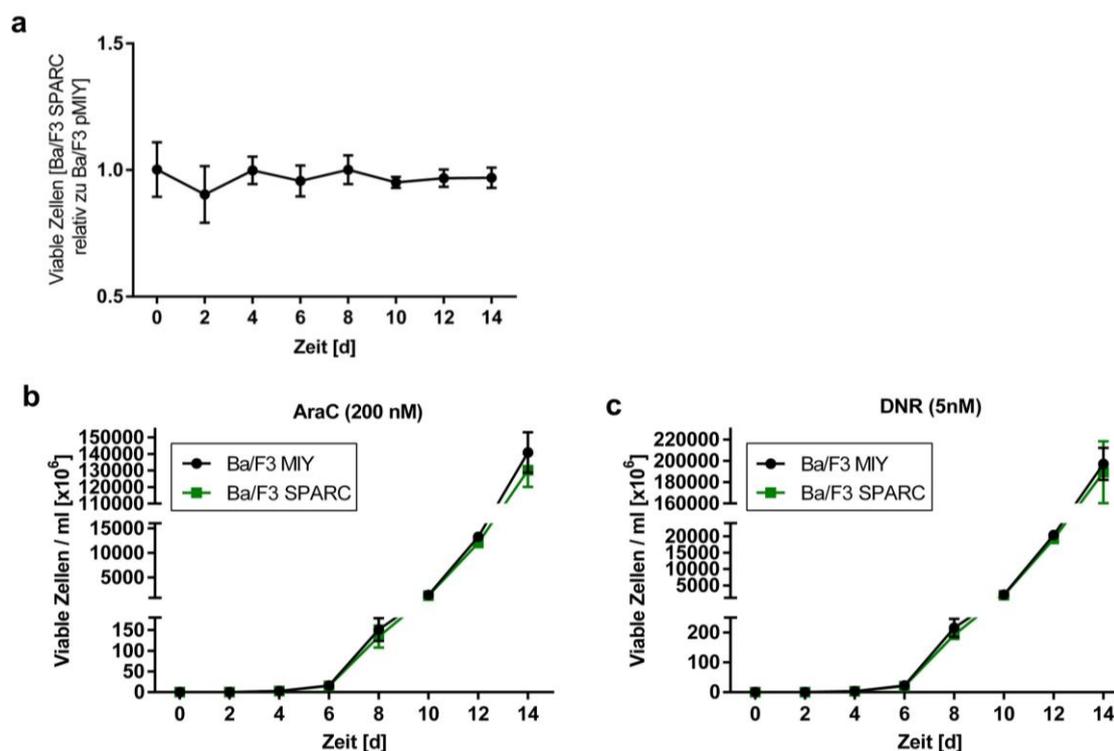


Abbildung 10 Langzeitproliferation von Ba/F3 pMIY und Ba/F3 SPARC über 14 Tage. a-c, Zellen wurden über 14 Tage alle 2 Tage nicht behandelt (a), mit 200 nM AraC (b) oder 5 nM DNR (c) behandelt, gezählt und entsprechend gesplittet. Gezeigt werden $M \pm SD$ von sechs (a) bzw. vier (b, c) unabhängigen Versuchen. Ungepaarter, zweiseitiger t-Test; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

3.4 ENT1

3.4.1 ENT1-Expression in Abhängigkeit von der KDM6A-Expression

In den RNA-Sequenzierungsdaten war *ENT1* im *KDM6A*-KD (K562 si*KDM6A* vs. si*SCR* und K562 sh*KDM6A* #7 vs. sh*GFP*) sowie *KDM6A*-KO (MM-6 vs. MM-1) herunterreguliert. qRT-PCR-Ergebnisse für verschiedene sh*KDM6A* bestätigten geringere RNA-Level für *ENT1* in *KDM6A*-KD K562-Zellen. Außerdem konnte ein Trend zur Hochregulation der *ENT1*-RNA nach 72 h Behandlung mit 150 nM AraC festgestellt werden, der allerdings statistisch nicht signifikant war. (Abbildung 11a).

Des Weiteren konnte die geringere *ENT1*-Expression in K562 sh*KDM6A*-KD-Zellen auf Proteinebene bestätigt werden. Auch bei *ENT1* wurde der stärkste KD auf RNA- und Proteinebene mit dem stärksten *KDM6A*-KD bei sh*KDM6A* #7 erreicht. Ebenfalls konnte eine geringere *ENT1*-Proteinexpression in MM-6 (*KDM6A*-KO) als in MM-1 (*KDM6A*-WT) gezeigt werden (Abbildung 11b).

Eine weitere Western-Blot-Analyse zeigte eine herunterregulierte *ENT1*-Proteinexpression in zwei K562 *KDM6A*-KO-Klonen #1 und #2 verglichen mit K562 nativ oder zwei *KDM6A*-WT-Klonen #1 und #2 (Abbildung 11c).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse für K562 und MONO-MAC eine konsistente Korrelation der ENT1-Expression mit der KDM6A-Expression.

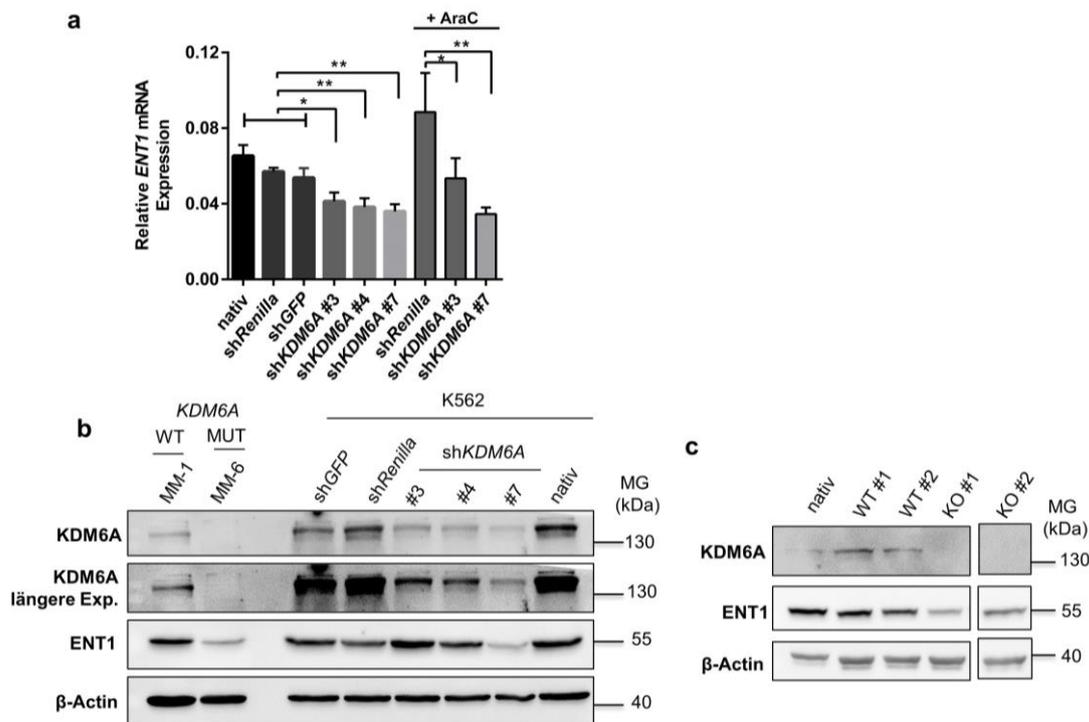


Abbildung 11 ENT1-Expression wird im *KDM6A*-Knockdown und -Knockout herunterreguliert. a, qRT-PCR für *ENT1* in K562 nativ, *shRenilla* und *shGFP* als Kontrollen sowie drei verschiedenen K562 *shKDM6A-KD* (#3, #4, #7). *shRenilla*, *shKDM6A* #3 und #7 wurden zusätzlich für 72 h mit 150 nM AraC behandelt. $M \pm SD$ der *ENT1*-RNA relativ zu *GAPDH* wird von drei unabhängigen Versuchen dargestellt. Ungepaarter, zweiseitiger t-Test; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. **b**, Western-Blot zeigt herunterregulierte ENT1-Expression im K562 *shKDM6A-KD* und in MM-6 verglichen mit MM-1. KDM6A-Expression wird ebenfalls mit zwei verschiedenen Belichtungsdauern gezeigt. Exp., Exposition; β -Actin als Ladungskontrolle; MG, Molekulargewicht. **c**, Im Western-Blot herunterregulierte ENT1-Expression in zwei K562 *KDM6A-KO*-Klonen im Vergleich zu K562 nativ und zwei *KDM6A-WT*-Klonen. Ladungskontrolle β -Actin; MG, Molekulargewicht.

Das ENT1-Konstrukt mit dreifach N-FLAG, CMV-3xN-Flag ENT1, wurde mittels transienter Transfektion in HEK293T überexprimiert und im Western-Blot durch einen Anti-FLAG-Antikörper dargestellt. Dabei wurden trotz verstärkter Denaturierungsbedingungen (10 Min bei 95°C) multiple Banden gefunden, die über das gesamte Gel verteilt waren. Das Konstrukt konnte mit keinem der getesteten Anti-ENT1-Antikörper sauber detektiert werden. Es ist davon auszugehen, dass die zwei stärksten Banden im Bereich des 55 kDa-Markers die unglykosylierte (50-55 kDa) und glycosylierte (55-65 kDa) Isoform von ENT1^{109,110} darstellen (Abbildung 12a).

Weiterhin wurde das ENT1-Konstrukt ebenfalls transient in HEK293T exprimiert und anschließend eine direkte Immunfluoreszenzanalyse mit grün fluoreszierendem sekundären Antikörper an Anti-FLAG-Antikörper durchgeführt. Als Kontrolle wurde der DNA-

Farbstoff DAPI verwendet, welcher die Zellkerne blau anfärbt. Das Transmembranprotein ENT1 wurde membranständig in einem Teil der Zellen überexprimiert (Abbildung 12b-e).

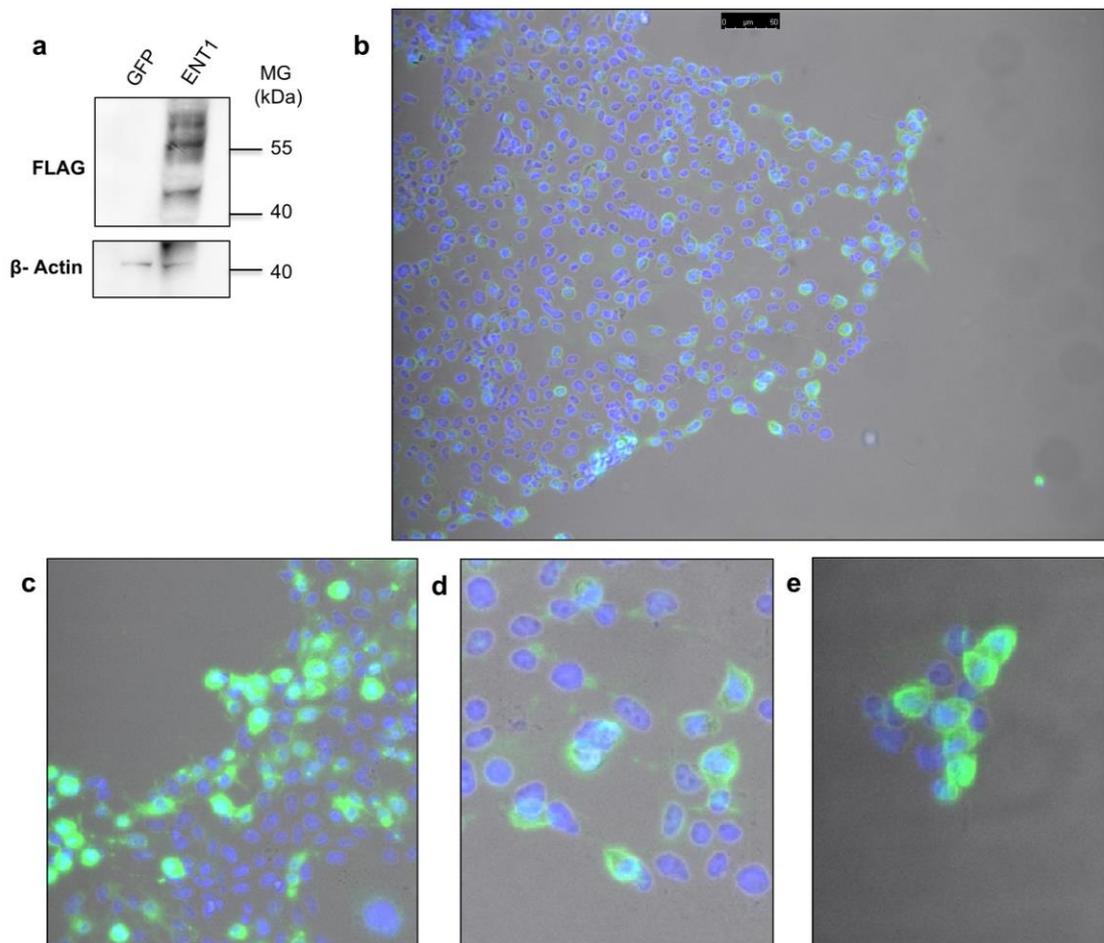


Abbildung 12 Überexpression von ENT1 in HEK293T. a, Anti-FLAG-Western-Blot zeigt ENT1 mit FLAG-Tag. HEK293T wurden mit CMV-3xN-FLAG-ENT1 sowie mit GFP-Vektor als Kontrolle transfiziert. β -Actin dient als Ladungskontrolle; MG, Molekulargewicht. b-e, Immunfluoreszenz mit Anti-FLAG-Antikörper von mit CMV-3xN-FLAG-ENT1 transfizierten HEK293T. Grün: Anti-FLAG, blau: DAPI.

3.4.2 Effekt von ENT1-Inhibition auf die Zytostatikaresistenz

Für funktionelle Analysen von ENT1 wurden Proliferationsassays mit dem selektiven ENT1-Inhibitor NBMPR durchgeführt.

Abbildung 13 zeigt Proliferationsassays von K562-Zellen, die für 72 h mit verschiedenen AraC-, 6-TG- und DNR-Konzentrationen in Kombination mit NBMPR (0,1, 1 oder 10 μ M) behandelt wurden. Die mit NMBPR behandelten K562 waren resistenter gegen AraC, wobei die Stärke des Effekts abhängig von der NBMPR-Konzentration war und bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 10 μ M am größten war (Abbildung 13a, b). Für die Zytostatika 6-TG und DNR konnte kein Effekt des NBMPR-Einsatzes auf die Resistenz beobachtet werden (Abbildung 13c, d).

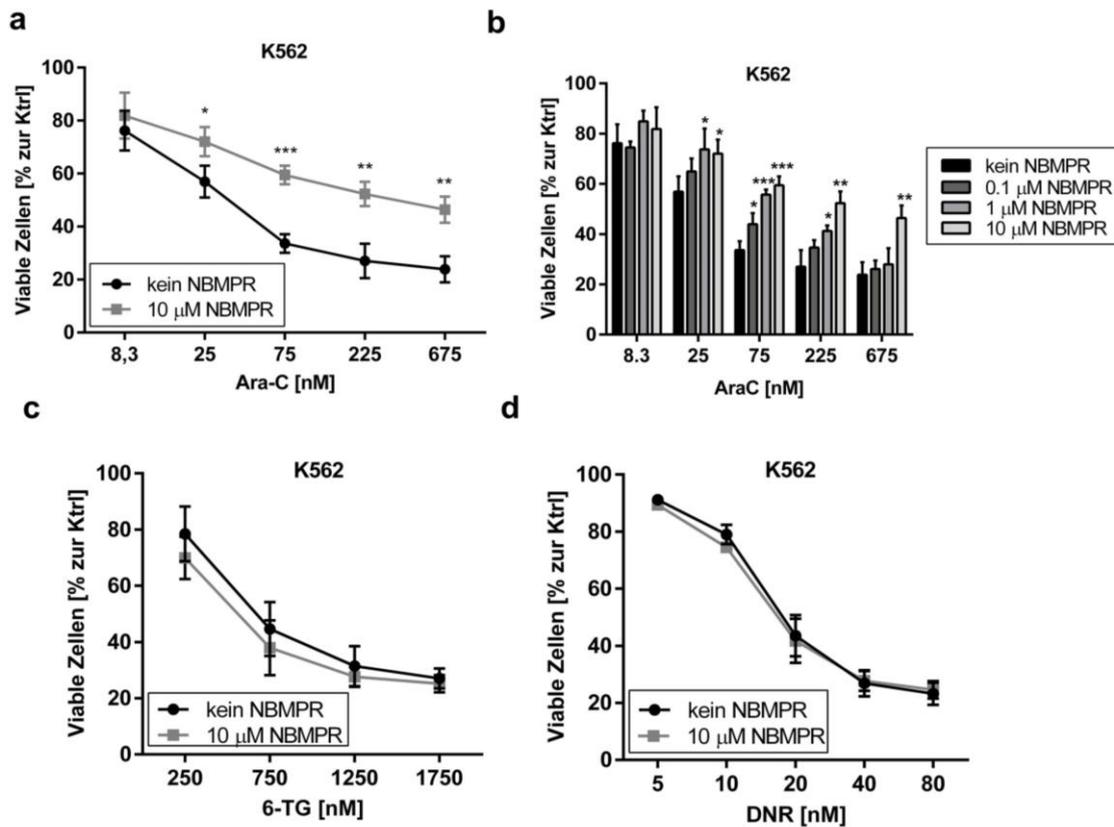


Abbildung 13 ENT1-Inhibition führt in K562 zu erhöhter Resistenz gegen AraC, aber nicht gegen 6-TG und DNR. **a-d**, K562 wurden für 72 h mit unterschiedlichen Konzentrationen AraC (**a**, **b**), 6-TG (**c**) und DNR (**d**) zusammen mit NBMPR behandelt. Kontrolle ohne NBMPR-Behandlung. $M \pm SD$ von drei unabhängigen Versuchen. Ungepaarter, zweiseitiger t-Test; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Die Untersuchungen mit verschiedenen Konzentrationen von AraC und NBMPR wurden auch mit MM-1 und MM-6 durchgeführt. Abbildung 14 zeigt, dass die AraC-Resistenz vergleichbar mit K562 auch für MM-1 und MM-6 durch ENT1-Inhibition dosisabhängig erhöht wurde.

In Abbildung 15 wurden für jede AraC-Konzentration die viable Zellzahl bei NBMPR-Einsatz relativ zur Kontrolle aufgetragen. Dadurch wurde deutlich, dass die Effektstärke durch den NBMPR-Einsatz auf die AraC-Resistenz bei mittleren AraC-Konzentrationen (810-2430 nM) für MM-6 höher war als für MM-1.

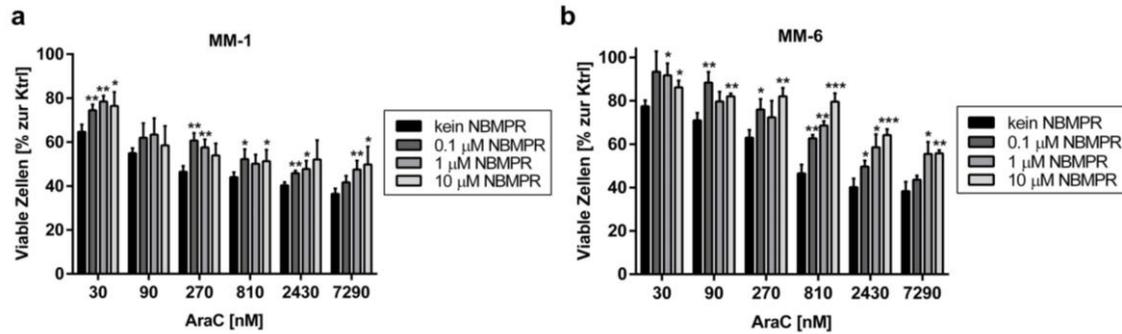


Abbildung 14 ENT1-Inhibition führt in MM-1 und MM-6 zu erhöhter Resistenz gegen AraC. MM-1 (a) und MM-6 (b) wurden mit verschiedenen AraC-Konzentrationen in Kombination mit verschiedenen NBMPR-Konzentrationen für 72 h behandelt. $M \pm SD$ von drei unabhängigen Versuchen. Ungepaarter, zweiseitiger t-Test; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

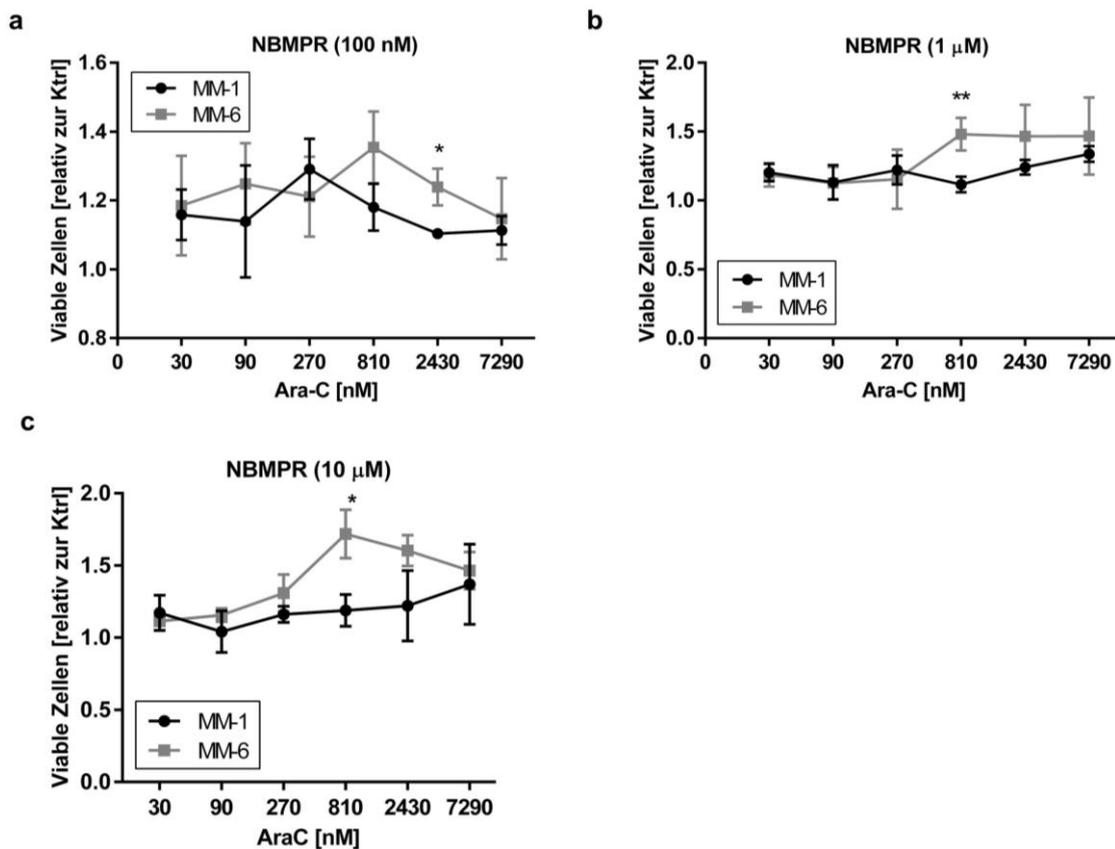


Abbildung 15 Die durch ENT1-Inhibition erhöhte AraC-Resistenz ist bei MM-6 tendenziell stärker als bei MM-1. a-c, Daten aus Abbildung 14 (a) und (b) jeweils dargestellt für die verschiedenen NBMPR-Konzentrationen (0.1, 1 oder 10 µM); viable Zellen relativ zur Kontrolle ohne NBMPR-Behandlung. $M \pm SD$ von drei unabhängigen Versuchen. Ungepaarter, zweiseitiger t-Test; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

3.4.3 ZCCHC7-ENT1

3.4.3.1 Expression des Fusionsgens ZCCHC7-ENT1 in Ba/F3 durch retrovirale Transduktion

Interessanterweise wurde in den Blasten eines c-ALL-Patienten mit myeloischer Ko-Expression das Fusionsgen *ZCCHC7-ENT1* nachgewiesen. Bei der Mutation wurde das 4. Exon des nukleären Proteins Zinc Finger CCHC-Type Containing 7 (*ZCCHC7*) mit dem 2. Exon von *ENT1* durch eine in-frame-Fusion verbunden. In der Annahme, dass die Untersuchung dieses Fusionsgens weitere Kenntnisse über die funktionelle Rolle von *ENT1* im Rahmen der Zytostatikaresistenz bei akuten Leukämien liefern könnte, wurde das Fusionsgen als Genblock hergestellt, in einen pMIY-Vektor kloniert und mittels retroviraler Transduktion in Ba/F3-Zellen überexprimiert. Dabei wurden zwei Varianten des Konstrukts mit N-terminalem und mit C-terminalem FLAG-Tag verwendet.

Abbildung 16 zeigt die Expression von *ZCCHC7-ENT1* in Ba/F3 auf mRNA-Ebene, wobei die Expression des Konstrukts mit N-FLAG stärker ist. Ba/F3 mit pMIY-Leervektor dient dabei als Negativkontrolle.

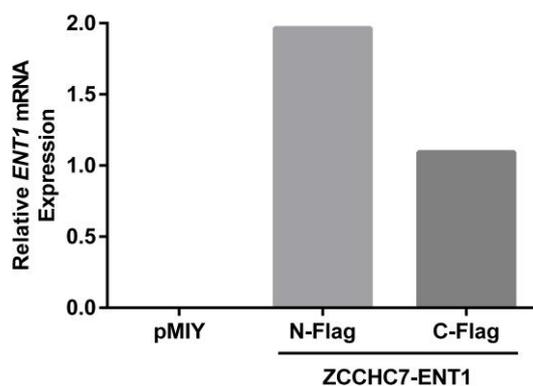


Abbildung 16 Überexpression der *ZCCHC7-ENT1*-Fusion in Ba/F3 ist beim N-terminal getagtem Konstrukt stärker. qRT-PCR für die *ENT1*-RNA-Expression relativ zur *GAPDH*-Expression in retroviral mit N- oder C-terminal getagtem pMIY-*ZCCHC7-ENT1* transduzierten Ba/F3-Zellen und Leervektor pMIY als Kontrolle.

3.4.3.2 Funktionelle Charakterisierung von ZCCHC7-ENT1

Zur funktionellen Charakterisierung des Fusionsproteins wurde ein IL-3-Entzug durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Überexpression von *ZCCHC7-ENT1* in den normalerweise IL-3-abhängigen Ba/F3-Zellen einen Effekt auf die IL-3-Abhängigkeit hat. Wie bei der Leervektor-Kontrolle proliferierten auch die mit dem Fusionsprotein transduzierten Ba/F3-Zellen ohne IL-3 im Medium kaum noch. Es ließ sich kein Unterschied der IL-3-Abhängigkeit zur Kontrolle feststellen; allerdings wurde dieser Versuch nur einmal durchgeführt (Abbildung 17a).

Nach AraC-Behandlung für 72h konnte bei den Ba/F3 ZCCHC7-ENT1-Zellen ebenfalls kein veränderter Phänotyp festgestellt werden (Abbildung 17b).

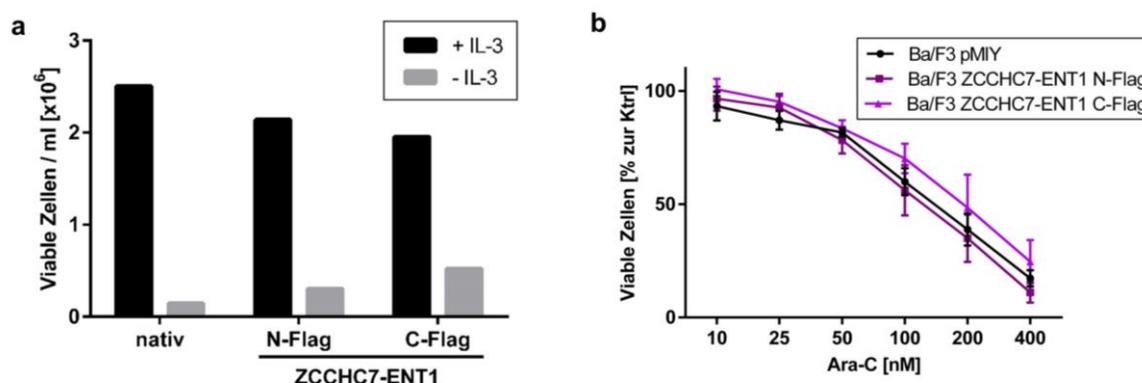


Abbildung 17 Überexpression der ZCCHC7-ENT1-Fusion in Ba/F3 führt zu keinem veränderten Phänotyp hinsichtlich IL-3-Abhängigkeit und AraC-Resistenz. **a**, Ba/F3 nativ sowie Ba/F3 ZCCHC7-ENT1 wurden für 72 h mit und ohne Zusatz von 10 ng/ml IL-3 im Medium inkubiert und anschließend die viable Zellzahl bestimmt. **b**, Behandlung von ZCCHC7-ENT1-überexprimierenden Ba/F3-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen AraC für 72 h. Gezeigt werden $M \pm SD$ von drei unabhängigen Versuchen.

3.5 PiggyBac KDM6A-Re-Expression

Im *KDM6A*-KD und -KO wurde für verschiedene AML-Zelllinien eine erhöhte Resistenz gegen AraC beschrieben⁵¹. Außerdem wurde eine differenzielle Expression von in dieser Arbeit beschriebenen potenziellen Zielgenen von *KDM6A* festgestellt. Um einen weiteren Hinweis dafür zu erhalten, dass die im *KDM6A*-KO beobachteten Veränderungen tatsächlich *KDM6A*-abhängig und keine Off-Target-Effekte sind, wurde eine *KDM6A*-Re-Expression in *KDM6A*-KO-Zelllinien mithilfe des PiggyBac-Systems durchgeführt. Dabei wurde *KDM6A* als WT und als Demethylase-tote Mutante H1146A^{18,19} re-exprimiert, um zu untersuchen, ob beobachtete Effekte von der *KDM6A*-Demethylaseaktivität abhängig sind. Für die Re-Expression wurden die Zelllinien K562 *KDM6A* KO #1 und #2, zwei CRISPR/Cas9-vermittelte homozygote *KDM6A*-KO-Klone⁵¹, und THP-1, eine von der DSMZ bezogene AML-Zelllinie mit einem natürlichen *KDM6A*-Verlust^{51,111}, ausgewählt. Die Western-Blots in Abbildung 18 zeigen die Doxycyclin-induzierbare *KDM6A*-Re-Expression in den verschiedenen KO-Klonen. Die nicht-induzierten Kontrollen wiesen kein *KDM6A*-Signal auf. Die *KDM6A*-Re-Expression des Klons K562 *KDM6A* KO #2 wird genauer in Abbildung 19 gezeigt.

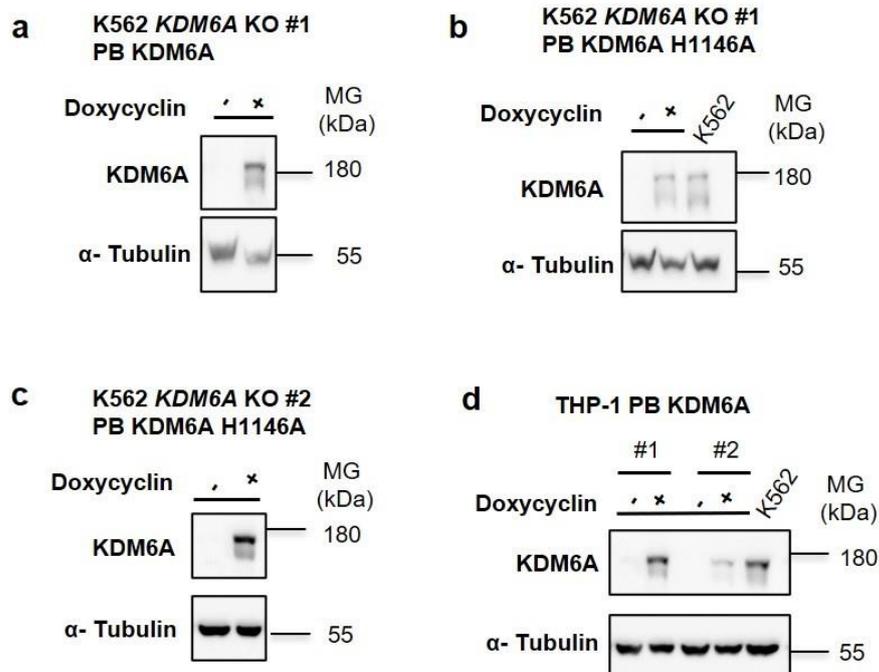


Abbildung 18 Induzierbare *KDM6A*-Re-Expression in K562 *KDM6A*-KO-Klonen und THP-1. **a-d**, Western-Blot für *KDM6A* zeigt Re-Expression von *KDM6A*-WT bzw. der Demethylase-toten Mutante *KDM6A* H1146A in den K562 *KDM6A* KO Klonen #1 und #2 sowie in der *KDM6A*-KO-AML-Zelllinie THP-1. *KDM6A* wird nur unter Doxycyclininduktion mit 2 μ g/ml Doxycyclin für 48 h (+ Doxycyclin.) re-exprimiert, nicht bei den unbehandelten Kontrollen (- Doxycyclin). Zum Vergleich der Expressionslevel wurde K562 nativ aufgetragen. α - Tubulin, Ladungskontrolle; MG, Molekulargewicht.

3.5.1 SPARC-Expression unter *KDM6A*-Re-Expression

Um die Expression der potenziellen *KDM6A*-Zielgene *SPARC* und *ENT1* unter *KDM6A*-Re-Expression zu untersuchen, wurden zunächst je ein K562 *KDM6A*-KO- und ein THP-1-Klon mit Doxycyclin induziert und nach 24, 48 und 72 h Lysate angefertigt, um die *KDM6A*-Re-Expression an verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion zu untersuchen. Die Diagramme in Abbildung 19 sind eine Quantifizierung der Western-Blot-Banden, welche mit der Software *Image J* durchgeführt wurde. Bei beiden Klonen ist die *KDM6A*-Expression 24 h nach Induktion am stärksten und nimmt nach 72 h bereits deutlich ab.

Außerdem wurde dieselbe geschnittene Membran parallel mit einem Anti-*SPARC*-Antikörper inkubiert. Es fällt auf, dass die *SPARC*-Expression unter *KDM6A*-Re-Expression im Vergleich zu den nicht-induzierten Kontrollen deutlich hochreguliert war. Dabei war das *SPARC*-Proteinlevel bei K562 und THP-1 nach 48 h am höchsten und beim *KDM6A* re-exprimierenden K562 *KDM6A*-KO-Klon vergleichbar mit der *SPARC*-Expression von K562 nativ. Für den K562-Klon wurden außerdem zwei verschiedene

Doxycyclinkonzentrationen (1.5 und 3 $\mu\text{g/ml}$) getestet, wobei zwischen diesen keine signifikanten Unterschiede festgestellt wurden (Abbildung 19).

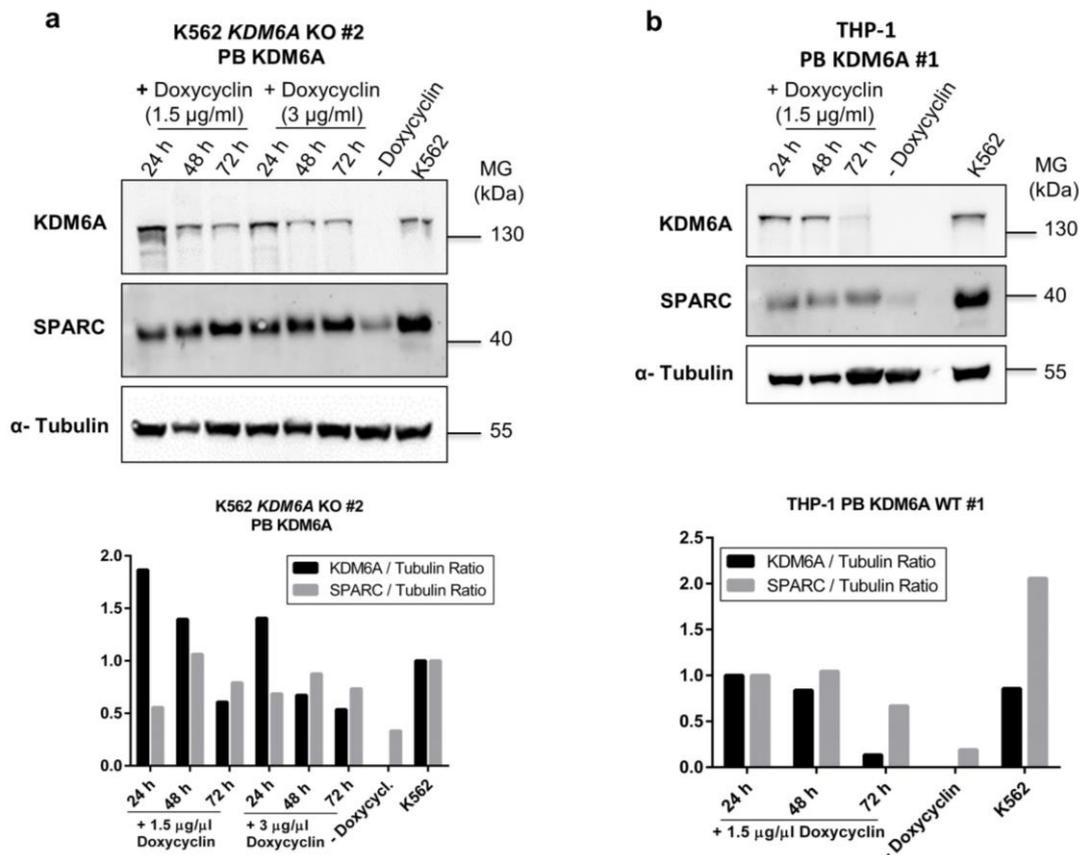


Abbildung 19 Induzierbare KDM6A-Re-Expression in einem K562 KDM6A-KO-Klon und THP-1 führt zur Hochregulation von SPARC. **a, b**, Western-Blot für KDM6A zeigt Re-Expression 24 h, 48 h und 72 h nach Beginn der Induktion mit zwei verschiedenen Doxycyclinkonzentrationen 1.5 $\mu\text{g/ml}$ und 3 $\mu\text{g/ml}$ für K562 KDM6A KO #2 PB KDM6A (**a**) und THP-1 PB KDM6A #1 (**b**). Außerdem wird die SPARC-Expression gezeigt. Die zugehörigen Säulendiagramme sind eine Quantifizierung der Western-Blots mit der Software *Image J*, jeweils normalisiert auf die K562 nativ-KDM6A-Expression. MG, Molekulargewicht; α -Tubulin, Ladungskontrolle.

3.5.2 ENT1-Expression unter KDM6A-Re-Expression

Abbildung 20 zeigt RNA-Level von *ENT1* relativ zu *GAPDH* einer qRT-PCR-Analyse von verschiedenen THP-1- und K562 KDM6A-KO-Klonen mit und ohne KDM6A-Re-Expression. Die Klone mit PiggyBac-Vektorsystem wurden jeweils ohne Induktion und 48 h nach Induktion mit 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin verglichen.

Bei den K562 KDM6A-KO-Klonen #1 und #2 liegt auf RNA-Ebene eine geringere ENT1-Expression als bei K562 nativ und dem KDM6A-WT-Klon #1 vor. Sowohl beim KDM6A-WT-re-exprimierenden Klon K562 KDM6A KO #1 als auch beim KDM6A H1146A re-exprimierenden Klon von K562 KDM6A KO #2 wurde *ENT1* im Vergleich zur nicht-induzierten Kontrolle hochreguliert. Auch beim THP-1-Klon PB KDM6A #2 ist dieser

Trend erkennbar. Auffällig ist, dass die *ENT1*-Expression bei der nicht-induzierten Kontrolle des THP-1 PiggyBac-Klons deutlich geringer als bei THP-1 nativ war. Der Klon K562 *KDM6A* KO #2 ohne PiggyBac-System wurde ebenfalls mit Doxycyclin behandelt. Dies führte zu keiner *ENT1*-Hochregulation, was als Kontrolle dafür dient, dass die Hochregulation von *ENT1* unter *KDM6A*-Re-Expression nicht durch die Doxycyclinbehandlung allein bedingt wurde.

Diese Ergebnisse sind allerdings nicht statistisch signifikant, vermutlich bedingt durch die geringe Zahl von Replikaten und die hohe Standardabweichung.

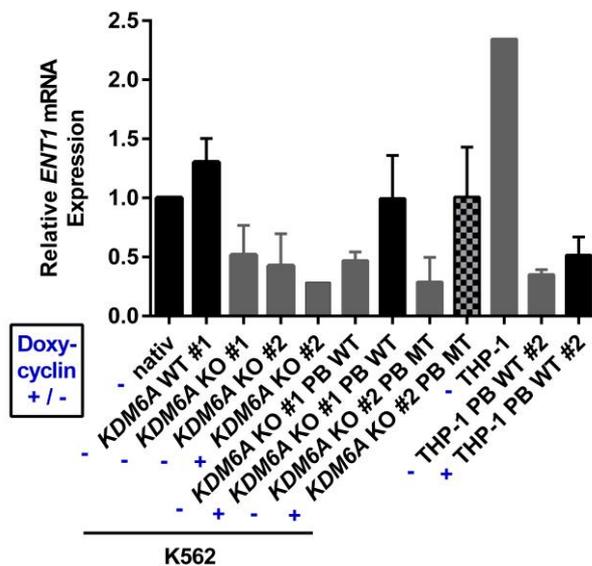


Abbildung 20 Induzierbare *KDM6A*-Re-Expression in K562 *KDM6A*-KO-Klonen und THP-1 führt zur Hochregulation von *ENT1*. qRT-PCR zeigt Hochregulation von *ENT1* auf RNA-Ebene relativ zu *GAPDH* in K562 *KDM6A*-KO-Klonen und THP-1, wenn *KDM6A* durch Doxycyclininduktion (0.5 µg/ml für 48 h) re-exprimiert wird. Gezeigt werden $M \pm SD$ von zwei unabhängigen Versuchen, jeweils normalisiert auf K562. MT, Mutante (*KDM6A* H1146A).

3.5.3 Effekt der *KDM6A*-Re-Expression auf Zytostatikaresistenz und Proliferationsgeschwindigkeit

Um zu analysieren, ob die *KDM6A*-Re-Expression zu einer Wiederherstellung der AraC-Sensitivität in den K562- und THP-1-Klonen führt, wurden die verschiedenen *KDM6A*-re-exprimierenden Klone für 72 h mit unterschiedlichen AraC-Konzentrationen behandelt, nachdem die *KDM6A*-Expression bereits 48 h zuvor mit 0.5 µg/ml Doxycyclin induziert wurde. Als Kontrollen dienten die unbehandelten Klone. Bei den *KDM6A*-WT re-exprimierenden K562- und THP-1-Klonen ließen sich für die meisten Konzentrationen statistisch signifikante Erhöhungen der AraC-Sensitivität feststellen (Abbildung 21a, c, e, f). Bei den beiden Klonen K562 *KDM6A* KO #1 und #2 PB *KDM6A* H1146A, die die Demethylase-tote *KDM6A*-Mutante exprimieren, war nur ein leichter Trend in Richtung

erhöhter AraC-Sensitivität erkennbar (Abbildung 21b, d). Die Behandlung des K562 KDM6A-WT Klons #1 mit Doxycyclin als Kontrolle führte zu keiner veränderten AraC-Sensitivität (Abbildung 21g).

Um zu untersuchen, ob die KDM6A-Re-Expression die Proliferation der *KDM6A*-KO-Klone verändert, wurden die verschiedenen Zellklone über einen Zeitraum von 8 Tagen alle 2 Tage gezählt, gesplittet und mit 0.5 µg/ml Doxycyclin behandelt. Bei beiden KDM6A-WT-Klonen K562 *KDM6A* KO #1 PB KDM6A und K562 *KDM6A* KO #2 PB KDM6A sowie beiden KDM6A H1146A exprimierenden Klonen K562 *KDM6A* KO #1 PB KDM6A H1146A und K562 *KDM6A* KO #2 PB KDM6A H1146A und dem Klon THP-1 PB KDM6A #1 zeigte sich durch die Doxycyclin-induzierte KDM6A-Re-Expression eine deutlich geringere Proliferation verglichen mit den Kontrollen (Abbildung 22a-e). Beim Klon THP-1 PB KDM6A #2 (Abbildung 22f) hingegen wurde unter Doxycyclininduktion keine Veränderung in der Proliferation festgestellt. Um zu zeigen, dass der beobachtete Effekt auf die doxycyclinabhängige KDM6A-Re-Expression und nicht auf die Doxycyclinbehandlung allein zurückzuführen ist, wurde der K562 *KDM6A*-KO-Klon #2 ohne PiggyBac-System unter den gleichen Bedingungen mitgeführt (Abbildung 22g). Hier wurde kein Proliferationsunterschied zwischen den Zellen mit und ohne Doxycyclinbehandlung festgestellt.

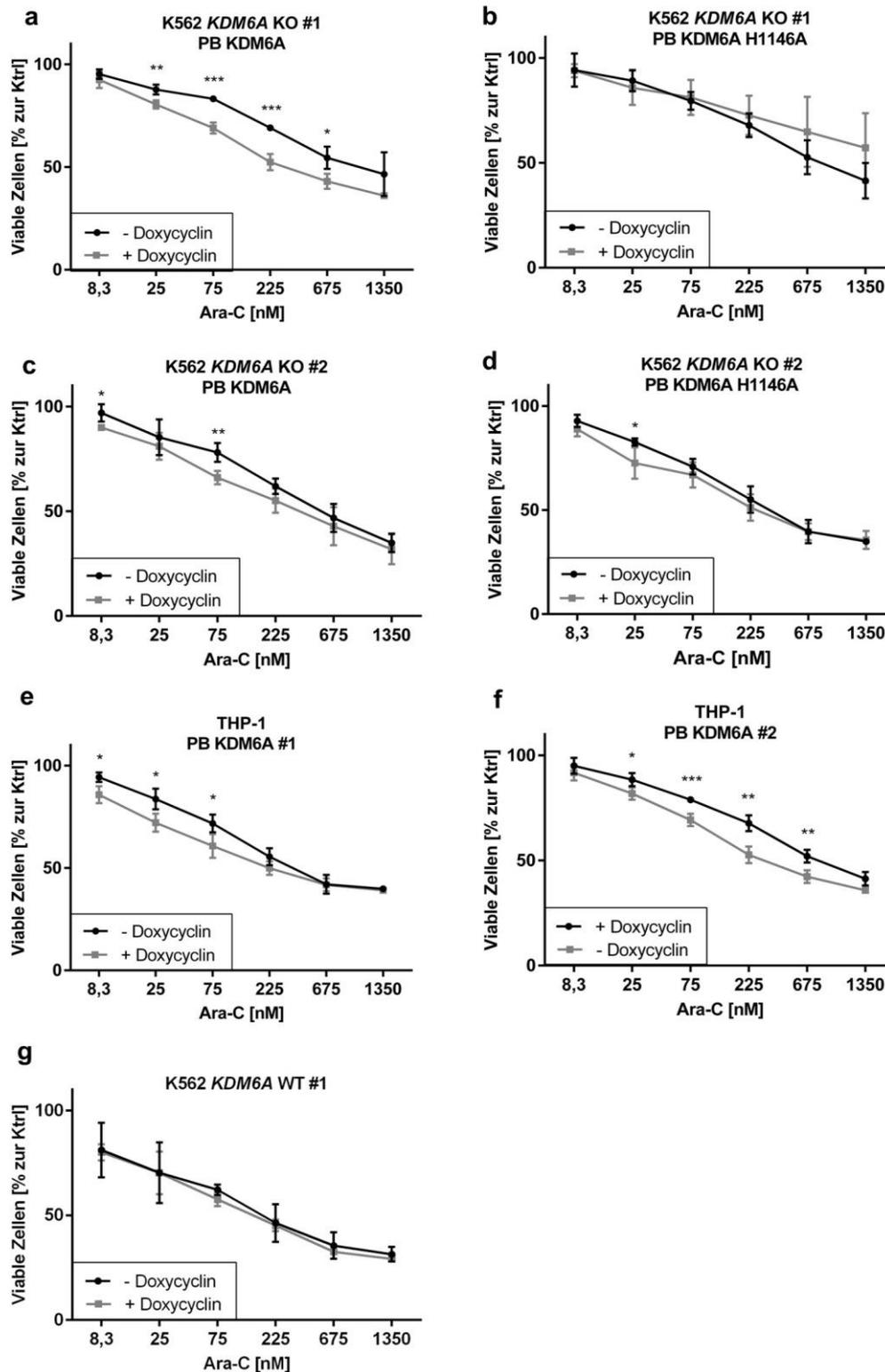


Abbildung 21 *KDM6A*-WT-, aber nicht *KDM6A* H1146A-Re-Expression in K562 *KDM6A*-KO und THP-1 führt zu erhöhter Sensitivität gegenüber AraC. a-g, K562 *KDM6A* KO #1 PB *KDM6A* (a), K562 *KDM6A* KO #1 PB *KDM6A* H1146A (b), K562 *KDM6A* KO #2 PB *KDM6A* (c), K562 *KDM6A* KO #2 PB *KDM6A* H1146A (d), THP-1 PB *KDM6A* #1 (e) und #2 (f) sowie K562 *KDM6A* WT #1 (g) als Kontrolle wurden für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen AraC behandelt, jeweils nicht-induziert und mit 0.5 µg/ml Doxycyclin 48 h zuvor induziert. $M \pm SD$ von vier unabhängigen Versuchen. Ungepaarter, zweiseitiger t-Test; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

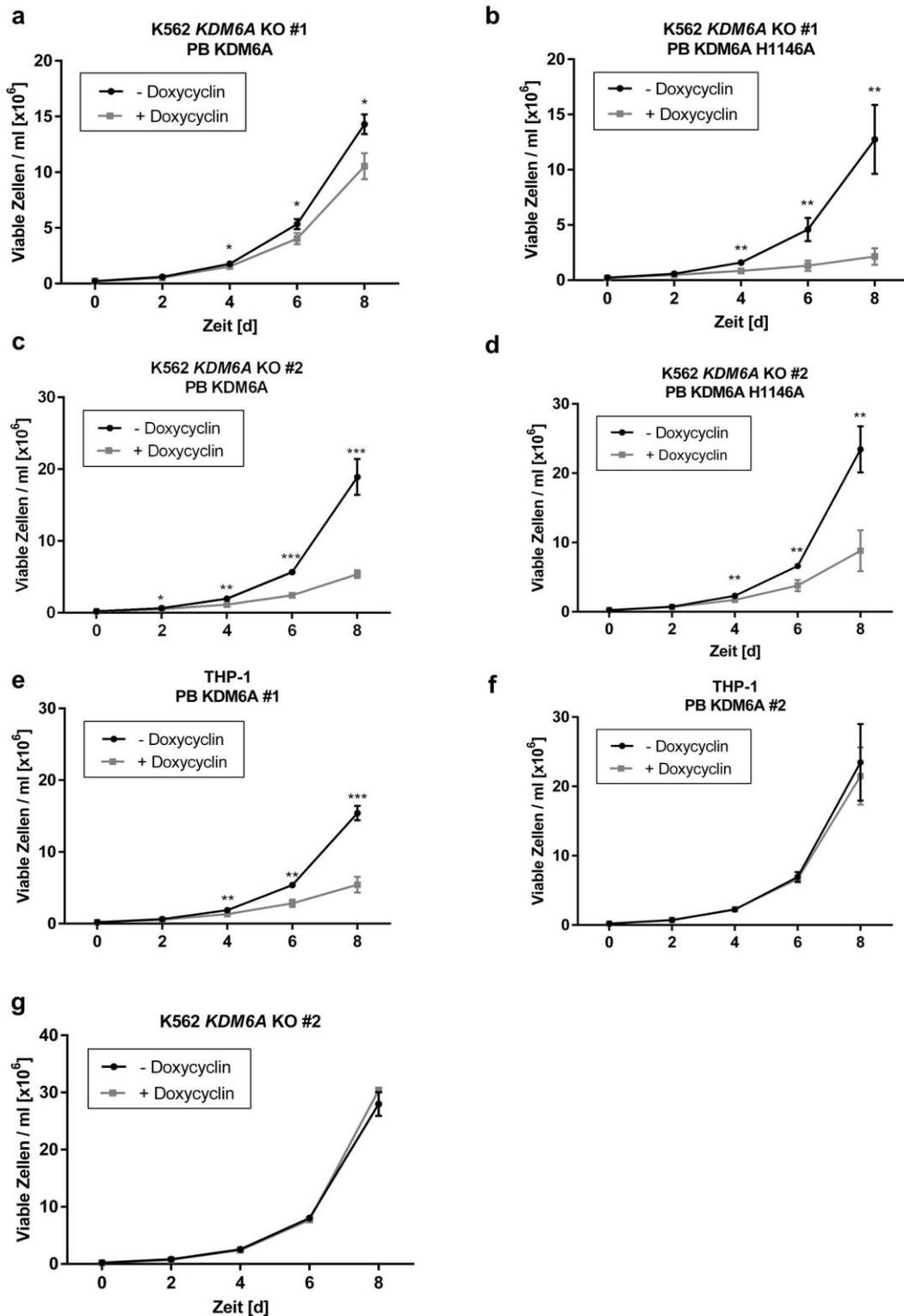


Abbildung 22 *KDM6A*-WT- und *KDM6A* H1146A-Re-Expression in K562 *KDM6A*-KO und THP-1 führen in unterschiedlichem Ausmaß zur Verlangsamung der Proliferation. a-g, Im Langzeitproliferationsassay wurden über 8 Tage für K562 *KDM6A* KO #1 PB *KDM6A* (a), K562 *KDM6A* KO #1 PB *KDM6A* H1146A (b), K562 *KDM6A* KO #2 PB *KDM6A* (c), K562 *KDM6A* KO #2 PB *KDM6A* H1146A (d), THP-1 PB *KDM6A* #1 (e) und #2 (f) sowie K562 *KDM6A* KO #2 (g) als Kontrolle alle zwei Tage die viable Zellzahl bestimmt und entsprechend gesplittet, jeweils nicht-induziert und mit 0.5 µg/ml Doxycyclin induziert. M ± SD von drei unabhängigen Versuchen. Ungepaarter, zweiseitiger t-Test; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

Tabelle 14 Liste der in der Massenspektrometrie signifikant angereicherten Gene. Zugehörig zu Abbildung 23. $p < 0,05$.

Gencode	Vollständiger Name	$-\log_{10}(p\text{-Wert})$	$\log_2(\text{Fold Change})$
KDM6A	Lysindemethylase 6A	8,1	-10,9
MYH14	Myosin-14	0,9	-4,2
KMT2D (MLL4)*	Lysinmethyltransferase 2D	5,0	-3,8
KMT2C (MLL3)	Lysinmethyltransferase 2C	5,5	-3,8
DPY30	Dpy-30 histone methyltransferase complex regulatory subunit	8,2	-3,8
TRAP1*	TNF receptor associated protein 1	5,5	-3,7
MRPS23	Mitochondrial Ribosomal Protein S23	6,0	-3,7
PRDX3*	Peroxiredoxin 3	4,5	-3,6
CCT8*	Chaperonin containing TCP1 subunit 8	6,7	-3,5
RRBP1*	Ribosome binding protein 1	4,0	-3,5
TARDBP	TAR DNA-binding protein 43	4,5	-3,4
NDUFS6	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit S6	1,1	-3,4
RPS11	Ribosomal protein S11	1,1	-3,3
DDB1*	Damage specific DNA binding protein 1	7,3	-3,2
HNRNPL	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	1,1	-3,1
ILF2*	Interleukin enhancer-binding factor 2	1,0	-2,9
SRP14	Signal recognition particle 14	1,2	-2,8
RPL35*	Ribosomal protein L35	5,1	-2,7
MRPS35	Mitochondrial ribosomal protein S35	1,4	-2,6
PLRG1*	Pleiotropic regulator 1	1,2	-2,5
MRPS18B*	Mitochondrial ribosomal protein S18B	6,6	-2,1
RPL14*	Ribosomal protein L14, pseudogene	4,5	-1,9

* signifikant durch Imputation mit konstantem Wert

Eine zweite Massenspektrometrieanalyse hatte zum Ziel, weitere Informationen über die Lokalisation der Proteininteraktionen mit KDM6A und den Einfluss verschiedener *KDM6A*-Mutationen auf die Interaktion zu erhalten. Dafür wurden neben KDM6A-WT der N-terminale (KDM6A Q880X) und C-terminale (KDM6A 880-1401) Teil von KDM6A sowie drei in AML-Patientinnen gefundene Mutanten, *KDM6A* E1325X, *KDM6A* L1103R und *KDM6A* V1113Sfs*38⁵¹, untersucht. Abbildung 24 zeigt die Struktur der verschiedenen *KDM6A*-Konstrukte schematisch.

In Abbildung 25 lässt sich die unterschiedliche Expressionsstärke der Konstrukte in HEK293T sowie die verschieden starke Anreicherung in der IP erkennen. Die LOF-*KDM6A*-Mutanten E1325X, L1103R und V1113Sfs*38 wurden weniger stark exprimiert und angereichert als KDM6A-WT und die beiden Fragmente KDM6A Q880X und 880-1401. Exemplarisch wurde die Anreicherung eines der bekannten *KDM6A*-Interaktionspartner, KMT2D, im *KDM6A*-Pulldown der Massenspektrometrie mit den verschiedenen *KDM6A*-Mutanten genauer analysiert. Interessanterweise wurde KMT2D bei den verschiedenen

KDM6A-Konstrukten unterschiedlich stark angereichert. KMT2D wurde bei den KDM6A-Fragmenten KDM6A Q880X und 880-1401 im Vergleich zu KDM6A-WT insgesamt schwächer angereichert, was aufgrund der geringeren Proteingröße und der damit geringeren Interaktionsmöglichkeiten zu erwarten war. Auffällig ist allerdings, dass KMT2D im C-terminalen KDM6A-Teil kaum angereichert wurde (Abbildung 26).

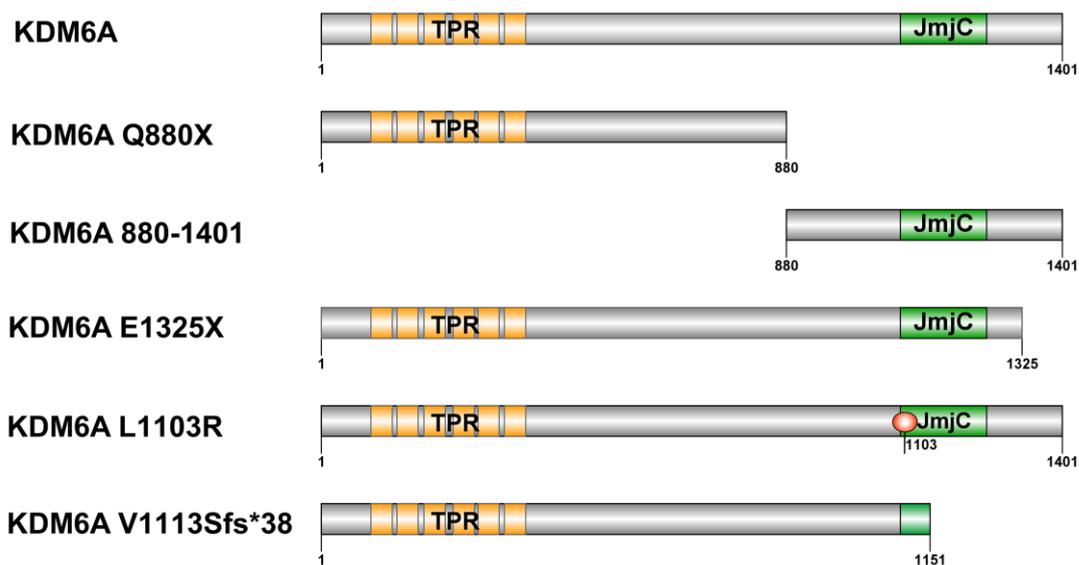


Abbildung 24 Schematische Proteinstruktur der in der Massenspektrometrieanalyse untersuchten **KDM6A-Konstrukte**. Aminosäurepositionen sind angegeben. TPR, tetratricopeptide, JmjC, Jumonji C. Illustration mit der *IBS Software*³⁸.

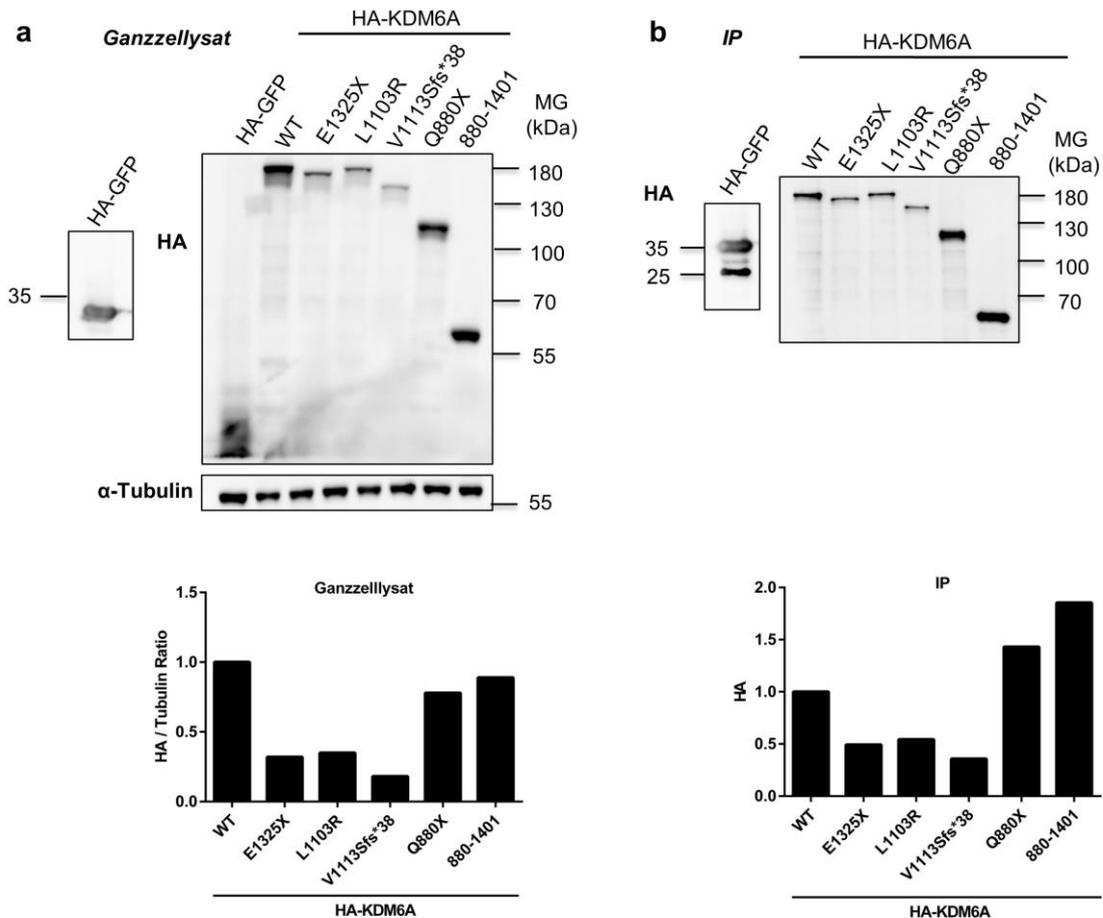


Abbildung 25 Expressionsstärke verschiedener *KDM6A*-Konstrukte in HEK293T im Ganzzelllysate und in der Immunpräzipitation. **a, b**, HA-getagte *KDM6A*-Konstrukte und eine HA-GFP Kontrolle wurden in HEK293T exprimiert. Western-Blots mit anti-HA-Antikörper zeigen die unterschiedliche Expressionsstärke der Konstrukte im Ganzzelllysate (**a**) und in der IP mit anti-HA-Beads (**b**). Die zugehörigen Säulendiagramme sind eine Quantifizierung der Western-Blots mit der Software *Image J* normalisiert auf *KDM6A*-WT. α -Tubulin, Ladungskontrolle; MG, Molekulargewicht.

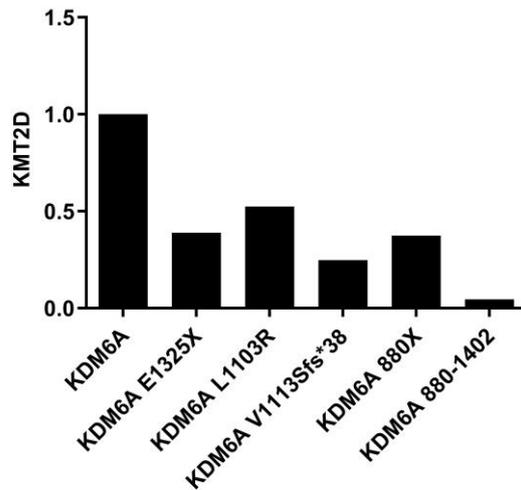


Abbildung 26 Massenspektrometrieanalyse für KDM6A-Interaktionspartner mit unterschiedlichen KDM6A-Konstrukten. KMT2D-Anreicherung im KDM6A-Pulldown einer Massenspektrometrie mit verschiedenen KDM6A-Mutanten, relativ zur HA-GFP-Kontrolle. HEK293T wurden mit pcDNA6-HA-GFP sowie den *KDM6A*-Konstrukten pcDNA6-HA-*KDM6A*-WT, den KDM6A Bruchstücken *KDM6A* Q880X und 880-1401 und drei in AML-Patientinnen aufgetretenen *KDM6A*-Mutanten E1325X, L1103R und V1113Sfs*38 transfiziert. Anschließend wurde eine Massenspektrometrie der IP mit HA-Beads durchgeführt. Drei unabhängige Versuche, $p > 0.05$.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, einen molekularen Mechanismus für die zuvor beschriebene und durch KDM6A-Funktionsverlust vermittelte Zytostatikaresistenz in der akuten myeloischen Leukämie (AML)⁵¹ aufzudecken. Dazu wurden drei mögliche KDM6A-Zielgene, *NT5C2*, *SPARC* und *ENT1*, untersucht. Sie werden im *KDM6A*-Knockdown differenziell reguliert und stehen bekanntermaßen mit der Leukämogenese oder der Zytostatikaresistenz in Verbindung.

4.1 NT5C2

NT5C2 ist eine Nukleotidase, welche Nukleosidmonophosphate dephosphoryliert und dadurch auch an der Inaktivierung von in der AML-Therapie verwendeten Zytostatika wie Cytarabin (AraC) und 6-Thioguanin (6-TG) beteiligt ist. Bei AML-Patient*innen ist eine höhere *NT5C2*-mRNA-Expression in den Blasten bei Diagnose mit einer schlechteren Prognose assoziiert⁶²⁻⁶⁷. In dieser Arbeit wurde eine Hochregulation der mRNA-Expression von *NT5C2* in *KDM6A*-Knockdown-Zellen festgestellt. Unter der Annahme von *NT5C2* als potenzielles KDM6A-Zielgen wurde ein Zusammenhang zwischen einer höheren NT5C2-Aktivität und der KDM6A-vermittelten erhöhten AraC-Resistenz in AML-Patient*innen vermutet.

Die in den RNA-Sequenzierungs-Daten beobachtete Hochregulation von *NT5C2* im *KDM6A*-Knockdown konnte im Western-Blot auf Proteinebene nur für MONO-MAC-6 (MM-6, *KDM6A*-Knockout) im Vergleich zu MONO-MAC-1 (MM-1, *KDM6A*-Wildtyp(WT)), nicht aber im *shKDM6A*-Knockdown in K562-Zellen bestätigt werden. Für die differenzielle *NT5C2*-Expression in den MM-Zellen ist daher vermutlich ein KDM6A-unabhängiger Mechanismus verantwortlich. Eine Diskrepanz zeigte sich zwischen der in K562 *shKDM6A* #7 im Vergleich zur Kontrolle K562 *shGFP* hochregulierten *NT5C2*-mRNA und der gleichbleibenden *NT5C2*-Proteinexpression. Diese könnte durch Mechanismen der posttranskriptionellen Regulation wie mRNA-Abbau erklärt werden.

Um den Zusammenhang zwischen der *NT5C2*-Expression und Zytostatikaresistenz näher zu untersuchen, wurden *NT5C2*-WT und die Gain-of-function(GOF)-Mutante *NT5C2* R367Q in Ba/F3-Zellen überexprimiert und Zytotoxizitätsassays durchgeführt. Die Konstrukte wurden deutlich oberhalb des endogenen *NT5C2*-Levels exprimiert, wobei *NT5C2* R367Q schwächer exprimiert wurde als *NT5C2*-WT. Tzoneva *et al.*¹¹² zeigten 2018 mit einem konditionellen Knockin-T-ALL-Mausmodell mit induzierbarer Expression von *NT5C2*

R367Q, dass das mutierte Allel im Vergleich zum Wild-Typ-Allel herunterreguliert wurde¹¹². Dies könnte auch eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Expressionsstärke der NT5C2-Konstrukte in dieser Arbeit sein. Andererseits ist es auch denkbar, dass NT5C2-WT nach dem Einbau bei der retroviralen Transduktion zufälligerweise durch einen stärkeren Promotor reguliert wurde als NT5C2 R367Q.

Interessanterweise hemmte die NT5C2-Überexpression die Proliferationsgeschwindigkeit der Ba/F3-Zellen. Grundsätzlich wird NT5C2 ubiquitär exprimiert und weist eine höhere Aktivität in Geweben mit hoher Proliferation auf¹¹³. Mit dem Knockin-Mausmodell von Tzoneva *et al.*¹¹² wurde gezeigt, dass die NT5C2 R367Q-Expression zwar unter 6-MP-Behandlung zu einem Selektionsvorteil gegenüber NT5C2-WT-Zellen führte, die mutierten Zellen in Abwesenheit von 6-MP aber einen Loss-of-fitness-Phänotyp mit reduzierter Proliferationsgeschwindigkeit *in vivo* und verzögerter Tumorprogression *in vitro* aufwiesen. Als Mechanismus dafür wurde die erhöhte NT5C2-Aktivität für die verschiedenen Nucleosidmonophosphate IMP, XMP und GMP angenommen, welche in einen erhöhten extrazellulären Export der anfallenden Nucleoside resultierte¹¹². Ein NT5C2-vermittelter Loss-of-fitness-Phänotyp könnte eine Erklärung für die geringere Proliferationsgeschwindigkeit von Ba/F3 NT5C2 sein.

Gegensätzlich dazu korrelierte in einer anderen Studie mit Glioblastomzellen NT5C2-WT- und NT5C2 R367Q-Überexpression mit einer erhöhten Proliferationsgeschwindigkeit. Alterierte Adenylat- oder Guanylat-Pools in den Zellen wurden aber nicht gefunden, sodass vermutet wurde, dass NT5C2 mit anderen Pathways, die die Proliferation regulieren, interferiert¹¹⁴. Diese könnten Zelltyp-spezifisch sein und sich von denen in leukämischen Zellen unterscheiden.

Diese Arbeit konnte die durch die GOF-Mutante NT5C2 R367Q vermittelte erhöhte Resistenz gegen 6-TG, welche bereits in ALL-Zelllinien beschrieben wurde^{70,71}, in Ba/F3 bestätigen. Dabei hatte die alleinige Überexpression von NT5C2-WT bereits einen schwächeren resistenzerhöhenden Effekt, welcher in den bisherigen Studien nicht beobachtet wurde^{70,71}. Bei AraC hingegen führte NT5C2-Überexpression nur zu einer geringen Erhöhung der IC₅₀.

Hinsichtlich des Einflusses der NT5C2-Expression auf die AraC-Resistenz in AML-Patient*innen gibt es unterschiedliche Studien. Verschiedene Arbeiten von Galmarini *et al.*⁶²⁻⁶⁷ zeigten einen Zusammenhang zwischen NT5C2-mRNA-Expression bei AML-Diagnose und schlechter Prognose⁶²⁻⁶⁷. In einer ihrer Studien über 77 AML-Patient*innen wurde eine Korrelation zwischen höherer NT5C2-mRNA-Expression und schlechterem

Ansprechen auf Induktionstherapie mit AraC und kürzerem erkrankungsfreien Überleben und Gesamtüberleben beobachtet⁶⁶. Eine andere Studie zeigte eine positive Korrelation von hohen *NT5C2*-mRNA-Leveln in den Blasten bei AML-Diagnose mit schlechterer Prognose und höheren IC_{50} -Werten für AraC in *in vitro*-Zytotoxizitätsassays, aber keine Korrelation mit dem Ansprechen auf AraC-Induktionstherapie⁶⁴. Unklar blieb in diesen Studien allerdings, ob die Ursache für den Zusammenhang zwischen *NT5C2*-Expression und Prognose in der Dephosphorylierung von Ara-CMP durch *NT5C2* oder in einer Veränderung des Nukleotidpools durch *NT5C2* liegt, welche den Proliferationsstatus der Blastenzellen und die Aggressivität der Erkrankung widerspiegeln könnte^{62,64,65,67}. In einer Arbeit von Dumontet *et al.*¹¹⁵, bei der eine resistenterere Variante von K562 durch Selektion mit AraC etabliert wurde, wurde bei dieser eine höhere *NT5C2*-Aktivität im Vergleich zu K562-WT-Zellen festgestellt. Dies führten die Autoren auf eine *NT5C2*-Überexpression in den AraC-resistenteren K562 zurück. Die AraC-resistenten K562 wiesen außerdem eine niedrigere intrazelluläre Ara-CTP-Akkumulation auf¹¹⁵.

In einer weiteren Untersuchung wurde gezeigt, dass *NT5C2* Ara-CMP *in vitro* nicht dephosphoryliert¹¹⁶, was auf einen anderen Mechanismus von *NT5C2* im Rahmen einer angenommenen AraC-Resistenz-Vermittlung hinweist als auf den direkten Abbau von Ara-CMP, wie möglicherweise die Alteration des intrazellulären Nukleotidpools¹¹⁷.

Trotzdem belegen viele Studien einen Zusammenhang von *NT5C2*-Expression und schlechterer Prognose bei AML-Patient*innen⁶²⁻⁶⁷, sodass *NT5C2* als prognostischer Marker für die AML bewertet werden kann. In dieser Arbeit kann *NT5C2* aber keine Erklärung für die im *KDM6A*-Knockdown beobachtete erhöhte AraC-Resistenz liefern. Ob *NT5C2* in der Vermittlung von AraC-Resistenz mechanistisch wirkt, bleibt angesichts der unzureichenden Studienlage ungeklärt. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dagegen, allerdings sind weitere Untersuchungen notwendig.

4.2 SPARC

SPARC ist ein matrizelluläres Protein mit diversen regulatorischen Funktionen und spielt eine kontroverse Rolle in verschiedenen Tumorarten, in denen es unterschiedlich stark exprimiert ist.

Im Western-Blot von SPARC-überexprimierenden Ba/F3-Zellen ist eine Doppelbande erkennbar, obwohl nur eine Isoform von SPARC beschrieben ist. SPARC wird

posttranslational durch Proteasen in Fragmente gespalten^{118,119}. Möglicherweise handelt es sich daher bei der kleineren Bande um ein Abbauprodukt des überexprimierten Konstrukts. Die RNA- und Protein-Expressionsdaten zeigten konsequent eine Herunterregulation von SPARC in *KDM6A*-Knockdown-Zellen. Allerdings harmonieren die RNA- und Protein-Expressionsdaten von SPARC in den K562 *KDM6A*-Knockdown-Zellen nur teilweise, da die Herunterregulation von SPARC auf Proteinebene stärker zum Ausdruck kommt als auf RNA-Ebene und dort nur bei K562 *shKDM6A* #7 signifikant ist. Möglicherweise wird die *SPARC*-mRNA zusätzlich durch posttranskriptionelles Gen-Silencing vor der Translation ins Protein abgebaut.

SPARC-Überexpression in Ba/F3-Zellen veränderte die Resistenz gegen AraC, 6-TG und Daunorubicin (DNR) nicht. Die Datenlage hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen *SPARC*-Expression und der Resistenz gegen die getesteten Zytostatika ist bislang unzureichend.

Untersuchungen der Auswirkung verschiedener *SPARC*-Expressionslevel auf Proliferation und Apoptose wurden in SKM1-Zellen unternommen, einer Zelllinie, die aus auf MDS folgender sekundärer AML etabliert wurde¹²⁰. *SPARC*-Knockdown durch shRNA führte zur Proliferationshemmung und Apoptose¹²¹. Allerdings führte *SPARC*-Überexpression in SKM1-Zellen in einer anderen Studie ebenfalls zu einer Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion, welche unter AraC-Behandlung verstärkt wurden. Interessanterweise wurde in dieser Studie auch festgestellt, dass bei *SPARC*-überexprimierenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle unter AraC-Behandlung *NT5C2* herunterreguliert wurde. Dies wurde zusammen mit anderen differenziell regulierten Genen, die in der Proliferation und Apoptose relevant sind, als mögliche Erklärung postuliert¹²². *SPARC* scheint damit in SKM1-Zellen Proliferation und Apoptose zu regulieren, allerdings ist der genaue Mechanismus dafür bislang unbekannt. Auch in Untersuchungen an weiteren Zelllinien konnte die unterschiedliche Rolle von *SPARC* in der Proliferationsregulation gezeigt werden. *SPARC*-Knockdown führte in Endometriumzellen zu erhöhter Proliferation¹²³, dagegen in einer Leberzelllinie zu einer Inhibition der Proliferation¹²⁴. In unseren Untersuchungen an der murinen Pro-B-Zelllinie Ba/F3 konnte aber kein Effekt von einer *SPARC*-Überexpression unter nativen Bedingungen oder AraC-Behandlung auf die Zellproliferation festgestellt werden.

Unter AraC-Behandlung wurde die *SPARC*-Expression in K562 auf mRNA-Ebene hochreguliert. Andere Studien demonstrierten eine *SPARC*-Hochregulation unter Lenalidomid-Behandlung von MDS⁹³ oder Imatinib-Therapie bei CML-Zelllinien wie

K562^{125,126}. Allerdings ist eine AraC-bedingte Hochregulation von SPARC nach unserem Kenntnisstand bisher in keiner anderen Studie beschrieben worden.

Die widersprüchlichen Ergebnisse hinsichtlich der SPARC-Funktion in der Regulation von Zellzyklus und Proliferation, Zytostatikaresistenz und Tumorgenese verdeutlichen die komplexe Funktion, die SPARC in verschiedenen Zelltypen und regulatorischen Prozessen besitzt. Eine direkte Modulation von SPARC im Rahmen einer Tumorthherapie hätte vermutlich viele Off-Target-Effekte, sodass genaue molekulare Mechanismen noch besser verstanden werden müssen. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass *SPARC* durch *KDM6A* reguliert wird. Allerdings konnte ein direkter Zusammenhang mit der Zytostatikaresistenz in der AML nicht gezeigt werden.

4.3 ENT1

ENT1 ist ein Membrantransporter, der Nukleoside und deren in der Chemotherapie verwendeten Analoga durch die Zellmembran transportiert. Da ENT1 für den Großteil der zellulären Aufnahme von AraC verantwortlich ist^{13,102}, kann eine Alteration der ENT1-Funktion möglicherweise eine veränderte AraC-Resistenz vermitteln. Die RNA-Sequenzierungsdaten zeigten eine Herunterregulation von ENT1 im *KDM6A*-Knockdown. Dazu passend konnte eine konsistente Korrelation der ENT1-Expression mit der *KDM6A*-Expression in verschiedenen K562 und MM-1 *KDM6A*-Knockdown und -Knockout-Zellen auf mRNA- und Proteinebene gezeigt werden.

In dieser Arbeit ist es nicht gelungen, im Western-Blot eine saubere Proteinbande des in HEK293T-Zellen überexprimierten ENT1-Konstrukts darzustellen. ENT1 ist ein Membranprotein mit 11 Transmembrandomänen^{103,110}. Außerdem wurde kürzlich beschrieben, dass ENT1 mit ENT2, einem weiteren Membrantransporter der gleichen Proteinfamilie, Homo- und Heterooligomere bildet¹²⁷. Möglicherweise konnten diese trotz der reduzierenden Bedingungen im Western-Blot nicht vollständig aufgetrennt werden, oder ENT1 war zum Teil noch mit anderen Membranbestandteilen verbunden. Die Negativkontrolle mit dem GFP-Vektor ist allerdings sauber, was für die Spezifität des Antikörpers für ENT1 spricht. Da das Konstrukt in den Immunfluoreszenzaufnahmen membranständig detektiert werden konnte, ist davon auszugehen, dass das Konstrukt korrekt exprimiert wurde und die Ursache bei der Western-Blot-Analyse des Proteins lag.

ENT1-Inhibition durch NBMPR erhöhte die Resistenz von K562 und MM-1 / MM-6 gegen AraC, nicht jedoch gegen 6-TG und DNR. Diese Ergebnisse könnten sich dadurch erklären

lassen, dass ENT1 AraC in die Zelle transportiert, während für 6-TG und DNR andere Transportmechanismen verantwortlich sein dürften. Wird ENT1 inhibiert, wird vermutlich weniger AraC in die Zelle transportiert und diese wird dadurch resistenter. Diese Ergebnisse passen zu einer anderen Studie, bei der die mRNA-Expression von *ENT1* in den Blasten von pädiatrischen Patient*innen mit De-novo-AML signifikant invers mit der AraC-Resistenz korrelierte¹⁰². Auch bei MLL-rearrangierter ALL im Vergleich zu anderer pädiatrischer ALL scheint eine höhere *ENT1*-mRNA-Expression zur Vermittlung von höherer Sensitivität für AraC beizutragen¹²⁸. Außerdem waren THP-1 Zellen und Zellen von AML-Patient*innen nach Inkubation mit Überstand von Knochenmarkstromazellen, welcher lösliche Faktoren enthält, die die ENT1-Expression in den AML-Zellen signifikant herunterregulierten, resistenter gegen AraC¹²⁹. In der Studie von Dumontet *et al.*¹¹⁵ mit durch AraC-Selektion etablierten resistenteren K562 wurde allerdings keine differenzielle Expression und Transportaktivität von ENT1 festgestellt, sondern die höhere AraC-Resistenz vor allem auf die *NT5C2*-Hochregulation zurückgeführt¹¹⁵.

In MM-1 und MM-6 war der Effekt der Erhöhung der AraC-Resistenz bei mittleren eingesetzten Konzentrationen (0.8–2.4 μM) für MM-6 stärker. Ein möglicher Erklärungsansatz dafür ist die geringere ENT1-Expression in MM-6, wodurch bei mittleren AraC-Konzentrationen schon ein größerer Anteil der ENT1-Transporter inhibiert werden könnte als bei MM-1. Bei niedrigen und hohen AraC-Konzentrationen scheint die differenzielle ENT1-Expression keinen Unterschied zu machen. Es ist bekannt, dass bei AraC-Plasmakonzentrationen von 0.5-1 μM , welche bei Low-Dose-AraC-Behandlung mit 100-200 mg/m^2 im Fließgleichgewicht erreicht werden¹³⁰, die Expressionslevel von ENT1 und der durch ENT1 vermittelte Transport entscheidend sind für die AraC-Aufnahme in die Zelle^{13,131}. Dies entspricht in etwa dem Bereich, in dem in dieser Arbeit die ENT1-Expression für den Effekt der ENT1-Inhibition auf die AraC-Resistenz von MM-Zellen relevant ist. Dahingegen übersteigt bei höheren Plasmakonzentrationen $> 10 \mu\text{M}$ wie bei Hochdosistherapie mit AraC¹³² die Diffusionsrate von AraC den Pumpen-vermittelten Transport und die Phosphorylierungskapazität wird zum limitierenden Faktor für die Rate der intrazellulären Ara-CTP-Akkumulation^{13,131}. Zwischen der Ara-CTP-Akkumulation und dem Ansprechen auf AraC-Therapie konnte wiederum eine starke Korrelation gezeigt werden¹³³. Diese Erkenntnisse über die AraC-Aufnahme in die Zelle im Zusammenhang mit ENT1-Transport könnten die Beobachtungen an den MM-Zellen erklären.

Das Fusionsprotein ZCCHC7-ENT1, das in einem c-ALL-Patienten mit myeloischer Koexpression und Therapieresistenz entdeckt wurde, konnte stabil in Ba/F3-Zellen

exprimiert werden. Dabei zeigten sich höhere mRNA-Expressionslevel für das Konstrukt mit N-FLAG als für das mit C-FLAG. Hier sollte weiter untersucht werden, ob sich die unterschiedliche Expression des Fusionsproteins mit den verschiedenen lokalisierten FLAG-Tags auch auf Proteinebene im Western-Blot bestätigt. Weder hinsichtlich der AraC-Resistenz noch im Hinblick auf die IL-3-Abhängigkeit der Ba/F3-Zellen änderte die ZCCHC7-ENT1-Expression den Phänotyp. Die Relevanz der Mutation für das adverse Outcome des Patienten mit dem beschriebenen Fusionsgen kann jedoch hinsichtlich anderer nicht untersuchter Effekte nicht ausgeschlossen werden.

ZCCHC7 ist ein Gen, über das bisher wenig bekannt ist. Es kodiert für ein nukleoläres Protein, von dem vermutet wird, dass es für die rRNA-Degradation relevant ist¹³⁴. Daher wäre es interessant weiter zu prüfen, in welchem zellulären Kompartiment das Fusionsprotein aus dem membranständigen ENT1 und dem nukleolären ZCCHC7 exprimiert wird.

Insgesamt konnte im Rahmen dieser Arbeit die Herunterregulation von ENT1, welche zu einer geringeren AraC-Aufnahme in die Zelle führt, als ein Mechanismus für die Vermittlung von AraC-Resistenz im *KDM6A*-Knockdown festgestellt werden (Abbildung 27). ENT1 könnte daher eine mögliche therapeutische Zielstruktur bei *KDM6A*-mutierter AML sein. Ob und inwiefern weitere *KDM6A*-Zielgene an der AraC-Resistenz beteiligt sind, bleibt offen. Die im *KDM6A*-Knockdown festgestellte Resistenz gegen DNR kann jedoch durch eine veränderte ENT1-Expression nicht erklärt werden; die Daten sprechen dafür, dass DNR nicht durch ENT1 transportiert wird. Möglicherweise reguliert *KDM6A* weitere Zielgene, die im DNR-Metabolismus involviert sind.

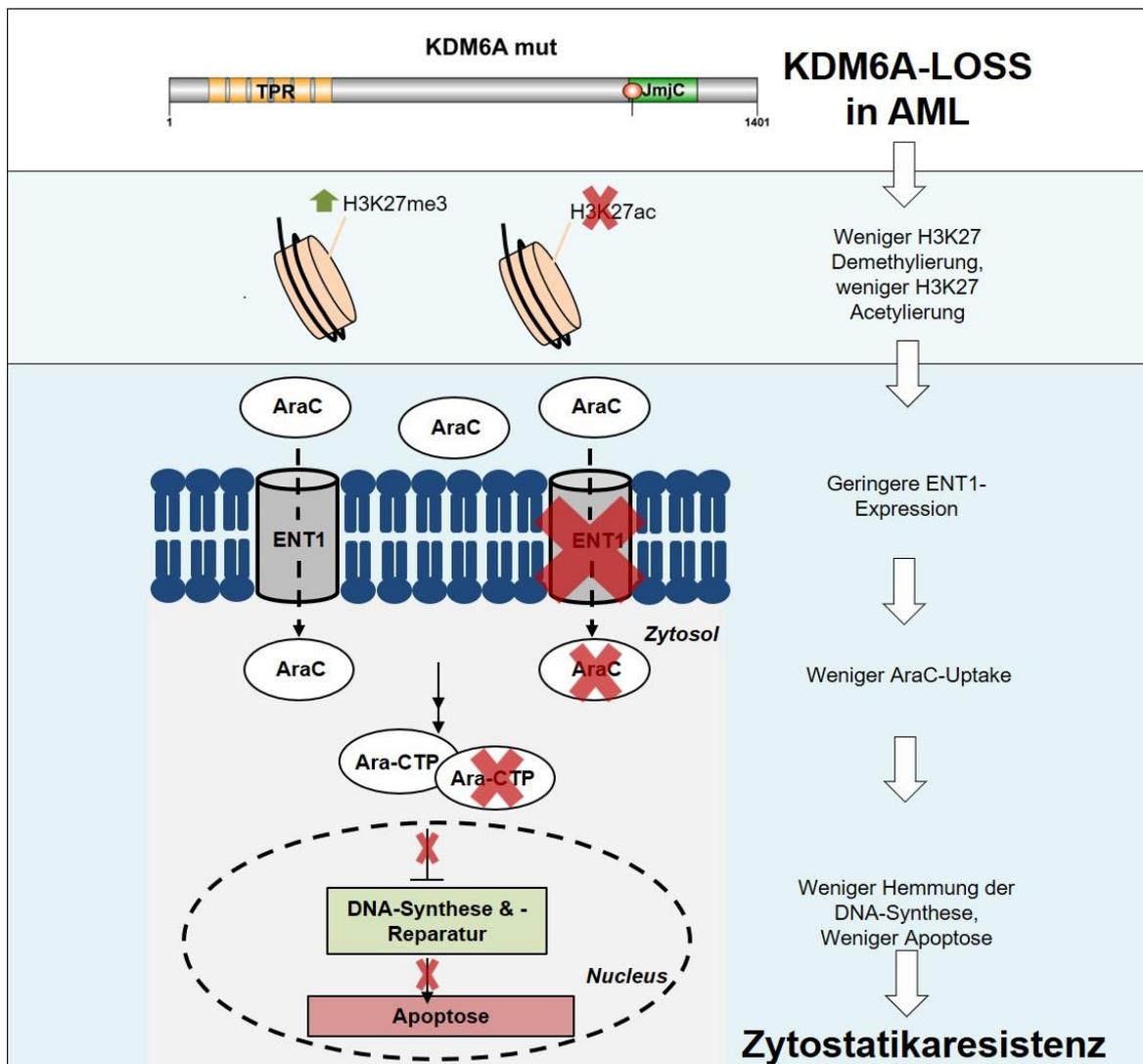


Abbildung 27 Mögliches Modell einer durch ENT1 vermittelten erhöhten AraC-Resistenz bei KDM6A-Funktionsverlust in AML-Zellen. In Zellen mit KDM6A-Funktionsverlust wird ENT1 herunterreguliert, möglicherweise durch geringere Demethylierung und Acetylierung von H3K27. Die zelluläre Aufnahme von AraC erfolgt hauptsächlich durch ENT1^{13,102}, welches intrazellulär zu Ara-CTP triphosphoryliert wird und bei Einbau in die DNA zur Apoptose führt. In KDM6A-defizienten Zellen wird durch Herunterregulation von ENT1 weniger AraC in die Zelle aufgenommen, sodass auch weniger Ara-CTP gebildet wird und es in geringerem Ausmaß zur Apoptose kommt.

4.4 PiggyBac KDM6A-Re-Expression

In dieser Arbeit wurde eine differenzielle Regulation der untersuchten Gene *NT5C2*, *SPARC* und *ENT1* bei Herunterregulation der KDM6A-Expression in verschiedenen myeloischen Zelllinien festgestellt. Dies war phänotypisch mit einer erhöhten Resistenz gegen die in der AML-Therapie verwendeten Zytostatika AraC und, abhängig von der Stärke des *KDM6A*-Knockdowns, auch gegen DNR verbunden⁵¹.

Den bisherigen Ergebnissen dieser Arbeit zufolge sollte der ursprüngliche Phänotyp hinsichtlich der Zytostatikaresistenz sowie die Regulation von *SPARC* und *ENT1*

wiederhergestellt werden, wenn KDM6A in *KDM6A*-Knockout-Zellen re-exprimiert wird. Dies wäre ein wichtiger Anhaltspunkt dafür, dass die untersuchten Gene, die nach unserer Annahme durch KDM6A reguliert werden, tatsächlich von der KDM6A-Expression abhängig sind und ihre differenzielle Regulation im *KDM6A*-Knockdown kein Off-Target-Effekt ist.

Mithilfe eines durch Doxycyclin induzierbaren PiggyBac-KDM6A-Expressionssystems konnten stabile KDM6A-re-exprimierende Zelllinien aus zwei K562 *KDM6A*-Knockout-Klonen #1 und #2 und THP-1, einer AML-Zelllinie mit einem natürlichen KDM6A-Verlust,^{51,111} etabliert werden. Hierbei war die Expression von KDM6A abhängig von der Doxycyclinbehandlung. Bei den unbehandelten Zellen wurde keine KDM6A-Expression detektiert und sie konnten somit als korrespondierende *KDM6A*-Knockout-Kontrollen verwendet werden. Um mögliche von der Demethylase-Aktivität abhängige Effekte festzustellen, wurden in den beiden K562 *KDM6A*-Knockout-Klonen #1 und #2 neben KDM6A-WT auch die Demethylase-tote Mutante KDM6A H1146A^{18,19} exprimiert. Die Stärke der KDM6A-Re-Expression erreichte 24 bis 48 h nach Induktion in K562 *KDM6A* KO #2 ähnliche Level wie bei den nativen Zellen (0.7–1.9-fach). Für die an sich kein KDM6A exprimierende Zelllinie THP-1 war kein Vergleichswert vorhanden.

In den untersuchten K562- und THP-1-Klonen wurde unter KDM6A-Re-Expression eine deutliche Hochregulation von SPARC und ENT1 festgestellt. In K562 erreichten die Expressionslevel von SPARC und ENT1 ähnliche Werte wie in den nativen Zellen. Dabei war die ENT1-Re-Expression unabhängig von der Demethylase-Aktivität. Die SPARC-Re-Expression wurde bislang nur in einem KDM6A-WT-re-exprimierenden Klon untersucht. Für die Beurteilung der Abhängigkeit der SPARC-Re-Expression von der KDM6A-Demethylase-Aktivität fehlt die Untersuchung von KDM6A H1146A-re-exprimierenden Klonen. Auffällig ist die in den nicht-induzierten THP-1 PB KDM6A #2 im Vergleich zu THP-1 nativ deutlich geringere *ENT1*-mRNA-Expression. Die alleinige Transduktion des nicht-induzierten Vektors, welche wie gezeigt keine KDM6A-Expression zur Folge hatte, sollte keine Änderung der Genregulation bewirken. Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine ungenaue Messung in den nativen THP-1-Zellen, für die nur ein Messwert vorhanden war. Hier sind weitere Kontrollmessungen notwendig.

Die Re-Expression von KDM6A-WT in K562 und THP-1 führte zu einer Wiederherstellung der AraC-Sensitivität. Dabei war die AraC-Sensitivität von K562 *KDM6A* KO #1 unter KDM6A-Re-Expression vergleichbar mit der von K562 *KDM6A* WT #1⁵¹. Dahingegen

bewirkte die KDM6A H1146A-Expression nur einen leichten Trend in Richtung höherer AraC-Sensitivität.

Sowohl die KDM6A-WT- als auch die KDM6A H1146A-Re-Expression hatten eine signifikante Verlangsamung der Proliferationsgeschwindigkeit in beiden K562 *KDM6A*-KO-Klonen und einem THP-1 PB KDM6A Klon #1 zur Folge, während bei THP-1 PB KDM6A #2 die Proliferationsgeschwindigkeit durch die KDM6A-WT-Re-Expression nicht beeinflusst wurde.

Die Funktion von KDM6A hinsichtlich der AraC-Resistenz scheint den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge abhängig von der Demethylase-Aktivität zu sein. Allerdings deuten die Ergebnisse einer ChIP-Sequenzierungsanalyse (ChIP-Seq) mit den induzierbaren Klonen mit PiggyBac-System auf eine Regulation der *ENT1*-Expression durch H3K27-Acetylierung, nicht aber durch H3K27-Methylierung, hin⁵¹. Damit vereinbar wäre die von der Demethylase-Aktivität unabhängige *ENT1*-Expression in den in dieser Arbeit untersuchten K562-Klonen. Der genaue Zusammenhang zwischen AraC-Resistenz, *ENT1*-Regulation und KDM6A-Demethylase-Aktivität bleibt unklar. Es bleibt zu klären, welche weiteren Demethylase-abhängigen Regulationsmechanismen ursächlich dafür sind, dass die AraC-Sensitivität bei Re-Expression der Demethylase-toten KDM6A-Mutante trotz *ENT1*-Hochregulation nicht wiederhergestellt wird.

Dahingegen deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Demethylase-Funktion für die Regulation der Wachstumsgeschwindigkeit nicht unbedingt relevant ist und durch andere Mechanismen als die AraC-Resistenz reguliert ist. Die Rolle von KDM6A in der Regulation der Zellproliferation ist bisher nicht ausreichend verstanden und scheint darüber hinaus Zelltyp-spezifisch zu sein. Ähnlich zu den Ergebnissen dieser Arbeit führte die Re-Expression von KDM6A in zwei *KDM6A*-null Zelllinien von ösophagealen Plattenepithelkarzinomen zu einer signifikanten Verlangsamung der Proliferation⁴⁵. Diese Beobachtungen würden zur Funktion von *KDM6A* als Tumorsuppressorgen passen⁴⁵. Andere Studien zeigten gegensätzlich dazu, dass shRNA-vermittelter *KDM6A*-Knockdown in Brustkrebszellen und in verschiedenen humanen leukämischen Zelllinien wie K562 die Zellproliferation inhibierte^{43,135}. KDM6A scheint eine kritische Rolle in der Regulation der Zellproliferation zu spielen, bei der abhängig vom zellulären Kontext sowohl Inaktivierung als auch erhöhte Expression von KDM6A zu einer Dysregulation führen kann. Demethylase-unabhängige Funktionen von KDM6A wie Histonlysineacetylierung und Chromatinremodelling^{50,52} könnten hier ursächlich sein.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten durch die Untersuchung weiterer Zellklone verifiziert werden. Die Betrachtung weiterer THP-1 Klone könnte Aufschluss darüber geben, ob die Re-Expression von KDM6A-WT in THP-1 die Wachstumsgeschwindigkeit beeinflusst, da sich dies anhand der Ergebnisse der beiden in dieser Arbeit untersuchten Klone mit diesbezüglich unterschiedlichem Verhalten nicht beurteilen lässt. Außerdem sollten Untersuchungen hinsichtlich der Mutante KDM6A H1146A in THP-1 und hinsichtlich der Daunorubicin-Sensitivität in den KDM6A re-exprimierenden Klonen durchgeführt werden. Des Weiteren wären Zytotoxizitätsassays mit PiggyBac ENT1 re-exprimierenden K562 *KDM6A*-Knockout-Zellen interessant.

4.5 KDM6A-Interaktionspartner

Interaktionspartner von KDM6A wurden mithilfe der Massenspektrometrie analysiert, um darunter weitere KDM6A-Zielgene zu finden, die an der Vermittlung der Zytostatikaresistenz beteiligt sein könnten. Zunächst wurden einige bekannte KDM6A-Interaktionspartner wie KMT2C (MLL3), KMT2D (MLL4) und DPY30 sowie andere mögliche Interaktionspartner detektiert.

In einer weiteren Analyse mit verschiedenen *KDM6A*-Konstrukten wurde die Anreicherung der Interaktionspartner zwischen KDM6A-WT und den KDM6A-Mutanten E1325X, L1103R und V1113Sfs*38 sowie dem N-terminalen (Q880X) und C-terminalen (880-1401) Teil von KDM6A verglichen. Es sollte dabei der Einfluss der KDM6A-Mutationen auf die Interaktion mit anderen Proteinen untersucht werden.

KMT2D wurde in der IP des C-terminalen KDM6A-Teils 880-1401 im Gegensatz zur IP des N-terminalen Teils kaum detektiert, obwohl KDM6A 880-1401 in der IP sogar stärker angereichert war als KDM6A Q880X. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass KMT2D am N-terminalen Teil von KDM6A bindet. In einer Studie an humanen Brustkrebszellen wurde gezeigt, dass der C-terminale Teil von KMT2D an KDM6A bindet¹³⁵. Nach unseren Erkenntnissen ist bisher aber nicht bekannt, mit welchem Teil von KDM6A KMT2D interagiert. Im N-terminalen Teil von KDM6A liegen sechs TPR-Domänen, die hoch konserviert sind und bekanntermaßen Protein-Protein-Interaktionen medieren^{23,24}. Möglicherweise interagiert auch KMT2D im Bereich der N-terminalen TPR-Domänen mit KDM6A. Bei den drei *KDM6A*- Loss-of-function(LOF)-Mutanten E1325X, L1103R und V1113Sfs*38 liegt die Alteration im Vergleich zu *KDM6A*-WT jeweils im C-terminalen Teil von KDM6A und der N-terminale Teil wurde durch die Mutationen nicht verändert. KMT2D

wurde in der IP der verschiedenen KDM6A-Mutanten geringer detektiert als bei KDM6A-WT. Allerdings wurden die KDM6A-Mutanten auch weniger stark angereichert als KDM6A-WT. Man könnte also spekulieren, dass dies die Annahme, dass KMT2D im N-terminalen KDM6A-Teil bindet, bestätigen könnte. Andererseits spricht es auch dagegen, dass KMT2D mechanistisch im Zusammenhang mit der alterierten Zytostatikaresistenz bei KDM6A-LOF steht.

Da die Ergebnisse der Massenspektrometrieanalyse mit den verschiedenen *KDM6A*-Konstrukten statistisch nicht signifikant sind, sind sie lediglich als Ausgangspunkt für weitere Analysen zu bewerten. Um die Ergebnisse zu verifizieren, wäre eine Co-Immunpräzipitation der verschiedenen *KDM6A*-Konstrukte mit KMT2D oder anderen potenziellen KDM6A-Interaktionspartnern sinnvoll. Außerdem wurde nur ein bereits bekannter Interaktionspartner von KDM6A exemplarisch genauer untersucht. Weitere bekannte und neue Interaktionspartner sollten betrachtet werden, um weitere KDM6A-Zielgene, die eine Zytostatikaresistenz in der AML vermitteln könnten, zu identifizieren.

5 Zusammenfassung

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne hämatologische Erkrankung mit insgesamt schlechter Prognose. Besonders Rezidive mit erhöhter Zytostatikaresistenz sind eine Herausforderung in der Behandlung der AML. KDM6A ist eine Histondemethylase, die als Tumorsuppressorgen in einer Vielzahl verschiedener Malignome wie auch der AML eine Rolle spielt. Vorherige Studien konnten unter anderem zeigen, dass die Repression der KDM6A-Funktion zu einer erhöhten Resistenz gegen die in der AML-Therapie eingesetzten Zytostatika Cytarabin (AraC) und Daunorubicin (DNR) führt. Die genauen zugrundeliegenden Mechanismen dafür sind allerdings noch unbekannt.

Ziel dieses Projekts war es, Zielgene von KDM6A hinsichtlich der Zytostatikaresistenz in der AML zu charakterisieren. Dazu wurden drei in der RNA-Sequenzierungsanalyse von *KDM6A*-Knockdown-Zellen differenziell regulierte und damit als potenzielle KDM6A-Zielgene identifizierte Gene *NT5C2*, *SPARC* und *ENT1* ausgewählt. Diese Gene sind bereits in verschiedenen Kontexten im Rahmen der Tumorgenese oder des Zytostatikametabolismus bekannt.

Überexpression von *NT5C2* in der murinen Pro-B-Zelllinie Ba/F3 führte zur Verlangsamung der Proliferation, möglicherweise im Rahmen eines *NT5C2*-vermittelten Loss-of-fitness-Phänotyps. Überexpression der GOF-Mutante *NT5C2* R367Q in derselben Zelllinie führte zu einer erhöhten Resistenz gegen 6-Thioguanin (6-TG), aber nicht gegen AraC. Da außerdem kein konsistenter Zusammenhang zwischen *KDM6A*- und *NT5C2*-Expression festgestellt werden konnte, wird angenommen, dass die *NT5C2*-Expression keinen Mechanismus für die *KDM6A*-vermittelte erhöhte Resistenz gegen AraC und DNR in der AML darstellt.

SPARC vermittelt diverse zellregulatorische Funktionen, unter anderem für Zellproliferation und Tumorgenese. In dieser Arbeit führte eine *SPARC*-Überexpression zu keinem veränderten Phänotyp hinsichtlich Proliferationsgeschwindigkeit oder Zytostatikaresistenz. Allerdings konnte ein konsistenter Zusammenhang zwischen *KDM6A*- und *SPARC*-Expression gezeigt werden, sowohl in verschiedenen *KDM6A*-Knockdown und -Knockout-Modellen als auch bei der *KDM6A*-Re-Expression. Die Ergebnisse deuten also auf eine Regulation von *SPARC* als Zielgen von *KDM6A* hin. Trotzdem kann eine erhöhte Zytostatikaresistenz von AML-Zelllinien unter *KDM6A*-Herunterregulation nicht direkt durch die differenzielle *SPARC*-Regulation erklärt werden.

ENT1 ist ein Nukleosidtransporter, der hauptverantwortlich für die zelluläre AraC-Aufnahme ist. Inhibition von *ENT1* führte zu einer erhöhten Resistenz gegen AraC in K562-

und MONO-MAC-Zellen. Die ENT1-Expression in den untersuchten Zelllinien korrelierte mit der KDM6A-Expression, sowohl im *KDM6A*-Knockdown und -Knockout als auch bei der KDM6A-Re-Expression in *KDM6A*-Knockout-Zellen. Dahingegen konnte kein Zusammenhang zwischen der Fusion von *ENT1* mit dem Gen *ZCCHC7* und einer veränderten AraC-Resistenz festgestellt werden.

Re-Expression von KDM6A in *KDM6A*-Knockout-Zellen bewirkte eine Wiederherstellung der AraC-Sensitivität in Abhängigkeit von der Demethylase-Aktivität und eine Verlangsamung der Proliferationsgeschwindigkeit unabhängig von der Demethylase-Funktion. Insgesamt könnte eine herunterregulierte ENT1-Expression vermittelt durch KDM6A-Funktionsverlust eine höhere Resistenz gegen AraC und damit einen Selektionsvorteil unter AML-Therapie erklären.

Außerdem konnten im Rahmen von Massenspektrometrieanalysen KMT2D und einige weitere bekannte Interaktionspartner von KDM6A bestätigt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass KMT2D im N-terminalen KDM6A-Teil bindet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Rahmen dieses Projekts unter den drei untersuchten Genen *NT5C2*, *SPARC* und *ENT1* die Herunterregulation des AraC-Transporters ENT1 als möglicher Mechanismus für die erhöhte Resistenz gegen AraC bei KDM6A-Funktionsverlust aufgedeckt wurde. Damit ist ENT1 eine mögliche therapeutische Zielstruktur bei *KDM6A*-mutierter AML.

6 Literaturverzeichnis

1. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut: Datenbankabfrage mit Schätzung der Inzidenz, Prävalenz und des Überlebens von Krebs in Deutschland auf Basis der epidemiologischen Landeskrebsregisterdaten (DOI: 10.18444/5.03.01.0005.0014.0001). Mortalitätsdaten bereitgestellt vom Statistischen Bundesamt. www.krebsdaten.de/abfrage, Letzte Aktualisierung: 17.12.2019, Abrufdatum 20.12.2020.
2. Shallis RM, Wang R, Davido A, Ma X, Zeidan AM. Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. *Blood Rev.* 2019;36:70-87. doi:10.1016/j.blre.2019.04.005
3. Krywinkiel KI, Spix C. Epidemiologie akuter Leukämien in Deutschland. *Onkologe.* 2017;7(23):499-503. doi:10.1007/s00761-017-0249-z
4. Herold G. *Innere Medizin 2021*. Gerd Herold 2020.
5. Röllig C, Beelen, Dietrich Wilhelm Braess J, Greil R, Niederwieser, Dietger Passweg J, Reinhardt D, Schlenk RF. Akute myeloische Leukämie (AML). *onkopedia leitlinien.* 2019. doi:10.1007/978-3-662-42627-2_1
6. Southam CM, Craver LF, Dargeon HW, Burchenal JH. A study of the natural history of acute leukemia with special reference to the duration of the disease and the occurrence of remissions. *Cancer.* 1951;4(1):39-59. doi:10.1002/1097-0142(195101)4:1<39::aid-cnrcr2820040105>3.0.co;2-g
7. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016;127(20):2391-2405. doi:10.1182/blood-2016-03-643544
8. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, et al. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias. *Br J Haematol.* 1976;33(4):451-458. doi:10.1111/j.1365-2141.1976.tb03563.x.
9. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 2009;114(5):937-951. doi:10.1182/blood-2009-03-209262.
10. Burnett A, Wetzler M, Löwenberg B. Therapeutic Advances in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol.* 2011;29(5):487-494. doi:10.1200/JCO.2010.30.1820
11. Coulthard S, Hogarth L. The thiopurines: An update. *Invest New Drugs.* 2005;23(6):523-532. doi:10.1007/s10637-005-4020-8
12. Gewirtz DA. A Critical Evaluation of the Mechanisms of Action Proposed for the Antitumor Effects of the Anthracycline Antibiotics Adriamycin and Daunorubicin. *Biochem Pharmacol.* 1999;57(7):727-741. doi:10.1016/s0006-2952(98)00307-4
13. Lamba JK. Genetic factors influencing cytarabine therapy. *Pharmacogenomics.* 2009;10(10):1257-1274. doi:10.2217/pgs.09.118
14. de Boer NKH, van Bodegraven AA, Jharap B, de Graaf P, Mulder CJJ. Drug Insight: pharmacology and toxicity of thiopurine therapy in patients with IBD. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2007;4(12):686-694. doi:10.1038/ncpgasthep1000
15. Megias-Vericat JE, Martínez-Cuadron D, Herrero MJ, et al. Pharmacogenetics of Metabolic Genes of Anthracyclines in Acute Myeloid Leukemia. *Curr Drug Metab.* 2017;19(1):55-74. doi:10.2174/1389200218666171101124931
16. Stief SM. The role of KDM6A in the clonal evolution of acute myeloid leukemia. 2019.
17. Agger K, Cloos PAC, Christensen J, et al. UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. *Nature.* 2007;449(7163):731-735. doi:10.1038/nature06145
18. Lee MG, Villa R, Trojer P, et al. Demethylation of H3K27 Regulates Polycomb Recruitment and H2A Ubiquitination. *Science (80-).* 2007;318(5849):447-450. doi:10.1126/science.1149042
19. Hong S, Cho Y-W, Yu L-R, Yu H, Veenstra TD, Ge K. Identification of JmjC domain-containing UTX and JMJD3 as histone H3 lysine 27 demethylases. *PNAS.* 2007;104(47):18439-18444. doi:10.1073/pnas.0707292104
20. Schuettengruber B, Chourrout D, Vervoort M, Leblanc B, Cavalli G. Genome Regulation by Polycomb and Trithorax Proteins. *Cell.* 2007;128(4):735-745. doi:10.1016/j.cell.2007.02.009
21. Kouzarides T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell.* 2007;128(4):693-705. doi:10.1016/j.cell.2007.02.005
22. Klose RJ, Kallin EM, Zhang Y. JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat Rev Genet.* 2006;7(9):715-727. doi:10.1038/nrg1945
23. Smith RL, Redd MJ, Johnson AD. The tetratricopeptide repeats of Ssn6 interact with the homeo domain of a2. *Genes Dev.* 1995;9(23):2903-2910. doi:10.1101/gad.9.23.2903
24. Das AK, Cohen PTW, Barford D. The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J.* 1998;17(5):1192-1199. doi:10.1093/emboj/17.5.1192
25. Greenfield A, Carrel L, Pennisi D, et al. The UTX gene escapes X inactivation in mice and humans.

- Hum Mol Genet.* 1998;7(4):737-742. doi:10.1093/hmg/7.4.737
26. Van der Meulen J, Sanghvi V, Mavrikakis K, et al. The H3K27me3 demethylase UTX is a gender-specific tumor suppressor in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2015;125(1):13-21. doi:10.1182/blood-2014-05-577270.H.-G.W.
 27. Issaeva I, Zonis Y, Rozovskaia T, et al. Knockdown of ALR (MLL2) Reveals ALR Target Genes and Leads to Alterations in Cell Adhesion and Growth. *Mol Cell Biol.* 2007;27(5):1889-1903. doi:10.1128/MCB.01506-06
 28. Wang L, Shilatifard A. UTX Mutations in Human Cancer. *Cancer Cell.* 2019;35(2):168-176. doi:10.1016/j.ccell.2019.01.001
 29. Froimchuk E, Jang Y, Ge K. Histone H3 lysine 4 methyltransferase KMT2D. *Gene.* 2017;627:337-342. doi:10.1016/j.gene.2017.06.056
 30. Lee J-E, Wang C, Xu S, et al. H3K4 mono- and di-methyltransferase MLL4 is required for enhancer activation during cell differentiation. *Elife.* 2013;2(e01503):1-25. doi:10.7554/eLife.01503
 31. Creighton MP, Cheng AW, Welstead GG, et al. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *PNAS.* 2010;107(50):21931-21936. doi:10.1073/pnas.1016071107
 32. Rada-Iglesias A, Bajpai R, Swigut T, Brugmann SA, Flynn RA, Wysocka J. A unique chromatin signature uncovers early developmental enhancers in humans. *Nature.* 2011;470(7333):279-285. doi:10.1038/nature09692
 33. Wang C, Lee J-E, Lai B, et al. Enhancer priming by H3K4 methyltransferase MLL4 controls cell fate transition. *PNAS.* 2016;113(42):11871-11876. doi:10.1073/pnas.1606857113
 34. Ernst P, Vakoc CR. WRAD: enabler of the SET1-family of H3K4 methyltransferases. *Brief Funct Genomics.* 2012;11(3):217-226. doi:10.1093/bfpg/els017
 35. Jang Y, Wang C, Zhuang L, Liu C, Ge K. H3K4 Methyltransferase Activity Is Required for MLL4 Protein Stability. *J Mol Biol.* 2017;429(13):2046-2054. doi:10.1016/j.jmb.2016.12.016
 36. Kim D-H, Tang Z, Shimada M, et al. Histone H3K27 Trimethylation Inhibits H3 Binding and Function of SET1-Like H3K4 Methyltransferase Complexes. *Mol Cell Biol.* 2013;33(24):4936-4946. doi:10.1128/MCB.00601-13
 37. Tie F, Banerjee R, Conrad PA, Scacheri PC, Harte PJ. Histone Demethylase UTX and Chromatin Remodeler BRM Bind Directly to CBP and Modulate Acetylation of Histone H3 Lysine 27. *Mol Cell Biol.* 2012;32(12):2323-2334. doi:10.1128/MCB.06392-11
 38. Liu W, Xie Y, Ma J, et al. IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences. *Bioinformatics.* 2015;31(20):3359-3361. doi:10.1093/bioinformatics/btv362
 39. Lee S, Lee JW, Lee S. UTX, a histone H3-lysine 27 demethylase, acts as a critical switch to activate the cardiac developmental program. *Dev Cell.* 2012;22(1):25-37. doi:10.1016/j.devcel.2011.11.009.UTX
 40. Wang C, Lee J, Cho Y, et al. UTX regulates mesoderm differentiation of embryonic stem cells independent of H3K27 demethylase activity. *PNAS.* 2012;109(38):15324-15329. doi:10.1073/pnas.1204166109
 41. Shpargel KB, Sengoku T, Yokoyama S, Magnuson T. UTX and UTY Demonstrate Histone Demethylase-Independent Function in Mouse Embryonic Development. *PLOS Genet.* 2012;8(9):1-17. doi:10.1371/journal.pgen.1002964
 42. Thieme S, Gyárfás T, Richter C, et al. The histone demethylase UTX regulates stem cell migration and hematopoiesis. *Blood.* 2013;121(13):2462-2473. doi:10.1182/blood-2012-08-452003.T.G.
 43. Liu J, Mercher T, Scholl C, Brumme K, Gilliland DG, Zhu N. A functional role for the histone demethylase UTX in normal and malignant hematopoietic cells. *Exp Hematol.* 2012;40(6):487-498. doi:10.1016/j.exphem.2012.01.017
 44. Lan F, Bayliss PE, Rinn JL, et al. A histone H3 lysine 27 demethylase regulates animal posterior development. *Nature.* 2007;449(7163):689-695. doi:10.1038/nature06192
 45. van Haaften G, Dalgliesh GL, Davies H, et al. Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase, UTX, in human cancer. *Nat Genet.* 2009;41(5):521-523. doi:10.1038/ng.349.Somatic
 46. Nickerson ML, Dancik GM, Im KM, et al. Concurrent Alterations in TERT, KDM6A, and the BRCA Pathway in Bladder Cancer. *Clin Cancer Res.* 2014;20(18):4935-4948. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0330
 47. Huether R, Dong L, Chen X, et al. The landscape of somatic mutations in epigenetic regulators across 1,000 paediatric cancer genomes. *Nat Commun.* 2014;5:1-7. doi:10.1038/ncomms4630
 48. Robinson G, Parker M, Kranenburg TA, et al. Novel mutations target distinct subgroups of medulloblastoma. *Nature.* 2012;448(7409):43-48. doi:10.1038/nature11213
 49. Ntziachristos P, Tsirigos A, Welstead GG, et al. Contrasting roles of histone 3 lysine 27 demethylases in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature.* 2014;514(7523):513-517. doi:10.1038/nature13605
 50. Arcipowski KM, Martinez CA, Ntziachristos P. Histone demethylases in physiology and cancer: a tale

- of two enzymes, JMJD3 and UTX. *Curr Opin Genet Dev.* 2016;36:59-67. doi:10.1016/j.gde.2016.03.010
51. Stief SM, Hanneforth A-L, Weser S, et al. Loss of KDM6A confers drug resistance in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2020;34:50-62. doi:10.1038/s41375-019-0497-6
 52. Gozdecka M, Meduri E, Mazan M, et al. UTX-mediated enhancer and chromatin remodeling suppresses myeloid leukemogenesis through noncatalytic inverse regulation of ETS and GATA programs. *Nat Genet.* 2018;50(6):883-894. doi:10.1038/s41588-018-0114-z
 53. Greif PA, Hartmann L, Vosberg S, et al. Evolution of Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia During Therapy and Relapse : An Exome Sequencing Study of 50 Patients. *Clin Cancer Res.* 2018;24(7):1716-1727. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-2344
 54. Vick B, Rothenberg M, Sandhöfer N, et al. An Advanced Preclinical Mouse Model for Acute Myeloid Leukemia Using Patients' Cells of Various Genetic Subgroups and In Vivo Bioluminescence Imaging. *PLoS One.* 2015;10(3):e0120925. doi:10.1371/journal.pone.0120925
 55. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 2016;374(23):2209-2221. doi:10.1056/NEJMoa1516192
 56. Bianchi V, Spychala J. Mammalian 5'-Nucleotidases. *J Biol Chem.* 2003;278(47):46195-46198. doi:10.1074/jbc.R300032200
 57. Pinto RM, Canales J, Faraldo A, Sillero A, Sillero MAG. Cytosol 5'-nucleotidase from artemia embryos. Purification and properties. *Comp Biochem Physiol.* 1987;86(1):49-53. doi:10.1016/0305-0491(87)90173-8
 58. Naito Y, Tsushima K. Cytosol 5'-nucleotidase from chicken liver purification and some properties. *Biochim Biophys Acta.* 1976;438(1):159-168. doi:10.1016/0005-2744(76)90232-1
 59. Spychala J, Madrid-Marina V, Fox IH. High Km Soluble 5'-Nucleotidase from Human Placenta. Properties and Allosteric Regulation by IMP and ATP. *J Biol Chem.* 1988;263(35):18759-18765.
 60. Gazzola C, Ferraro P, Moras M, Reichard P, Bianchi V. Cytosolic High Km 5'-Nucleotidase and 5'(3')-Deoxyribonucleotidase in Substrate Cycles Involved in Nucleotide Metabolism. *J Biol Chem.* 2001;276(9):6185-6190. doi:10.1074/jbc.M007623200
 61. Brouwer C, Vogels-Mentink TM, Keizer-Garritsen JJ, et al. Role of 5'-nucleotidase in thiopurine metabolism: Enzyme kinetic profile and association with thio-GMP levels in patients with acute lymphoblastic leukemia during 6-mercaptopurine treatment. *Clin Chim Acta.* 2005;361(1-2):95-103. doi:10.1016/j.cccn.2005.05.006
 62. Galmarini CM, Graham K, Thomas X, et al. Expression of high Km 5'-nucleotidase in leukemic blasts is an independent prognostic factor in adults with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2001;98(6):1922-1926. doi:10.1182/blood.V98.6.1922
 63. Galmarini CM, Thomas X, Calvo F, et al. In vivo mechanisms of resistance to cytarabine in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2002;117(4):860-868. doi:10.1046/j.1365-2141.2002.03538.x
 64. Galmarini MG, Cros E, Thomas E, Jordheim L, Dumontet C. The prognostic value of cN-II and cN-III enzymes in adult acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2005;90(12):1699-1701.
 65. Galmarini CM. What does over-expression of cN-II enzyme signify in haematological malignancies? *Leuk Res.* 2007;31(10):1325-1326. doi:10.1016/j.leukres.2007.02.006
 66. Galmarini CM, Thomas X, Calvo F, et al. Potential mechanisms of resistance to cytarabine in AML patients. *Leuk Res.* 2002;26(7):621-629. doi:10.1016/s0145-2126(01)00184-9
 67. Galmarini CM, Thomas X, Graham K, et al. Deoxycytidine kinase and cN-II nucleotidase expression in blast cells predict survival in acute myeloid leukaemia patients treated with cytarabine. *Br J Haematol.* 2003;122(1):53-60. doi:10.1046/j.1365-2141.2003.04386.x
 68. Galmarini CM, Mackey JR, Dumontet C. Nucleoside analogues in cancer treatment. *Lancet Oncol.* 2002;3(7):415-424. doi:10.1016/s1470-2045(02)00788-x
 69. Dieck CL, Ferrando AA. Genetics and mechanisms of NT5C2-driven chemotherapy resistance in relapsed ALL. *Blood.* 2019;133(19):2263-2268. doi:10.1182/blood-2019-01-852392
 70. Tzoneva G, Perez-Garcia A, Carpenter Z, et al. Activating mutations in the NT5C2 nucleotidase gene drive chemotherapy resistance in relapsed ALL. *Nat Med.* 2013;19(3):368-673. doi:10.1038/nm.3078
 71. Meyer JA, Wang J, Hogan LE, et al. Relapse-specific mutations in NT5C2 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2013;45(3):290-296. doi:10.1038/ng.2558
 72. Bárcenas-López DA, Mendiola-Soto DK, Núñez-Enríquez JC, Mejía-Arangur JM, Hidalgo-Miranda A, Jiménez-Morales S. Promising genes and variants to reduce chemotherapy adverse effects in acute lymphoblastic leukemia. *Transl Oncol.* 2021;14(1):100978. doi:10.1016/j.tranon.2020.100978
 73. Jordheim LP. Expanding the clinical relevance of the 5'-nucleotidase cN-II / NT5C2. *Purinergic Signal.* 2018;14(4):321-329. doi:10.1007/s11302-018-9627-2
 74. Bornstein P, Sage EH. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol.* 2002;14(5):608-616. doi:10.1016/s0955-0674(02)00361-7
 75. Lane TF, Sage EH. The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *FASEB*

- J.* 1994;8(2):163-173.
76. Jacob K, Webber M, Benayahu D, Kleinman HK. Osteonectin Promotes Prostate Cancer Cell Migration and Invasion: A Possible Mechanism for Metastasis to Bone. *Cancer Res.* 1999;59(17):4453-4457.
 77. Nie J, Sage EH. SPARC Inhibits Adipogenesis by Its Enhancement of β -Catenin Signaling. *J Biol Chem.* 2009;284(2):1279-1290. doi:10.1074/jbc.M808285200
 78. Bradshaw AD, Reed MJ, Sage EH. SPARC-null Mice Exhibit Accelerated Cutaneous Wound Closure. *J Histochem Cytochem.* 2002;50(1):1-10. doi:10.1177/002215540205000101
 79. Brekken RA, Puolakkainen P, Graves DC, Workman G, Lubkin SR, Sage EH. Enhanced growth of tumors in SPARC null mice is associated with changes in the ECM. *J Clin Invest.* 2003;111(4):487-495. doi:10.1172/JCI16804
 80. Tai IT, Tang MJ. SPARC in cancer biology: Its role in cancer progression and potential for therapy. *Drug Resist Updat.* 2008;11(6):231-246. doi:10.1016/j.drug.2008.08.005
 81. Podhajcer OL, Benedetti L, Girotti MR, Prada F, Salvatierra E, Llera AS. The role of the matricellular protein SPARC in the dynamic interaction between the tumor and the host. *Cancer Metastasis Rev.* 2008;27(3):523-537. doi:10.1007/s10555-008-9135-x
 82. Lien HC, Hsiao YH, Lin YS, et al. Molecular signatures of metaplastic carcinoma of the breast by large-scale transcriptional profiling: identification of genes potentially related to epithelial – mesenchymal transition. *Oncogene.* 2007;26(57):7859-7871. doi:10.1038/sj.onc.1210593
 83. Ledda MF, Adris S, Bravo AI, et al. Suppression of SPARC expression by antisense RNA abrogates the tumorigenicity of human melanoma cells. *Nat Med.* 1997;3(2):171-176. doi:10.1038/nm0297-171
 84. Rempel SA, Golembieski WA, Ge S, et al. SPARC: A Signal of Astrocytic Neoplastic Transformation and Reactive Response in Human Primary and Xenograft Gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1998;57(12):1122-1121. doi:10.1097/00005072-199812000-00002
 85. Yiu GK, Chan WY, Ng S, et al. SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine) Induces Apoptosis in Ovarian Cancer Cells. *Am J Pathol.* 2001;159(2):609-622. doi:10.1016/S0002-9440(10)61732-4
 86. Cheetham S, Tang MJ, Mesak F, Kennecke H, Owen D, Tai IT. SPARC promoter hypermethylation in colorectal cancers can be reversed by 5-Aza-2'-deoxycytidine to increase SPARC expression and improve therapy response. *Br J Cancer.* 2008;98(11):1810-1819. doi:10.1038/sj.bjc.6604377
 87. Sato N, Fukushima N, Maehara N, et al. SPARC/osteonectin is a frequent target for aberrant methylation in pancreatic adenocarcinoma and a mediator of tumor-stromal interactions. *Oncogene.* 2003;22(32):5021-5030. doi:10.1038/sj.onc.1206807
 88. Wong SLI, Sukkar MB. The SPARC protein: an overview of its role in lung cancer and pulmonary fibrosis and its potential role in chronic airways disease. *Br J Pharmacol.* 2017;174(1):3-14. doi:10.1111/bph.13653
 89. Infante JR, Matsubayashi H, Sato N, et al. Peritumoral Fibroblast SPARC Expression and Patient Outcome With Resectable Pancreatic Adenocarcinoma. *J Clin Oncol.* 2007;25(3):319-325. doi:10.1200/JCO.2006.07.8824
 90. Alachkar H, Santhanam R, Maharry K, et al. SPARC promotes leukemic cell growth and predicts acute myeloid leukemia outcome. *J Clin Invest.* 2014;124(4):1512-1524. doi:10.1172/JCI70921.1512
 91. Hosono N. Genetic abnormalities and pathophysiology of MDS. *Int J Clin Oncol.* 2019;24(8):885-892. doi:10.1007/s10147-019-01462-6
 92. Giagounidis A, Mufti GJ, Fenaux P, Germing U, List A, MacBeth KJ. Lenalidomide as a disease-modifying agent in patients with del (5q) myelodysplastic syndromes: linking mechanism of action to clinical outcomes. *Ann Hematol.* 2014;93(1):1-11. doi:10.1007/s00277-013-1863-5
 93. Pellagatti A, Jädersten M, Forsblom A-M, et al. Lenalidomide inhibits the malignant clone and up-regulates the SPARC gene mapping to the commonly deleted region in 5q-syndrome patients. *PNAS.* 2007;104(27):11406-11411. doi:10.1073/pnas.0610477104
 94. Clarke ML, Mackey JR, Baldwin SA, Young JD, Cass CE. The role of membrane transporters in cellular resistance to anticancer nucleoside drugs. *Cancer Treat Res.* 2002;112:27-47. doi:10.1007/978-1-4615-1173-1_2
 95. Mackey JR, Baldwin SA, Young JD, Cass CE. Nucleoside transport and its significance for anticancer drug resistance. *Drug Resist Updat.* 1998;1(5):310-324. doi:10.1016/S1368-7646(98)80047-2
 96. Murray AW. The Biological Significance of Purine Salvage. *Annu Rev Biochem.* 1971;40:811-826. doi:10.1146/annurev.bi.40.070171.004115
 97. Young JD, Yao SYM, Baldwin JM, Cass CE, Baldwin SA. The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. *Mol Aspects Med.* 2013;34(2-3):529-547. doi:10.1016/j.mam.2012.05.007
 98. Pennycooke M, Chaudary N, Shuralyova I, Zhang Y, Coe IR. Differential Expression of Human Nucleoside Transporters in Normal and Tumor Tissue. *Biochem Biophys Res Commun.*

- 2001;280(3):951-959. doi:10.1006/bbrc.2000.4205
99. Lai Y, Tse C-M, Unadkat JD. Mitochondrial Expression of the Human Equilibrative Nucleoside Transporter 1 (hENT1) Results in Enhanced Mitochondrial Toxicity of Antiviral Drugs. *J Biol Chem.* 2004;279(6):4490-4497. doi:10.1074/jbc.M307938200
100. Mani RS, Hammond JR, Marjan MJ, et al. Demonstration of Equilibrative Nucleoside Transporters (hENT1 and hENT2) in Nuclear Envelopes of Cultured Human Choriocarcinoma (BeWo) Cells by Functional Reconstitution in Proteoliposomes. *J Biol Chem.* 1998;273(46):30818-30825. doi:10.1074/jbc.273.46.30818
101. Cabrita MA, Baldwin SA, Young JD, Cass CE. Molecular biology and regulation of nucleoside and nucleobase transporter proteins in eukaryotes and prokaryotes. *Biochem Cell Biol.* 2002;80(5):623-638. doi:10.1139/o02-153
102. Hubeek I, Stam RW, Peters GJ, et al. The human equilibrative nucleoside transporter I mediates in vitro cytarabine sensitivity in childhood acute myeloid leukaemia. *Br J Cancer.* 2005;93(12):1388-1394. doi:10.1038/sj.bjc.6602881
103. Griffiths M, Beaumont N, Yao SYM, et al. Cloning of a human nucleoside transporter implicated in the cellular uptake of adenosine and chemotherapeutic drugs. *Nat Med.* 1997;3(1):89-93.
104. Griffiths M, Yao SYM, Abidi F, et al. Molecular cloning and characterization of a nitrobenzylthioinosine-insensitive (ei) equilibrative nucleoside transporter from human placenta. *Biochem J.* 1997;328:739-743. doi:10.1042/bj3280739
105. Soumillon M, Cacchiarelli D, Semrau S, van Oudenaarden A, Mikkelsen TS. Characterization of directed differentiation by high-throughput single-cell RNA-Seq. *bioRxiv.* 2014. doi:10.1101/003236
106. Zjiegler-Heitbrock HWL, Thiel E, Fütterer A, Herzog V, Wirtz A, Riethmüller G. Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int J Cancer.* 1988;41(3):456-461. doi:10.1002/ijc.2910410324
107. Burnett AK, Goldstone AH, Stevens RMF, et al. 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. *Lancet.* 1998;351(9104):700-708. doi:10.1016/S0140-6736(97)09214-3
108. Büchner T, Urbanitz D, Emmerich B, et al. Multicentre study on intensified remission induction therapy for acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* 1982;6(6):827-831. doi:10.1016/0145-2126(82)90066-2
109. Bicket A, Coe IR. N-linked glycosylation of N48 is required for equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) function. *Biosci Rep.* 2016;36(4):e00376. doi:10.1042/BSR20160063
110. Sundaram M, Yao SYM, Ingram JC, et al. Topology of a Human Equilibrative, Nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-sensitive Nucleoside Transporter (hENT1) Implicated in the Cellular Uptake of Adenosine and Anti-cancer Drugs. *J Biol Chem.* 2001;276(48):45270-45275. doi:10.1074/jbc.M107169200
111. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer.* 1980;26(2):171-176. doi:10.1002/ijc.2910260208
112. Tzoneva G, Dieck CL, Oshima K, et al. Clonal evolution mechanisms in NT5C2 mutant-relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Nature.* 2018;533(7689):511-514. doi:10.1038/nature25186
113. Itoh R, Echizen H, Higuchi M, Oka J, Yamada K. A comparative study on tissue distribution and metabolic adaptation of IMP-GMP 5'-Nukleotidase. *Comp Biochem Physiol.* 1992;103(1):153-159. doi:10.1016/0305-0491(92)90427-s
114. Cividini F, Cros-Perrial E, Pesi R, et al. Cell proliferation and drug sensitivity of human glioblastoma cells are altered by the stable modulation of cytosolic 5'-nucleotidase II. *Int J Biochem Cell Biol.* 2015;65:222-229. doi:10.1016/j.biocel.2015.06.011
115. Dumontet C, Fabianowska-Majewska K, Mantincic D, et al. Common resistance mechanisms to deoxynucleoside analogues in variants of the human erythroleukaemic line K562. *Br J Haematol.* 1999;106(1):78-85. doi:10.1046/j.1365-2141.1999.01509.x
116. Mazzon C, Rampazzo C, Scaini MC, et al. Cytosolic and mitochondrial deoxyribonucleotidases: activity with substrate analogs, inhibitors and implications for therapy. *Biochem Pharmacol.* 2003;66(3):471-479. doi:10.1016/S0006-2952(03)00290-9
117. Hunsucker SA, Mitchell BS, Spsychala J. The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. *Pharmacol Ther.* 2005;107(1):1-30. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.01.003
118. Iruela-Arispe ML, Lane TF, Redmond D, et al. Expression of SPARC during Development of the Chicken Chorioallantoic Membrane: Evidence for Regulated Proteolysis In Vivo. *Mol Biol Cell.* 1995;6(3):327-343. doi:10.1091/mbc.6.3.327
119. Podgorski I, Linebaugh BE, Koblinski JE, et al. Bone Marrow-Derived Cathepsin K Cleaves SPARC in Bone Metastasis. *Am J Pathol.* 2009;175(3):1255-1269. doi:10.2353/ajpath.2009.080906
120. Nakagawa T, Matozaki S, Murayama T, et al. Establishment of a leukaemic cell line from a patient

- with acquisition of chromosomal abnormalities during disease progression in myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol.* 1993;85(3):469-476. doi:10.1111/j.1365-2141.1993.tb03334.x
121. Nian Q, Xiao Q, Wang L, et al. SPARC silencing inhibits the growth of acute myeloid leukemia transformed from myelodysplastic syndrome via induction of cell cycle arrest and apoptosis. *Int J Mol Med.* 2014;33(4):856-862. doi:10.3892/ijmm.2014.1648
 122. Nian Q, Chi J, Xiao Q, et al. SPARC ectopic overexpression inhibits growth and promotes programmed cell death in acute myeloid leukemia transformed from myelodysplastic syndrome cells, alone and in combination with Ara-C treatment. *Oncol Rep.* 2015;34(3):1406-1414. doi:10.3892/or.2015.4114
 123. Wang L, Wang W, Xu Y, Wang Q. Low Levels of SPARC are Associated with Tumor Progression and Poor Prognosis in Human Endometrial Carcinoma. *Onco Targets Ther.* 2020;13:11549-11569. doi:10.2147/OTT.S277795
 124. Liu Y, Feng Y, Wang X, et al. SPARC Negatively Correlates With Prognosis After Transarterial Chemoembolization and Facilitates Proliferation and Metastasis of Hepatocellular Carcinoma via ERK/MMP Signaling Pathways. *Front Oncol.* 2020;10:813. doi:10.3389/fonc.2020.00813
 125. Giallongo C, La Cava P, Tibullo D, et al. SPARC expression in CML is associated to imatinib treatment and to inhibition of leukemia cell proliferation. *BMC Cancer.* 2013;13:60. doi:10.1186/1471-2407-13-60
 126. Grosso S, Puissant A, Dufies M, et al. Gene expression profiling of imatinib and PD166326-resistant CML cell lines identifies Fyn as a gene associated with resistance to BCR-ABL inhibitors. *Mol Cancer Ther.* 2009;8(7):1924-1933. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0168
 127. Grañe-Boladeras N, Williams D, Tarmakova Z, et al. Oligomerization of equilibrative nucleoside transporters: a novel regulatory and functional mechanism involving PKC and PP1. *FASEB J.* 2019;33(3):3841-3850. doi:10.1096/fj.201800440RR
 128. Stam RW, Den Boer ML, Meijerink JPP, et al. Differential mRNA expression of Ara-C-metabolizing enzymes explains Ara-C sensitivity in MLL gene-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2003;101(4):1270-1276. doi:10.1182/blood-2002-05-1600
 129. Macanas-Pirard P, Broekhuizen R, González A, et al. Resistance of leukemia cells to cytarabine chemotherapy is mediated by bone marrow stroma, involves cell-surface equilibrative nucleoside transporter-1 removal and correlates with patient outcome. *Oncotarget.* 2017;8(14):23073-23086. doi:10.18632/oncotarget.14981
 130. Weinstein HJ, Griffin TW, Feeney J, Cohen HJ, Propper RD, Sallan SE. Pharmacokinetics of Continuous Intravenous and Subcutaneous Infusions of Cytosine Arabinoside. *Blood.* 1982;59(6):1351-1353.
 131. White JC, Rathmell JP, Capizzi RL. Membrane transport influences the rate of accumulation of cytosine arabinoside in human leukemia cells. *J Clin Invest.* 1987;79(2):380-387. doi:10.1172/JCI112823
 132. Capizzi RL, Yang J-L, Cheng E, et al. Alteration of the Pharmacokinetics of High-Dose Ara-C by Its Metabolite, High Ara-U in Patients with Acute Leukemia. *J Clin Oncol.* 1983;1(12):763-771. doi:10.1200/JCO.1983.1.12.763
 133. McLornan DP, McMullin MF, Johnston P, Longley DB. Molecular mechanisms of drug resistance in acute myeloid leukaemia. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2007;3(3):363-377. doi:10.1517/17425255.3.3.363
 134. Lubas M, Christensen MS, Kristiansen MS, et al. Interaction Profiling Identifies the Human Nuclear Exosome Targeting Complex. *Mol Cell.* 2011;43(4):624-637. doi:10.1016/j.molcel.2011.06.028
 135. Kim J-H, Sharma A, Dhar SS, et al. UTX and MLL4 Coordinately Regulate Transcriptional Programs for Cell Proliferation and Invasiveness in Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* 2014;74(6):1705-1717. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1896

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	mikro (1×10^{-6})
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
6-MP	6-Mercaptopurin
6-TG	6-Thioguanin
A	Ampère
ac	acetyliert
ACN	Acetonitril
ADP	Adenosindiphosphat
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APL	akute Promyelozytenleukämie
AraC	Cytarabin
ASH2L	engl. ASH2 Like, Histone Lysine Methyltransferase Complex Subunit
ATP	Adenosintriphosphat
B-ALL	B-Zell-ALL
bp	Basenpaar(e)
BSA	bovines Serumalbumin
c-ALL	engl. common-ALL
cDNA	engl. complementary DNA
ChIP-Seq	engl. chromatin immunoprecipitation sequencing
CML	chronische myeloische Leukämie
CMP	Cytosinmonophosphat
CN	engl. cytogenetically normal
CNT	engl. concentrative nucleoside transporter
COMPASS	engl. Complex of Proteins Associated with Set1
CR	engl. complete remission
CTP	Cytosintriphosphat
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
del	Deletion
DMEM	engl. Dubecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. deoxyribonucleic acid
DNR	Daunorubicin
DPY30	engl. dpy-30 histone methyltransferase complex regulatory subunit
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	1,4-Dithiothreit
E.coli	Escherichia coli
ECL	engl. enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENT	engl. equilibrative nucleoside transporter
FA	Ameisensäure
FAB	engl. French-American-British

FACS	engl. fluorescence-activated cell sorting
FBS	fötales bovines Serum
FC	engl. fold change
FLT3	engl. fms like tyrosine kinase 3
FOR	engl. forward
g	Erdbeschleunigung, Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	engl. green fluorescent protein
GMP	Guanosinmonophosphat
GO	Gemtuzumab-Ozagamicin
GOF	engl. gain of function
h	Stunde(n)
H3K27	Lysin 27 von Histon 3
H3K4	Lysin 4 von Histon 3
HBS	engl. HEPES buffered saline
HOX	engl. homeobox
HRP	engl. horseradish peroxidase
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IF	Immunfluoreszenz
IL-3	Interleukin-3
IMP	Inosinmonophosphat
IP	Immunpräzipitation
IRES	engl. internal ribosomal entry site
JmjC	Jumonji C
k	kilo (1×10^3)
kb	Kilobasenpaar
KD	Knockdown
KDM	Lysindemethylase
Km	Michaelis-Menten-Konstante
KMT	Lysinmethyltransferase
KO	Knockout
l	Liter
LC ₅₀	mittlere letale Konzentration
LOF	engl. loss of function
m	milli (1×10^{-3})
M	Molar (mol/l)
MDS	myelodysplastisches Syndrom
me3	trimethyliert
min	Minute(n)
MLL	engl. mixed lineage leukemia
MM-1	MONO-MAC-1
MM-6	MONO-MAC-6
MRD	engl. minimal residual disease
mRNA	engl. messenger RNA
n	nano (1×10^{-9})
MT	Mutante
NBMMPR	Nitrobenzylmercaptapurin Ribonukleosid
NT5C2	engl. 5'-Nucleotidase, Cytosolic II
PAGE	engl. polyacrylamide gel electrophoresis
PB	PiggyBac
PBS	engl. phosphate buffer saline

PBS-T	PBS mit 0,1% Tween 20
PCR	engl. polymerase chain reaction
PDX	engl. patient-derived xenograft
PI	Propidiumiodid
pMIY	MSCV-IRES-EYFP
qRT-PCR	engl. quantitative Real-Time-Polymerase Chain Reaction
RbBP5	RB Binding Protein 5
REV	engl. reverse
RNA	engl. ribonucleic acid
RNA-Seq	RNA-Sequenzierungsanalyse
rpm	engl. rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rRNA	ribosomale RNA
s	Sekunde(n)
SDS	engl. sodium dodecyl sulfate
shRNA	engl. short hairpin RNA
siRNA	engl. short interfering RNA
SLC29A1	engl. solute carrier family 29 member 1
SPARC	engl. secreted protein acidic and rich in cysteine
TAD	Therapieschema mit 6-TG, AraC und DNR
T-ALL	T-Zell-ALL
TBS	engl. Tris-buffered saline
TBS-T	TBS mit 0,1% Tween 20
TFA	Trifluoressigsäure
TPR	engl. tetratricopeptide repeat
U	engl. unit
UTX	ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome
UTY	ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, Y chromosome
UV	ultraviolett
V	Volt
VAF	engl. variant allele frequency
vs.	versus
WDR5	WD Repeat Domain 5
WGA	engl. Wheat Germ Agglutinin
WHO	engl. World Health Organization
WRAD	COMPASS-Subkomplex aus WDR5, RbBP5, ASH2L, DPY30
WT	Wildtyp
XMP	Xanthosinmonophosphat
YFP	engl. yellow fluorescent protein
ZCCHC7	engl. Zinc Finger CCHC-Type Containing 7
α	Alpha
β	Beta

Einbuchstaben- und Dreibuchstabencodes der Aminosäuren

A	Alanin	Ala
C	Cystein	Cys
D	Asparaginsäure	Asp
E	Glutaminsäure	Glu
F	Phenylalanin	Phe
G	Glycin	Gly

H	Histidin	His
I	Isoleucin	Ile
K	Lysin	Lys
L	Leucin	Leu
M	Methionin	Met
N	Asparagin	Asn
P	Prolin	Pro
Q	Glutamin	Gln
R	Arginin	Arg
S	Serin	Ser
T	Threonin	Thr
V	Valin	Val
W	Tryptophan	Trp
Y	Tyrosin	Tyr

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Vereinfachtes Schema des Metabolismus von AraC, 6-TG und DNR.	3
Abbildung 2 Vereinfachtes Schema der AML-Induktionstherapie.	4
Abbildung 3 Schematische Proteinstruktur von KDM6A.	5
Abbildung 4 NT5C2-Expression im <i>KDM6A</i> -Knockdown und -Knockout.	40
Abbildung 5 Proliferationsassays mit NT5C2-überexprimierenden Ba/F3-Zellen zeigen erhöhte Resistenz gegen 6-TG, aber nicht gegen AraC.	41
Abbildung 6 IC ₅₀ -Werte von NT5C2-überexprimierenden Ba/F3-Zellen für AraC und 6-TG nach 72 h.	42
Abbildung 7 NT5C2-überexprimierende Ba/F3-Zellen zeigen verlangsamtes Wachstum über 8 Tage.	42
Abbildung 8 SPARC-Expression wird im <i>KDM6A</i> -Knockdown und -Knockout herunterreguliert.	43
Abbildung 9 SPARC-Überexpression in Ba/F3-Zellen führt zu keinem veränderten Phänotyp hinsichtlich der AraC-, 6-TG- und DNR-Resistenz.	44
Abbildung 10 Langzeitproliferation von Ba/F3 pMIY und Ba/F3 SPARC über 14 Tage.	45
Abbildung 11 ENT1-Expression wird im <i>KDM6A</i> -Knockdown und -Knockout herunterreguliert.	46
Abbildung 12 Überexpression von ENT1 in HEK293T.	47
Abbildung 13 ENT1-Inhibition führt in K562 zu erhöhter Resistenz gegen AraC, aber nicht gegen 6-TG und DNR.	48
Abbildung 14 ENT1-Inhibition führt in MM-1 und MM-6 zu erhöhter Resistenz gegen AraC.	49
Abbildung 15 Die durch ENT1-Inhibition erhöhte AraC-Resistenz ist bei MM-6 tendenziell stärker als bei MM-1.	49
Abbildung 16 Überexpression der <i>ZCCHC7-ENT1</i> -Fusion in Ba/F3 ist beim N-terminal getagten Konstrukt stärker.	50
Abbildung 17 Überexpression der <i>ZCCHC7-ENT1</i> -Fusion in Ba/F3 führt zu keinem veränderten Phänotyp hinsichtlich IL-3-Abhängigkeit und AraC-Resistenz.	51
Abbildung 18 Induzierbare <i>KDM6A</i> -Re-Expression in K562 <i>KDM6A</i> -KO-Klonen und THP-1.	52
Abbildung 19 Induzierbare <i>KDM6A</i> -Re-Expression in einem K562 <i>KDM6A</i> -KO-Klon und THP-1 führt zur Hochregulation von SPARC.	53
Abbildung 20 Induzierbare <i>KDM6A</i> -Re-Expression in K562 <i>KDM6A</i> -KO-Klonen und THP-1 führt zur Hochregulation von <i>ENT1</i>	54
Abbildung 21 <i>KDM6A</i> -WT-, aber nicht <i>KDM6A</i> H1146A-Re-Expression in K562 <i>KDM6A</i> -KO und THP-1 führt zu erhöhter Sensitivität gegenüber AraC.	56
Abbildung 22 <i>KDM6A</i> -WT- und <i>KDM6A</i> H1146A-Re-Expression in K562 <i>KDM6A</i> -KO und THP-1 führen in unterschiedlichem Ausmaß zur Verlangsamung der Proliferation.	57
Abbildung 23 Massenspektrometrie für <i>KDM6A</i> -Interaktionspartner.	58
Abbildung 24 Schematische Proteinstruktur der in der Massenspektrometrieanalyse untersuchten <i>KDM6A</i> -Konstrukte.	60
Abbildung 25 Expressionsstärke verschiedener <i>KDM6A</i> -Konstrukte in HEK293T im Ganzzelllysat und in der Immunpräzipitation.	61
Abbildung 26 Massenspektrometrieanalyse für <i>KDM6A</i> -Interaktionspartner mit unterschiedlichen <i>KDM6A</i> -Konstrukten.	62
Abbildung 27 Mögliches Modell einer durch ENT1 vermittelten erhöhten AraC-Resistenz bei <i>KDM6A</i> -Funktionsverlust in AML-Zellen.	70

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien.	13
Tabelle 2 Verwendete Puffer und Lösungen.	15
Tabelle 3 Verwendete Inhibitoren und Zytostatika.	16
Tabelle 4 Verwendete Kitsysteme.	16
Tabelle 5 Verwendete Antikörper.	17
Tabelle 6 Verwendete Plasmide.	17
Tabelle 7 Verwendete Oligonukleotide.	18
Tabelle 8 Verwendete Zelllinien.	19
Tabelle 9 Verwendete Verbrauchsmaterialien.	19
Tabelle 10 Verwendete Geräte.	20
Tabelle 11 Verwendete Software.	21
Tabelle 12 Stabile Nukleofektion mit PiggyBac-Vektor.	30
Tabelle 13 Differenzielle Regulation von potenziellen <i>KDM6A</i> -Zielgenen im <i>KDM6A</i> -Knockdown.	39
Tabelle 14 Liste der in der Massenspektrometrie signifikant angereicherten Gene.	59

7.4 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Karsten Spiekermann für die Möglichkeit, mein Promotionsprojekt unter seiner Betreuung durchführen zu können. Seine Kompetenz und Erfahrung, sein Lob und seine Kritik haben wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Dr. Sophie Maria Stief für die großartige Betreuung während meiner Laborzeit und darüber hinaus bedanken. Ich habe von ihr sehr viel über die Laborarbeit und wissenschaftliches Arbeiten lernen können und es war eine Freude, mit ihr zusammen zu arbeiten.

Ich danke allen Mitarbeitenden des ELLF und insbesondere der AG Spiekermann für die gute kollegiale Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft. Insbesondere Belay Tizazu hat mich bei der Laborarbeit sehr unterstützt.

Vielen Dank an Prof. Dr. Irmela Jeremias und PD Dr. Klaus Metzeler für die Bereitschaft, im Rahmen der TAC Meetings die Richtung meines Projekts mitzuführen.

Danke an den SFB 1432 „Cancer Evolution“ der DFG und der Medizinischen Klinik III des Klinikums der LMU München für die Möglichkeit, das Projekt durchzuführen und für die finanzielle Unterstützung.

Bei Dr. Ignasi Forné und seinem Team im Zentrallabor für Proteinanalytik der LMU möchte ich mich für die Möglichkeit und die Hilfe bei der Durchführung meiner Massenspektrometrieanalysen bedanken. Dem Labor für Leukämiediagnostik des LMU Klinikums danke ich für die Bereitstellung der LightCycler für meine qRT-PCR-Analysen. Vielen Dank an meine Familie und Freundinnen und Freunde für die Unterstützung während meines Studiums und dieser Arbeit.

Eidesstattliche Versicherung

Hanneforth, Anna-Li
Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Charakterisierung der Rolle von KDM6A-Zielgenen hinsichtlich der Zytostatikaresistenz in
AML-Patient*innen

.....

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 10.01.2023
Ort, Datum

Anna-Li Hanneforth
Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

Curriculum Vitae

Publikation

Stief S. M., **Hanneforth A.-L.**, Mattes R., Weser S., Carlet M., Liu W.-H., Bartoschek M. D., Domínguez Moreno H., Vick B., Ksienzyk B., Rothenberg-Thurley M., Quentmeier H., Hiddemann W., Metzeler K. H., Schotta G., Bultmann S., Jeremias I., Leonhardt H., Spiekermann K., Loss of KDM6A confers drug resistance in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2020;34:50-62. doi:10.1038/s41375-019-0497-6

