

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III
Klinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dr. Michael von Bergwelt

**Resistenzmechanismen gegen hypomethylierende Agenzien
sowie die Bedeutung des Wilms' Tumor Gen 1 in der
akuten myeloischen Leukämie**

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

vorgelegt von

Nina Laura Bocci

aus

München

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Karsten Spiekermann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Michael Albert
Prof. Dr. Oliver Muensterer

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 02.03.2023

Eidesstattliche Versicherung

Nina Laura Bocci

Name, Vorname

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

„Resistenzmechanismen gegen hypomethylierende Agenzien sowie die Bedeutung des
Wilms' Tumor Gen 1 in der akuten myeloischen Leukämie“

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, 19.03.2023

Ort, Datum

Bocci

Unterschrift Doktorandin/ Doktorand

Für Maurizio

1	<u>Inhaltsverzeichnis</u>	
2	Einleitung	1
2.1	<i>Akute myeloische Leukämie</i>	1
2.1.1	Definition und Epidemiologie	1
2.1.2	Pathogenese	2
2.1.3	Therapie	3
2.1.4	Rezidiv	4
2.1.5	Zytostatikaresistenz	5
2.2	<i>Epigenetik</i>	6
2.2.1	Einleitung	6
2.2.2	DNA-Methylierung	6
2.2.3	Epigenetik in der AML	7
2.2.4	Hypomethylierende Agenzien	7
2.3	<i>Wilms' Tumor Gen 1</i>	12
2.3.1	Einleitung	12
2.3.2	Wt1 Struktur, Isoformen und Funktion	12
2.3.3	Wt1 in der Organogenese und Hämatopoese	13
2.3.4	Wt1 in der akuten myeloischen Leukämie	14
2.4	<i>Fragestellung und Zielsetzung</i>	17
3	Material und Methoden	18
3.1	<i>Material</i>	18
3.1.1	Chemikalien und Reagenzien	18
3.1.2	Puffer und Lösungen	20
3.1.3	Zytokine, Chemotherapeutika und Inhibitoren	21
3.1.4	Antikörper	22
3.1.5	Plasmide	22
3.1.6	Oligonukleotide	23
3.1.7	Kits	24
3.1.8	Geräte	24
3.1.9	Verbrauchsmaterialien	26
3.1.10	Programme	27
3.2	<i>Methoden</i>	28
3.2.1	Zellkultur	28
3.2.2	Proteinbiochemische Methoden	34
3.2.3	Molekulargenetische Methoden	36
3.2.4	Datenanalyse	39
4	Ergebnisse	40
4.1	<i>Die Bedeutung des Einbaus von HMA in das Genom leukämischer Zellen mit Bezug auf Zytostatikatoxizität und klinisches Ansprechen</i>	40
4.1.1	Die Wirkung von HMA in unterschiedlichen Nährmedien	40
4.1.2	Sensitivität leukämischer Zelllinien gegenüber hypomethylierenden Agenzien	43
4.1.3	Die Wirkung von HMA auf das Genom leukämischer Zellen	46
4.1.4	Die Wirkung von HMA auf das Genom leukämischer Zellen mit unterschiedlicher Sensitivität für HMA	49
4.2	<i>Funktionelle Charakterisierung des Wilms' Tumor Gen 1 (Wt1) in der akuten myeloischen Leukämie</i>	52
4.2.1	Wt1-Mutationen in AML-Patientendaten	52
4.2.2	Wt1-Mutationen und Wt1-Expression in leukämischen Zelllinien	54
4.2.3	Funktionelle Charakterisierung Wt1 exprimierender Ba/F3-Zellen	60
5	Diskussion	70
5.1	<i>Die Bedeutung des Einbaus von hypomethylierenden Agenzien in die DNA und RNA mit Bezug auf Zytostatikatoxizität und klinisches Ansprechen</i>	70

5.2	<i>Funktionelle Charakterisierung des Wilms' Tumor Gen 1 (Wt1) in der Akuten myeloischen Leukämie</i>	75
5.2.1	Die Bedeutung häufig wiederkehrender Wt1-Mutationen im Progress der Leukämie	75
5.2.2	Die Rolle der Wt1-Isoformen in der Zytostatikaresistenz der AML	80
6	Zusammenfassung	82
7	Literaturverzeichnis	84
7.1	<i>Tabellen</i>	104
7.2	<i>Abbildungen</i>	104
7.3	<i>Danksagung</i>	106
7.4	<i>Lebenslauf</i>	107

2 Einleitung

2.1 Akute myeloische Leukämie

2.1.1 Definition und Epidemiologie

Die Akute myeloische Leukämie (AML) ist eine heterogene Gruppe von Erkrankungen hämatopoetischer Vorläuferzellen der myeloischen Reihe.¹ Dabei bewirkt die klonale Proliferation gering bzw. undifferenzierter leukämischer Zellen, auch Blasten genannt, eine verminderte Produktion reifer Zellen der myeloischen Reihe im Knochenmark. Dies führt zur Zytopenie, mit lebensbedrohlichen Infektionen (Neutropenie), Hämorrhagien (Thrombozytopenie), Schwäche und Atemnot (Anämie) und endet unbehandelt mit dem Tod des Patienten.¹ In Europa liegt die Inzidenz der Erkrankung bei ungefähr 3.7 Fällen pro 100.000 Einwohner pro Jahr, dies konnte in einer großangelegten europäischen Studie über mehrere Jahre ermittelt werden.² Das mittlere Erkrankungsalter wurde in einer schwedischen Studie bei 72 Jahren bestimmt.³ Laut der ‚*World Health Organization*‘ (WHO) ist die Diagnose einer AML bei über 20% leukämischer myeloischer Blasten im Knochenmark oder im peripheren Blut zu stellen.⁴ Die verschiedenen Entitäten der AML werden in der seit 2016 gültigen ‚*Classification of tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*‘ der WHO an Hand genetischer, morphologischer, immunophänotypischer und klinischer Aspekte in sechs Hauptgruppen zusammengefasst (Tab.1) Die WHO Klassifikation hat sowohl hohe prognostische als auch klinisch-therapeutische Signifikanz.⁴

Tabelle 1: Klassifikation der AML.

Einteilung der AML nach der Klassifikation der WHO von 2016.⁴

AML mit wiederkehrenden genetischen Veränderungen

AML mit t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1

AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11

APL mit PML-RARA

AML mit t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A

AML mit t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214

AML mit inv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM

AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13.3;q13.3); RBM15-MKL1

AML mit BCR-ABL1 (provisorische Entität)

AML mit NPM1-Mutation

AML mit biallelischer CEBPA-Mutation

AML mit RUNX1-Mutationen (provisorische Entität)

AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen
Therapie-assoziierte myeloische Neoplasien
AML, nicht anderweitig klassifiziert AML mit minimaler Differenzierung AML ohne Ausreifung AML mit Ausreifung Akute myelomonozytäre Leukämie Akute monozytäre Leukämie Akute Erythrozytenleukämie Akute Megakaryoblastenleukämie Akute Basophilenleukämie Akute Panmyelose mit Myelofibrose
Myeloides Sarkom
Myeloische Down Syndrom-assoziierte Proliferation

2.1.2 Pathogenese

Bei ungefähr 55% der Patienten können zytogenetische Veränderungen wie zum Beispiel Translokationen (t[8;21], inv[16], t[15;17]) und weitere teilweise komplexe chromosomale Veränderungen festgestellt werden.^{5,6} 40%-50% der Patienten weisen keine chromosomalen Aberrationen auf und gehören damit zur heterogenen Gruppe der zytogenetisch normalen AML (CN-AML).⁷ Vor allem mit modernen Techniken der Genomsequenzierung konnten bei bis zu 97% der AML-Patienten genetische Mutationen festgestellt werden. Obgleich die funktionellen Konsequenzen vieler genetischer Mutationen noch nicht abschließend geklärt sind, geben bereits einige Mutationen wichtige therapeutische und prognostische Hinweise und sind seit 2016 teil der WHO Klassifikation.^{4,8,9,10,11,12} Die häufigsten Mutationen der AML werden in funktionelle Kategorien eingeteilt (Abb. 1).¹² Einige dieser Mutationen sind bereits bei gesunden Probanden in geringerer Allelfrequenz in Form einer klonalen Expansion nachweisbar und stellen somit ein Risiko für die Entwicklung einer hämatologischen Neoplasie dar.^{13,14,15,16} Neben genetischen Veränderungen spielen wahrscheinlich auch epigenetische Prozesse eine Rolle in der Leukämogenese. In leukämischen Zellen können Veränderungen in der DNA-Methylierung, sowohl in CpG-reichen als auch in CpG-armen Bereichen, detektiert werden. Die Hypermethylierung vor allem von Promotorbereichen und die damit verbundene Inaktivierung von Genen, insbesondere

von Tumorsuppressoren, stehen im Verdacht die unkontrollierte Proliferation der Zellen zu begünstigen.^{17,18}

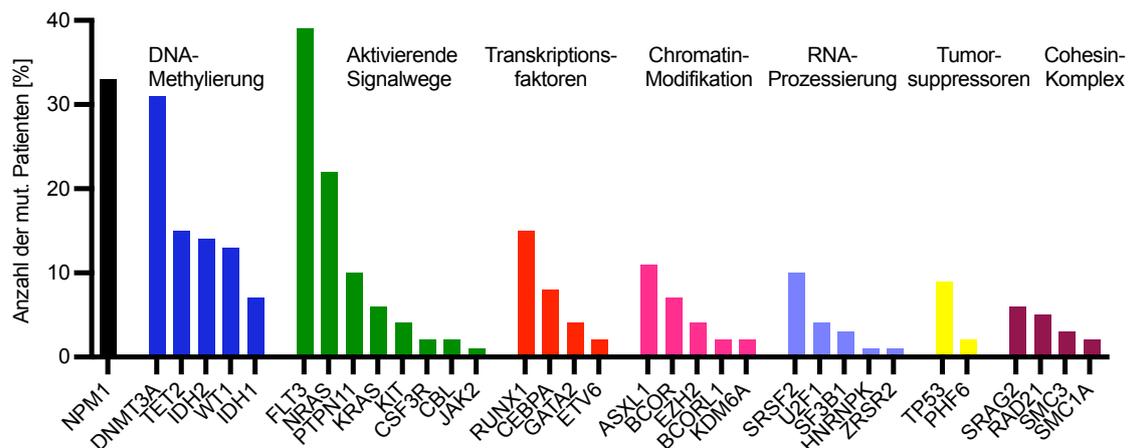


Abbildung 1: Mutationen in der AML.

Zusammenfassung der häufigsten genetischen Mutationen in der AML nach Metzeler et al.¹²

2.1.3 Therapie

Kurative Therapieansätze haben das Ziel, eine komplette Remission (CR) der AML zu erreichen und diese zu erhalten. Eine morphologisch komplette Remission der Leukämie bedeutet, dass unter 5% Blasten im Knochenmark, sowie keine Blasten im peripheren Blut nachweisbar sind, die Regeneration der normalen Hämatopoese, sowie die Abwesenheit einer extramedullärer Manifestation der Leukämie.¹⁹ Anhand zytogenetischer und molekulargenetischer Aspekte werden nach der European LeukemiaNet (ELN) Klassifikation von 2017 drei prognostische Gruppen unterschieden und nach günstigem, mittlerem und ungünstigem Risikoprofil eingeteilt.^{19,20} Meist wird bei Patienten unter 60 Jahren ohne Komorbiditäten ein primär kurativer Ansatz verfolgt. Dieser beinhaltet im Großteil der Fälle eine Induktionstherapie um eine komplette Remission der Leukämie zu erreichen. Zur Stabilisierung wird anschließend eine Konsolidierungstherapie durchgeführt. Die Standard Induktionstherapie, besteht aus dem „3+7“ Schema, eine Kombination einer 3-tägigen Anthracyclin-Infusion (Daunorubicin [60 mg/m²], Idarubicin [10-12mg/m²] oder Mitoxantron [10-12mg/m²]) mit einer 7-tägigen Cytarabin (Ara-C) Infusion (100-200mg/m²), entweder konstant oder als Bolusinfusion, wobei diese meist zweimal durchgeführt wird. Die Konsolidierungstherapie besteht je nach Risikoprofil des Patienten in einer konventionellen Chemotherapie mit 2 bis 4 Zyklen Ara-C (1-1,5g/ m²) oder einer allogenen Stammzelltransplantation.^{19,21,22} Darüber hinaus wird die Therapie bei bestimmten AML-Subgruppen durch die Hinzunahme zielgerichteter Therapien wie Midostaurin oder Gemtuzumab ergänzt.^{23,24} Patienten über 60 Jahren mit einem günstigen

bis mittleren prognostischen Risikoprofil profitieren ebenfalls von einem primär kurativem Ansatz. Hier wird in der Konsolidierungstherapie eine niedrigere Ara-C Dosierung (500-1000mg/m²) empfohlen.^{21,25} Bei älteren Patienten mit einem ungünstigem Risikoprofil oder bei Patienten mit Begleiterkrankungen, die eine intensive Therapie verhindern, wird die Gabe von hypomethylierenden Agenzien (HMA), niedrig dosiertem Ara-C oder die rein symptomatische Therapie mit Hydroxurea empfohlen.²¹

2.1.4 Rezidiv

Trotz großer wissenschaftlicher Fortschritte in Chemotherapien und supportiven Therapien in den letzten Jahren, ist die Langzeitüberlebensrate der AML nach wie vor schlecht. Dies betrifft insbesondere die Prognose von älteren Patienten.^{3,26,27,28} Das liegt nicht nur daran, dass ältere Patienten vermehrt Komorbiditäten aufweisen und eine intensive Chemotherapie (IC) schlechter tolerieren, sondern auch daran, dass mit steigendem Alter prognostisch ungünstige zytogenetische Veränderungen zunehmen. Zusätzlich mangelt es an passenden therapeutischen Strategien für diese Patientengruppe.^{25,29} Ein Grund für das schlechte Langzeitüberleben sowohl jüngerer als auch älterer AML-Patienten ist die hohe Anzahl an Rezidiven. Insgesamt erreichten zwar laut zwei Studien des britischen Medical Research Council (AML10/11) 47-100% der jüngeren Patienten und 26-87% der älteren Patienten unter IC eine komplette Remission der Leukämie, jedoch liegen die 5-Jahres-Überlebensraten bei 4-69% bei jungen Patienten und bei 2-38% bei älteren Patienten.^{6,29} Nach einer Studie von Byrd et al. trat, je nach Risikoprofil, bei 54-92% der Patienten in 5 Jahren ein Rezidiv auf.³⁰ Eine etablierte Theorie dahingehend, ist die der klonalen Evolution. In der Leukämie sind klonale Subpopulationen mit unterschiedlichen genetischen Mutationsprofilen vorhanden.¹⁰ Diese entstehen alle aus einer Ursprungszelle, möglicherweise durch Chemotherapie begünstigt kann der Erwerb weiterer Mutationen zu einem Selektionsvorteil führen und damit das Herauswachsen von Subpopulationen bedingen.³¹ Einige der Mutationen persistieren trotz Erreichen einer kompletten Remission in Form einer klonalen Expansion und stellen damit ein Risiko für ein Rezidiv dar.³² Das Mutationsprofil im Rezidiv ähnelt zwar häufig dem der Ursprungszellen, meist werden jedoch Mutationen hinzugewonnen oder verloren.^{33,34} Es ist folglich anzunehmen, dass entweder die Ursprungszelle oder eine ihrer Subpopulation durch Chemotherapie nicht vollständig eradiziert wird und so zu einem Progress der Erkrankung führt.^{31,35}

2.1.5 Zytostatikaresistenz

Eine unvollständige Eradikation der Leukämie durch Chemotherapien kann die Folge einer bereits vor Chemotherapie bestehenden primären Resistenz oder einer während der Therapie neu erworbenen sekundären Resistenz der Zellen sein.³⁶ Zelluläre Resistenzmechanismen führen entweder zu einer Verringerung der aktiven Metaboliten intrazellulär oder zu einer verminderten Wirkung der Medikamente.³⁷ Ein umfangreich untersuchter Resistenzmechanismus in der AML wird über die Familie der ABC-Transporter vermittelt. Dabei kodieren sowohl das Multidrug-Resistance-Protein-Gen-1 (MDR-1), auch P-Glykoprotein (P-GP) genannt, als auch weitere Multidrug-Resistance-Related-Proteins (MRPs) für membranständige Transporter die Zytostatika aktiv unter Energieverbrauch aus der Zell transportieren.^{38,39} Die MDR-1-Expression stellt in der Therapie der AML einen unabhängigen negativen prognostischen Faktor dar.⁴⁰ In der Resistenz gegen Nukleotidanaloga spielt außerdem der verminderte Import der Agenzien über die Familie der ENT-Transporter eine relevante Rolle.⁴¹ Dabei ist insbesondere der ENT1-Transporter vermittelte Einstrom essentiell für das Ansprechen von AML-Patienten auf die Behandlung mit Ara-C.^{42,43} Ara-C wird nach erfolgreichem Transport intrazellulär über verschiedene Enzyme in seine aktiven Metaboliten konvertiert und in die DNA inkorporiert. Dadurch werden sowohl die Replikation als auch die Reparatur der DNA inhibiert, was in der Apoptoseinduktion der Zelle endet.⁴¹ Demnach kann eine verminderte Aktivierung von Ara-C durch die desoxycytidin-Kinase (dCK) sowie eine verminderte Inkorporation von Ara-C in die DNA zu einer Resistenz führen.^{44,45} Zudem kann die Menge der intrazellulär vorhanden Nukleotide sowie ein vermehrter Abbau von Ara-C durch die Cytidin Deaminase (CDA) oder 5'-nucleotidase (5NT) die Wirkung von Ara-C beeinflussen.^{43,46,47} Darüber hinaus spielen in hämatologischen Erkrankungen Veränderungen in Apoptose-regulierenden Genen eine wichtige Rolle in der Resistenz gegen Zytostatika.⁴¹ Dabei ist in der AML insbesondere die Inaktivierung des TP53 Signalwegs mit einem schlechteren Ansprechen auf Zytostatika sowie mit einem verkürztem Überleben der Patienten assoziiert.⁴⁸ Abschließend gilt es zu erwähnen, dass neben zellulären Faktoren auch Veränderungen in der Immunantwort sowie in der zellulären Umgebung der Krebszellen, dem *Microenvironment*, der Patienten zu einem schlechteren Ansprechen der Patienten auf Zytostatika in der Leukämie beitragen können.^{49,50}

2.2 Epigenetik

2.2.1 Einleitung

Unter dem Begriff der Epigenetik sind alle Prozesse zusammengefasst, die zu einer dynamischen Anpassung des Erbguts führen, ohne die Sequenz der DNA selbst zu modifizieren. Sie gewährleisten damit Differenzierung und Funktionalität der Zellen indem Reparaturprozesse, Replikation, Transkription und damit die Genexpression beeinflusst werden. Epigenetische Information wird über Veränderungen der Methylierung der DNA, des Chromatins und über Modifikationen an Histonen und Nukleosomen, sowie durch nicht-kodierende-RNAs vermittelt.^{51,52}

2.2.2 DNA-Methylierung

Die am besten erforschte Weitergabe epigenetischer Information ist die der DNA-Methylierung. Durch DNA-Methyltransferasen (DNMT1, DNMT3A/B) werden Methylgruppen kovalent an die DNA gebunden. Dies geschieht an einem Kohlenstoffatom in Position 5 der Aminosäure Cytosin des Dinukleotids CpG, wodurch 5-Methylcytosin (5-mC) entsteht. DNMT1 ist für die Kopie der DNA-Methylierung auf die Tochterzelle in der Zellteilung somatischer Zellen zuständig. DNMT3A/B sind für die Entstehung und den Erhalt neuer Methylierung in undifferenzierten Zellen zuständig. Für die Übertragung von DNA-Methylierung in CpG-reichen Promotorregionen sind sowohl DNMT1 als auch DNMT3A/B nötig.^{53,54} 5-mC befindet sich in somatischen Zellen physiologisch vor allem in CpG-armen Bereichen. CpG-reiche Bereiche, sogenannte CpG-Inseln, befinden sich in 70% der Promotorregion und enthalten physiologisch wenig 5-mC.^{54,55} Durch Methylierung CpG-reicher Bereiche in Promotorregionen kann die Genexpression inhibiert werden. Die Bindung transkriptionsinitiierender Faktoren wird erschwert während die Bindung transkriptioninhibierender Faktoren gefördert wird.⁵⁵ Tet-Proteine finden sich häufig in CpG-reichen Promotorregionen.⁵⁶ Durch die Umwandlung von 5-mC zu 5-Hydroxymethylcytosin (5-hmC), 5-Formylcytosin (5-fC) und 5-Carboxylcytosin (5-caC) wird die Methylierung der DNA aufgehoben und damit stillgelegte Gene reaktiviert. Tet-Proteine initiieren nicht nur die passive Demethylierung der DNA, sondern leiten zudem Prozesse ein, die zu einer aktiven Demethylierung der DNA führen.^{57,58} Neueste Forschungsergebnisse ergaben zudem, dass 5-hmC nicht ausschließlich ein Zwischenschritt in der Demethylierung der DNA ist, sondern selbst epigenetische Informationen vermittelt, indem es regulatorische Proteine rekrutiert, die wiederum zur Reaktivierung von stillgelegten Genen führen.^{57,58,59,60}

2.2.3 Epigenetik in der AML

Epigenetische Veränderungen spielen wahrscheinlich sowohl eine Rolle in der Entstehung als auch im Progress der AML. Zum einen betreffen Mutationen in der AML häufig Gene der epigenetischen Regulation, zum anderen weist ein Großteil der Leukämien eine DNA-Methylierung auf.^{12,52} Bei einem großen Teil der AML-Patienten können bei Erstdiagnose Mutationen in epigenetischen Regulatoren festgestellt werden.¹² Diese sind meist bereits in frühen Stadien der Krankheitsentwicklung nachweisbar, treten gehäuft bei älteren Patienten auf und persistieren im Rezidiv oder werden als rezidivspezifische Mutationen hinzugewonnen.^{13-16,32,33,61} Es wird angenommen, dass einige dieser Mutationen eine prognostische Relevanz besitzen, jedoch konnten bis dato in klinischen Studien keine klaren Zusammenhänge nachgewiesen werden.^{62,63,64} In zwei Studien waren DNMT3A Mutationen mit einem verkürzten rezidivfreien Überleben und einem verkürzten Gesamtüberleben assoziiert.^{62,63} Der Einfluss von IDH1 und IDH2 Mutationen, auf das Gesamtüberleben in der AML ist umstritten. In einer aktuellen Studie konnte kein Überlebensvorteil von Patienten mit IDH1 und IDH2 Mutationen gezeigt werden.^{62,64} Die DNA-Methylierung leukämischer Blasten betrifft häufig die Methylierung CpG-reicher Promotorregionen.¹⁷ Viele dieser Regionen sind im Unterschied zu gesunden CD34+ Zellen hypermethyliert, selten auch hypomethyliert.⁶⁵ Hypermethylierung von Promotorregionen kann zur Deaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie p15 führen und damit zu einer unkontrollierten Proliferation der Zellen beitragen.¹⁷ Klinische Studien zeigten eine Korrelation der DNA-Methylierung mit zytogenetischen Veränderungen und molekulargenetischen Veränderungen, sowie mit der Prognose der Patienten.^{17,65} Mutationen in den epigenetischen Regulatoren IDH1/IDH2, Tet2 und Wt1 führen zu einer Zunahme der Methylierung sowohl in CpG-armen Regionen als auch in CpG-reichen Promoterregionen.⁶⁶ Für DNMT3A-Mutationen konnte außerdem eine genomweite Abnahme der DNA-Methylierung gezeigt werden.⁶⁷

2.2.4 Hypomethylierende Agenzien

2.2.4.1 Struktur und Wirkungsmechanismus von hypomethylierenden Agenzien

Azacitidin (5-azacytidin [Aza, 5-aza-C]) und Decitabin (5-aza-2'-deoxycytidin [Dec, 5-aza-dC]) sind HMA, die als Pyrimidin-Analoga in die DNA eingebaut werden und durch kovalente Bindung von DNMTs zu einer transienten De- bzw. Hypomethylierung der DNA führen.^{68,69,70} Die chemische Struktur von Aza sowie der Deoxy-Form Dec ähnelt Cytidin, wobei das Kohlenstoffatom an Position 5 durch ein Stickstoffatom ersetzt wird.

HMA sind hydrolytisch instabil und zerfallen in wässriger Lösung rasch.⁶⁸ Die Plasma Halbwertszeit beträgt 0.36-0.69 Std. für Aza und 0.62-0.78 Std. für Dec.^{71,72} Wie andere Nukleosid-Analoga werden HMA über den ENT1/2-Transporter in die Zelle aufgenommen und über unterschiedliche Wege in ihren aktiven Metabolite 5-aza-2'-(deoxy)cytidin-5'-triphosphat konvertiert. Aza wird durch die Uridin-Cytidin-Kinase (UCK) und Dec durch die dCK phosphoryliert. Zur Inkorporation in die DNA wird Aza durch die Ribonukleotid-Reduktase (RNR) reduziert.⁶⁸ Ein Teil des Azas wird in die RNA inkorporiert und greift dadurch in die Proteinbiosynthese der Zellen ein.⁷³ Dec kann durch seine Deoxy-Form direkt in die DNA inkorporiert werden. Das in die DNA inkorporierte Aza/Dec wird anschließend von DNMT1, DNMT3A/B erkannt und kovalent von diesen gebunden. Es konnte gezeigt werden, dass HMA die Expression sowohl der DNMT1 als auch DNMT3a/b herunterreguliert.^{68,74} Im Gegensatz zum physiologischen Cytidin kann die Enzymbindung der DNMTs mit Aza/Dec, nicht mehr gelöst werden, die DNMT bleibt kovalent an Aza/Dec und damit an die DNA gebunden. Im Weiteren werden die DNA Methyltransferasen proteasomal degradiert. Es kommt folglich unter Verlust der DNMTs zu einer passiven Abnahme der DNA-Methylierung während der Replikation. Die hypomethylierende Wirkung der HMA ist somit S-phasen abhängig.⁶⁸ Sowohl Aza als auch Dec werden durch die CDA inaktiviert.⁶⁸ Zum einen hat die irreversible Inhibition der DNMTs zur Folge, dass durch Hypomethylierung der DNA Gene reaktiviert werden welche die Differenzierung sowie die Apoptose der Zellen induzieren.^{75,69,70,76} Zum anderen führt die Inkorporation und die kovalente Bindung der DNMTs zu DNA-Schäden, welche zytotoxisch wirken.^{77,78,79} Neueste Studien zeigen außerdem, dass durch die hypomethylierende Wirkung immunologische Prozesse in Gang gesetzt werden, welche unter anderem aus der Aktivierung von T-Zellen in einer Eradikation der Tumorzellen resultieren.⁸⁰ Aza wird außerdem in die RNA der Zellen inkorporiert. Durch Inhibition der Methyltransferasen kommt es zur Abnahme der tRNA-Methylierung, dies führt zu einer gestörten Produktion von Messenger RNAs, sowie der Proteinbiosynthese und endet in der Apoptoseinduktion der Zellen.^{81,82,83} Obgleich die beiden Agenzien chemisch ähnlich sind, zeigen neueste Studien deutliche Unterschiede im Wirkungsmechanismus der beiden Medikamente.^{84,85,86} Dies hängt wahrscheinlich mit der unterschiedlichen Inkorporation der Agenzien in die DNA und RNA zusammen. Bis heute ist jedoch nicht abschließend geklärt, welchen Anteil die verschiedenen molekularen Mechanismen an der klinischen Wirksamkeit von Aza und Dec haben.

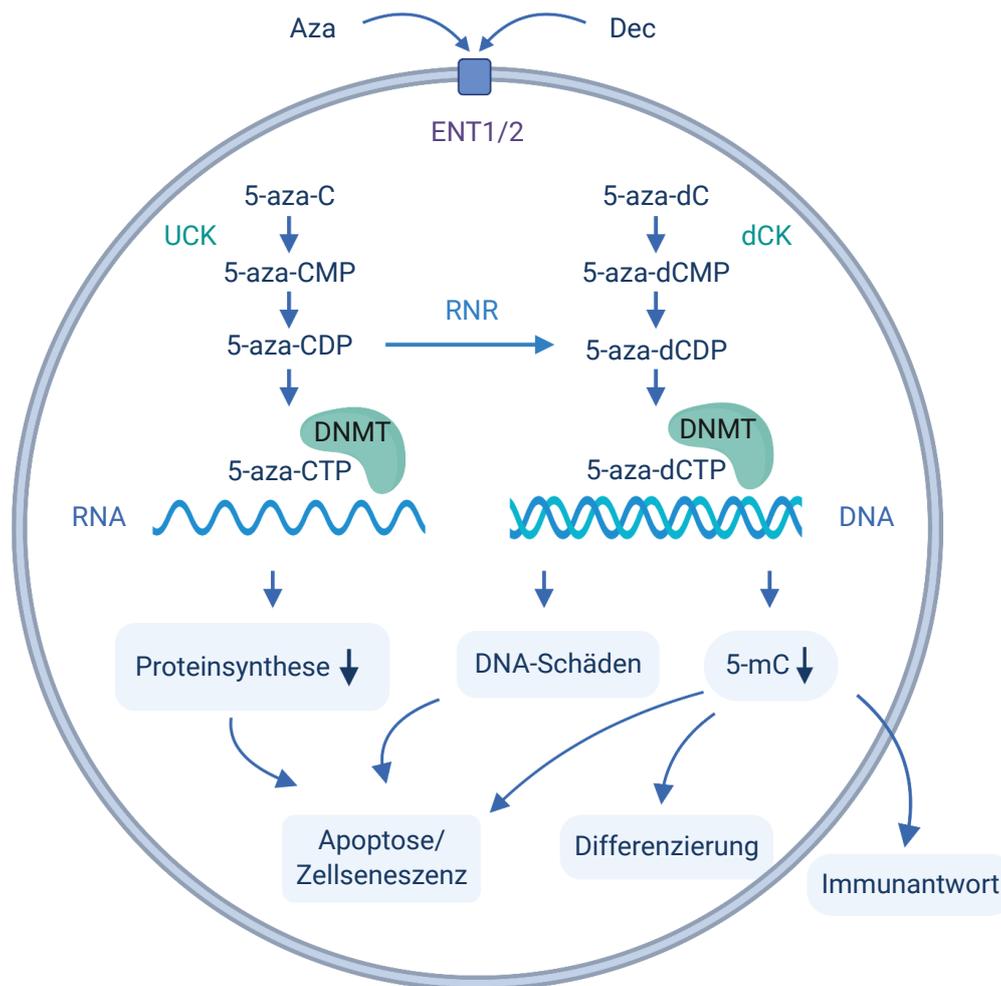


Abbildung 2: Transport, intrazellulärer Metabolismus und Wirkungsweisen von HMA.

Graphische Darstellung nach Stresemann et al. und Duchmann et al..^{68,76}

2.2.4.2 Resistenz gegen hypomethylierende Agenzien

Die beiden HMA sind auf Grund ihrer klinischen Wirksamkeit für die Therapie der AML und des Myelodysplastisches Syndrom (MDS) zugelassen. Ein signifikanter Teil der Patienten ist jedoch primär resistent gegen die Therapie mit HMA oder entwickelt eine Resistenz unter HMA-Therapie.^{87,88} In Phase III Studien, in denen MDS- und AML-Patienten HMA erhielten, zeigten diese zwar einen Vorteil gegenüber konventionellen Therapien. Dennoch erreichten beide Agenzien nur bei 30% der Patienten eine hämatologische Verbesserung. Unter Aza erreichten 18-19% der Patienten eine komplette Remission der Leukämie, bei Dec waren dies nur 10%.^{89,90,88} HMA-resistente Patienten haben eine infauste Prognose, die nur noch durch eine allogene Stammzelltransplantation (SZT) verbessert werden kann.⁹¹ Es ist weitgehend unbekannt, welche Patienten gut auf eine Therapie mit HMA ansprechen und welche Patienten gegen

die Therapie resistent sind. Mehrere Studien befassten sich, mit teilweise widersprüchlichen Ergebnissen, mit dem Effekt epigenetischer Mutationen auf den klinischen Erfolg der HMA-Therapie.^{92,93,94,95} Es scheint, als hätten Mutationen in Tet-2 einen positiven Effekt auf das Ansprechen auf HMA-Therapie bei MDS- und AML-Patienten.^{92,93} Zusätzlich beschreiben einige Studien sowohl für DNMT3A-Mutationen als auch für IDH1/2-Mutationen einen positiven prognostischen Wert für die Behandlung mit HMA.⁹²⁻⁹⁴ Dies konnte jedoch in einer großen retrospektiven Studie von Di Nardo et al. nicht verifiziert werden.⁹⁵ Dabei wurden in den letzten Jahren nicht nur der Einfluss epigenetischer Mutationen auf den klinischen Erfolg von HMA untersucht, sondern auch der Effekt weiterer bekannter Gen-Mutationen der AML. Zwei Publikationen haben den positiv prognostischen Wert von TP53-Mutationen auf das Ansprechen einer 10 Tages Dec-Therapie bei MDS- und AML-Patienten beschrieben, wobei in keiner der Studien dies mit einem verbesserten Gesamtüberleben der Patienten assoziiert war.^{96,97} Gleichzeitig waren TP53-Mutationen in zwei weiteren Studien mit einem schlechterem Gesamtüberleben unter Aza-Therapie assoziiert.^{98,99} Es bleibt zu erwähnen, dass neben genetischen Mutationen weitere molekulare Regulationsmechanismen die Therapie mit HMA beeinflussen können. So korrelierte in einer Studie von Blum et al. die Expression der mit DNMT3a interagierenden Mikro-mRNA miR-29b mit dem klinischen Erfolg der Dec-Therapie älterer AML-Patienten.¹⁰⁰ Obwohl in einigen Studien die klinische Wirksamkeit der HMA auf die Methylierung der DNA beschrieben wird und mit dem Ansprechen auf HMA korreliert,^{101,102,103} konnten in der AML bis heute keine spezifischen epigenetischen Marker für den klinischen Erfolg der Therapie mit HMA beschrieben werden.¹⁰⁴ Laut Meldi et al. sind bei CMML-Patienten spezifische Methylierungsmuster distaler regulatorischer Domänen zu identifizieren, welche mit dem Ansprechen auf Dec-Therapie assoziiert sind.¹⁰⁵ Ob dies auf AML-Patienten zu übertragen ist, ist aktuell unbekannt. Darüber hinaus wurden in den letzten Jahren zunehmend Veränderungen im Transport und dem intrazellulären Metabolismus der Agenzien mit der Resistenz gegen HMA in Zusammenhang gebracht.^{84,106,107,108,109,110,111} Dies gibt Hinweise darauf, dass höchstwahrscheinlich auch eine verminderte Inkorporation der Agenzien in die DNA an der Resistenz gegen HMA beteiligt ist, wie es bereits für andere Nukleotidanaloga wie Ara-C beschrieben wurde.^{41,45}

2.2.4.3 Quantifizierungsmethoden der in das Genom inkorporierten HMA, sowie Methylierung der DNA und RNA

Um Resistenzmechanismen gegen HMA zu identifizieren ist die exakte Quantifizierung der in das Genom inkorporierten Menge an HMA, sowie der Veränderung der epigenetischen Basen unter Therapie von großer Bedeutung. Da HMA hydrolytisch instabil sind und somit in wässrigen Medien zerfallen, waren diese Messungen bis vor kurzem nur indirekt, per radioaktiver Markierung der Substrate, möglich.^{68,73,86,112} Diese Methodik bietet jedoch nur eingeschränkt verlässliche Ergebnisse, da Abbauprodukte der Agenzien nicht von chemisch intakten inkorporierten Agenzien unterschieden werden können. Die Arbeitsgruppe von Prof. Carell (Chemie Department der LMU), sowie weitere Arbeitsgruppen, entwickelten eine Analytik, welche nun erstmals eine exakte Bestimmung des Aza/Dec-Gehalts von DNA und RNA parallel zu 5-mC und 5-hmC ermöglicht.^{113,114,115,116} Basis der Methode ist die chemische Stabilisierung der HMA. Nach Reduktion der Agenzien mit Natriumborhydrid (NaBH₄) kann die Quantifizierung der aktiven in das Genom eingebauten Menge der HMA mittels *Ultra High Performance Liquid Chromatographie* erfolgen. Die Methode bietet verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse über die Inkorporation von HMA in das Genom sowie der epigenetischen Markierung der DNA und RNA.^{113,114,116}

2.3 Wilms' Tumor Gen 1

2.3.1 Einleitung

Erstmals beschrieben wurde das Wilms' Tumor Gen 1 (Wt1), im Wilms' Tumor, eine maligne Erkrankung der kindlichen Niere. Bei dieser Erkrankung kann in bis zu 10% der Fälle eine Mutationen im Wt1 Gen nachgewiesen werden.¹¹⁷ Die von Wt1 kodierten Proteine agieren vor allem als Transkriptionsfaktoren, wobei ihre Zielgene Wachstum und Differenzierung der Zellen regulieren. Damit ist Wt1 unabdingbar für eine intakte Organogenese, vor allem des Urogenitaltrakts, aber auch des blutbildenden Systems sowie weiterer Organe und Gewebe.¹¹⁸

2.3.2 Wt1 Struktur, Isoformen und Funktion

Das Wilms' Tumor 1 (Wt1) Gen ist auf Chromosom 11 (Bande p13) lokalisiert, die cDNA ist ca. 50kb groß und kodiert für eine 3kb große mRNA bestehend aus 10 Exons. N-terminal enthalten Wt1 Proteine eine prolin- und glutaminreiche regulatorische Domäne, die mit RNAs und Proteinen interagiert (Abb. 3). Die C-terminale Region besteht aus vier Cystin²-Histin²-Zinkfingern, die zur direkten Interaktion mit DNA-Sequenzen dienen.^{117,119,120} Zusätzlich beinhaltet die Region zwei Kernlokalisierungssignale, eines im ersten Zinkfinger, sowie eines im zweiten und dritten Zinkfinger.¹²¹ Durch alternatives Spleißen in den zwei Hauptregionen in Exon 5 (beinhaltet 17 Aminosäuren) und in der KTS-Region in Exon 9 (beinhaltet die drei Aminosäuren Lysin, Threonin, und Serin) entstehen vier 52kD bis 54kD große Wt1 Hauptisoformen A (-/-), B (+/-), C (-/+) und D (+/+). Die Plus- und Minus-Symbole stehen für die An-/Abwesenheit der Spleißregion in Exon 5 und der KTS-Region.¹²² Durch weitere posttranskriptionale Modifikation entstehen weitere Wt1-Isoformen, wobei bis heute 36 verschiedene Wt1-Isoformen beschrieben sind.^{118,120} Insgesamt ist die Isoform D (+/+) die am meisten exprimierte Form. Isoform A (-/-) wird hingegen am wenigsten exprimiert.¹²³ Die Expression der verschiedenen Wt1-Isoformen moduliert höchstwahrscheinlich die zellulären Effekte von Wt1.^{118,120} Als Transkriptionsfaktor reguliert Wt1 ein breites Spektrum an Genen. Zielgene von Wt1 sind insbesondere Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, welche an Differenzierung, Apoptose und epigenetischer Regulation der Zellen beteiligt sind.^{118,124} Nach aktuellen Forschungsergebnissen ist die Transkriptionsfaktoraktivität von Wt1 zum einen abhängig von der Anwesenheit modulierender Co-Faktoren, wie dem Protein Par-4.^{125,126} Zum anderen wird Wt1 durch posttranskriptionelle Modifikation reguliert.^{127,128,129,130} Wt1 ist zudem an der posttranskriptionellen Modifikation von RNAs beteiligt und interagiert

direkt mit anderen Proteinen.^{118,120} Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Wt1-Proteine und Tet-2/-3-Proteine direkt miteinander interagieren und so aktiv in die Methylierung der DNA eingreifen.^{131,132}

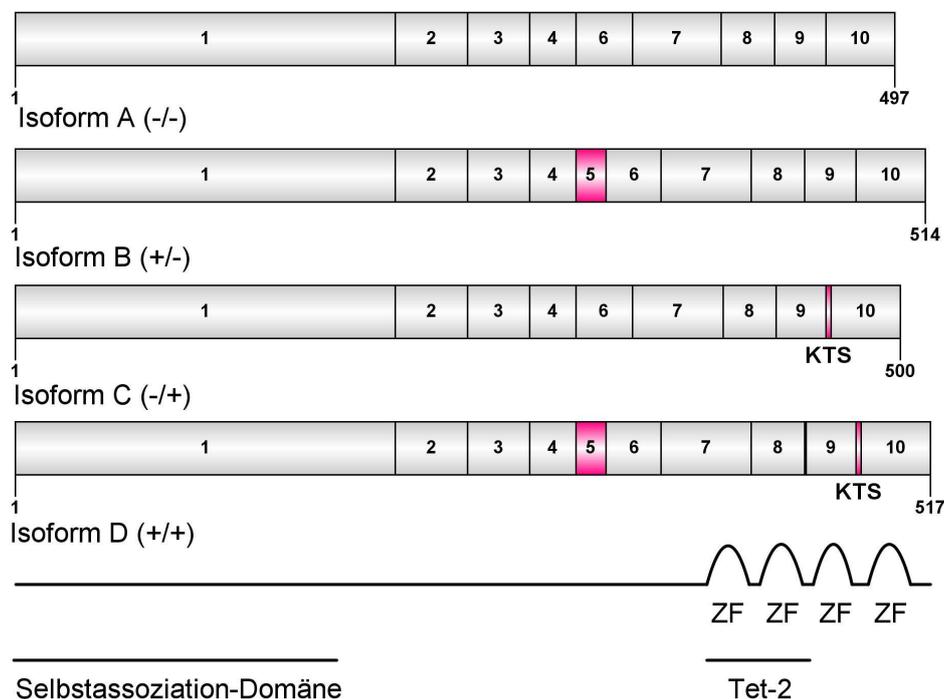


Abbildung 3: Graphische Darstellung der Wt1-Isoformen.

Veranschaulichung der Wt1-Isoformen A (NM_000378), B (NM_024424), C (NM_024425), D (NM_024426), der Wt1-Zinkfingerdomäne (ZF) nach NCBI. Wt1-Tet-2-Proteininteraktionsdomäne (Tet-2) nach Wang et al.¹³¹ Selbstassoziations-Domäne nach Reddy et al.¹³³ Abbildungen wurden mit dem Programm IBS erstellt.¹³⁴

2.3.3 Wt1 in der Organogenese und Hämatopoese

Wt1 ist essentiell für die Organogenese vor allem des Urogenitaltrakts, aber auch des Nervensystems, des Herzens, der Nebennieren, der Milz und des hämatopoetischen Systems, um nur einige zu nennen.^{135,136,137} Mutationen können zu schweren Fehlbildungen der Genitalien, der Niere und anderer Organe führen, sowie zur Entwicklung von Tumoren. *Wt1-Missense-Mutationen* in Exon 9 sind mit seltenen Syndromen wie dem Farsier-Syndrom, dem WAGR-Syndrom (**W**ilms-Tumor, **A**niridie, **g**enitale Fehlbildungen, **g**eistige **R**etardierung), dem Denys-Drash-Syndrom (DDS) assoziiert.¹³⁸ Neben seiner essentiellen Rolle in der Embryogenese ist anzunehmen, dass Wt1 auch im adulten Organismus relevant für die Entwicklung und Differenzierung von Geweben ist. Hier wird Wt1 vor allem in Zellen des Urogenitaltrakts und in hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert.^{120,135,139,140} Physiologisch konnte bisher keine Wt1-Expression in den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des

Knochenmarks nachgewiesen werden. Für CD34+ Progenitorzellen wurde jedoch bei ungefähr 1,2% der Zellen eine Wt1-Expression detektiert.¹⁴¹ Außerdem beschreiben Patmasiriwat et al. eine Hochregulation der Wt1-Expression im Mausmodell in myeloid determinierten Vorläuferzellen. Hier wird Wt1 in ca. 4% der myeloischen Progenitorzellen, ca. 2% der Granulozyten-Monozyten Progenitorzellen und in ca. 17% der Megakaryozyten-Erythrozyten Progenitorzellen exprimiert.¹⁴² Die Wt1-Genexpression scheint somit essentiell für das Überleben, die Expansion und die Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen zu sein. Dementsprechend führt auch die fehlende Wt1-Expression in murinen embryonalen Stammzellen zwar nicht zum Ausbleiben der Hämatopoese jedoch zu einer deutlichen Abnahme dieser.^{143,144} Wt1 nimmt höchstwahrscheinlich in verschiedenen Phasen der Hämatopoese unterschiedliche funktionelle Rollen ein um die Differenzierung und Proliferation der Zellen zu regulieren. Dafür spricht auch, dass die ektopische Expression von Wt1 in hämatopoetischen Zellen in verschiedenen Stadien der Differenzierung unterschiedliche zelluläre Effekte bewirkt.^{145,146,147,148} Auffallend ist, dass die temporäre und zellspezifische Expression von Wt1 in hämatopoetischen Vorläuferzellen große Ähnlichkeit zu dessen Rolle in der Nephrogenese zeigt. Hier konnte bereits gezeigt werden, dass Wt1 essentiell für eine intakte Organogenese ist und, dass *loss-of-function-Mutationen* in einer frühen Phase der Nephrogenese zur Entwicklung von malignen Tumoren der Nieren beitragen.^{149,150}

2.3.4 Wt1 in der akuten myeloischen Leukämie

Das Wt1-Gen wurde erstmals 1990 aus einer B-Zell-Leukämie-Zelllinie isoliert.¹¹⁷ Seitdem wurde in der AML sowohl eine Überexpression von Wt1-Proteinen, als auch Mutationen im Wt1-Gen beschrieben.¹⁵¹ Dies führte zu der Hypothese, dass Wt1 in der AML sowohl als Tumorsuppressor als auch als Onkogen agiert.

2.3.4.1 Wt1 Überexpression

Sowohl in myeloischen als auch in lymphatischen Leukämien kann eine vermehrte Wt1-Expression beobachtet werden, ebenso wie in der Blastenkrise bei CML- und MDS-Patienten.^{151,152} In der AML ist bei 70%-90% der Patienten eine Überexpression von Wt1 zu detektieren.^{153,154,155} Dies führte unter anderem zur erfolgreichen Verwendung von Wt1 als Zielgen in der Immuntherapie, sowie zum Einsatz in der Bestimmung der Resttumorlast (MRD).¹⁵⁶ Es ist jedoch unklar, ob die erhöhte Wt1-Expression in leukämischen Zellen eine funktionelle Rolle in der Tumorentstehung spielt oder lediglich die frühe Differenzierungsstufe der leukämischen Zellen widerspiegelt. In einigen

Studien korrelierte eine hohe Wt1-Expression mit einer höheren Rückfallwahrscheinlichkeit, schlechterem Ansprechen auf Therapien und einem schlechten Überleben der Patienten.^{157,158} Andere Studien konnten diesen Zusammenhang nicht nachweisen.^{159,160} Möglicherweise spielen hierbei auch die Expression der verschiedenen Wt1-Isoformen eine Rolle.¹²³

2.3.4.2 Wt1-Mutationen

Bei bis zu 14% der AML-Patienten werden somatische Mutationen im Wt1-Gen detektiert.^{10,12} Der Großteil der Mutationen sind heterozygot. Dabei sind die häufigsten *Frameshift-Mutationen* und *Non-sense-Mutationen*, vor allem in Exon 7, die zur Trunkierung der Proteine führen. Die zweithäufigsten Mutationen sind *Missense-Mutationen*, vor allem in Exon 9.^{10,12} Wt1-Mutationen sind mit einem jungen Patientenalter, FLT3/ITD und CEBPA Mutationen assoziiert und kommen häufig in der CN-AML vor.^{161,162} Außerdem korrelieren Wt1-Mutation mit einer hohen Anzahl peripherer Blasten, hohen LDH-Werten, sowie mit einer ausgeprägten Leukozytose, was möglicherweise für eine starke proliferative Aktivität der Zellen spricht.^{163,161} In zwei britischen Studien des *Cancer and Leukaemia Group B* (CALGB) und des *Medical Research Council* (MRC) wurde eine schlechte Prognose von Patienten mit Wt1-Mutationen beschrieben, wobei diese jeweils unabhängig vom FLT3/ITD- und NPM1-Mutationsstatus war.^{163,164} In einer Studie der German-Austrian AML Study Group (AMLSG) konnte keine prognostische Signifikanz von Wt1-Mutationen alleine gezeigt werden. Allerdings erreichten Patienten mit Wt1-Mutation und FLT3-ITD-Mutationen weniger häufig eine komplette Remission und hatten ein verkürztes rezidivfreies Überleben verglichen mit Patienten mit FLT3-ITD-Mutationen ohne Wt1-Mutationen.¹⁶¹ Die unterschiedlichen Ergebnisse in den Studien sind möglicherweise auch auf die unterschiedlichen therapeutischen Konzepte zurückzuführen. In der Studie des German-Austrian AML Study Group wurde insgesamt eine höhere kumulative Dosis von Ara-C erreicht, als in den anderen beiden Studien. Möglicherweise gibt dies Hinweis darauf, dass für die Behandlung von Patienten mit Wt1-Mutationen höhere therapeutische Dosen benötigt werden. Zudem konnte in zwei an unserer Klinik durchgeführten Studien, sowie in einer Studie von Queck et al. eine Zunahme von Wt1-Mutationen im Rezidiv der AML beobachtet werden.^{33,34,165} Das Verständnis der rezidiv-assoziierten Mutationen ist in der AML von besonderem Interesse, da diese im Verdacht stehen klonalen Subpopulationen der Leukämie einen Selektionsvorteil zu bieten und damit zu einer

Resistenz gegen Chemotherapien sowie zu einem Progress der Erkrankung führen könnten.^{31,35}

2.3.4.2.1 Wt1 in der epigenetischen Regulation

Die Beobachtung, dass Tet-2-, IDH1/2- und Wt1-Mutationen sich gegenseitig ausschließen, ließ vermuten, dass diese Gene eine funktionell zusammenhängende Gruppe in der AML bilden.⁶² Wang et al. konnten daraufhin zeigen, dass Wt1 direkt mit Tet-2/3-Proteinen interagiert um sie zu ihren DNA-Bindungsstellen zu rekrutieren.¹³¹ Mutationen in Tet-2 führen durch Funktionsverlust zu einer Akkumulation von 5-mC. IDH1/2-Mutationen führen zu einer Akkumulation von α -Hydroxyglutarsäure (2HG), anstelle von α -Ketoglutaräure (aKG), welche Tet-2-Proteine hemmt und dadurch ebenfalls zu einer Akkumulation von 5-mC führt.¹⁶⁶ Damit führen vermutlich sowohl Tet-2-Mutationen als auch IDH1/2- und Wt1-Mutationen zu einer Akkumulation von 5-mC sowie zu einer Abnahme von 5-hmC.^{66,132} Wt1-, Tet-2- und IDH1/2-Mutationen stellen somit eine neue funktionelle Gruppe der AML dar, die sich durch eine fehlregulierte DNA-Methylierung kennzeichnet und sich mit einem hypermethylierten Phänotyp präsentiert.

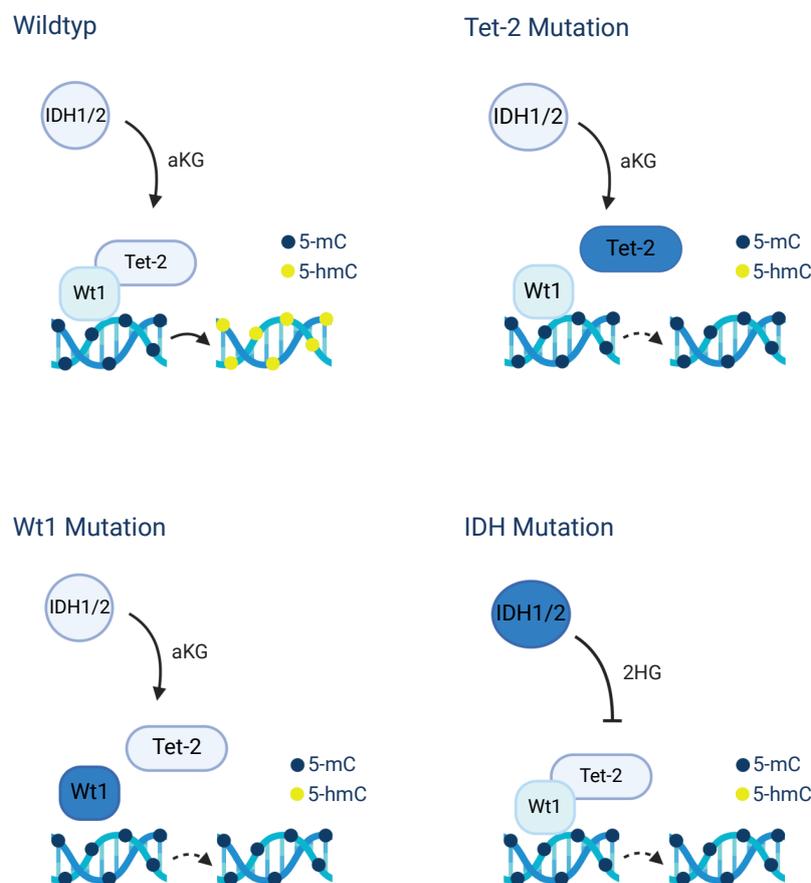


Abbildung 4: Die Auswirkungen von Mutationen im IDH1/2-Tet-2-Wt1-Signalweg.

Graphische Darstellung nach Wang et al.¹³¹

2.4 Fragestellung und Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit ist es Mechanismen in der AML zu identifizieren, die zu Resistenzen gegen Erstlinien- und Zweitlinientherapien führen und damit ein Rezidiv der AML bedingen.

HMA werden für die Therapie älterer AML-Patienten, die keine intensive Chemotherapie erhalten können, angewendet. Diese Patienten erreichen in nur ca. 30% eine hämatologische Verbesserung, das heißt ca. 70% der Patienten sind resistent gegen eine Therapie mit HMA und haben somit eine infauste Prognose. Bis heute sind keine Prognosen über das Ansprechen der Patienten auf die Therapie mit HMA möglich. In der folgenden Arbeit werden mögliche Resistenzmechanismen gegen HMA näher untersucht. Zunächst identifizieren wir leukämische Zelllinien, die gering auf eine Therapie mit HMA ansprechen. Nachfolgend wird die Inkorporation der Agenzien in die DNA/RNA, sowie die epigenetische Markierung der DNA/RNA analysiert und mit dem zytotoxischen Effekt der Medikamente verglichen. Zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit wird zusätzlich die Rolle des epigenetischen Regulators Wt1 in der Resistenz gegen Dec untersucht. Ziel ist es prädiktive Biomarker zu identifizieren, mittels derer Patienten vorselektioniert werden können.

In großen Genomsequenzierungsprojekten konnten in den letzten Jahren umfangreiche Erkenntnisse über die klonale Architektur der Leukämie gewonnen werden. Hierbei wurden immer wieder neue Mutationen beschrieben. Vosberg et al. und Greif et al. haben im AML Rezidiv eine Zunahme von Wt1-Mutationen beschrieben. Welche funktionelle Rolle diese Mutationen bei der Entstehung und dem Progress der AML sowie in der Zytostatikaresistenz der Zellen spielen, ist vollkommen unbekannt. In dieser Arbeit werden in Anlehnung an die Publikation von Greif et al., vier Wt1 Mutationen, je zwei rezidiv-spezifische und zwei stabil-exprimierte, funktionell charakterisiert. Parallel werden die Wt1-Isoformen A (-/-) und D (+/+) funktionell untersucht. Wir konzentrieren uns bei unseren Analysen vor allem auf den Einfluss der Mutationen und der Isoformen auf das Proliferationsverhalten, sowie die Zytostatikasensitivität gegenüber dem Erstlinientherapeutikum Ara-C. Zusätzlich untersuchen wir den Effekt der Wt1-Mutationen und der Wt1-Isoformen auf die epigenetische Markierung der Zellen, sowie auf die Behandlung mit Dec, dabei wird Bezug auf das erste Teilprojekt der Arbeit genommen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien

Material	Art.-Nr.	Hersteller
1kb DNA-Leiter	G571A	Promega, USA
2-Mercaptoethanol	M3148	Sigma-Aldrich, USA
2-Propanol	70015303	AppliChem, Deutschland
Agarose	3810.1	Carl Roth, Deutschland
Albumin V(pH7.0) (BSA)	A1391	AppliChem, Deutschland
Ampicillin	A0166	Sigma-Aldrich, USA
Aprotinin	10820	Sigma-Aldrich, USA
Bradfordreagenz	5000006	Bio-Rad, USA
Calcium Chloride 2-hydrate	A4689	AppliChem, Deutschland
CutSmart Puffer	B7204S	New England Biolabs, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	A3672	AppliChem, Deutschland
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM), Glukose, GlutaMax™	31966-021	Thermo Fisher Scientific, USA
DPBS	P04-36500	Pan Biotech, Deutschland
EDTA	ED-500G	Sigma-Aldrich, USA
Ethanol	64-17-5	Merck Millipore, Deutschland
Fetal Bovine Serum (FBS)	P111912	Pan-Biotech, Deutschland
Gel Ladefarbstoff lila 6X	B705S	New England Biolabs, Deutschland
HBS-Puffer 2X	51558	Sigma-Aldrich, USA
HEPES	A3724.0500	AppliChem, Deutschland
HpaI	R0105	New England Biolabs, Deutschland
Insulin, human, recombinant (E. coli)	C-60212	PromoCell, Deutschland
Kanamycin	K1377	Sigma Aldrich, USA
KCL	A2939	AppliChem, Deutschland

Kpnl	R3142	New England Biolabs, Deutschland
Ladefarbstoff lila 6x		New England Biolabs, Deutschland
L(+)-Ascorbinsäure (Vitamin-C)	T1395-1G	Sigma-Aldrich, USA
LB-Agar	X965.1	Carl Roth, Deutschland
LB-Medium	X964.1	Carl Roth, Deutschland
Lipofectamine 3000	L3000001	Thermo Fisher Scientific, USA
MEM Alpha Medium (1X), mit Nukleotiden	12571-063	Thermo Fisher Scientific, USA
MEM Alpha Medium (1X), ohne Nukleotide	22561-021	Thermo Fisher Scientific, USA
Methanol	8388.5	Carl Roth, Deutschland
Milchpulver	T145.1	Carl Roth, Deutschland
Non-essential amino acids (NEA) 100x	K0293	Biochrom, Deutschland
Nukleotid-Mix	NU-1024L	Jena Bioscience, Deutschland
Orthovanadat	S-6508	Sigma-Aldrich, USA
Penicillin-Streptomycin (10 000 U/ml Pen; 10mg/ ml Strep)	P-06-07050	Pan-Biotech, Deutschland
Protein-Leiter Spectra™	26623	Thermo Fisher Scientific, USA
Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate	32132	Thermo Scientific, USA
PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride) Protease-Inhibitor	93482	Sigma-Aldrich, USA
Polybrene	H9268	Sigma-Aldrich, USA
Quick-load Purple DNA ladder	N0556S	New England Biolabs, Deutschland
RPMI-Medium 1640 (1X) + GlutaMax™	61870-010	Thermo Fisher Scientific, USA
S.O.C.-Medium	46-0821	Invitrogen, Deutschland
Sodium Pyruvate	0981E	Biochrom, Deutschland
SYBR Safe	S33102	Invitrogen, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	T9281	Sigma-Aldrich, USA

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane	AE15.2	Carl Roth, Deutschland
Trypan Blau	T8154	Sigma-Aldrich, USA
Trypsin-EDTA 0,05% (1X)	1896473	Gibco ^R by Life Technologies TM , UK
Tween20	P1379	Sigma-Aldrich, USA
XbAI	R0145	New England Biolabs, Deutschland
(+/-)-Alpha-Liponsäure	T1395	Sigma-Aldrich, USA

3.1.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 3: Puffer und Lösungen

Reagenz	Zusammensetzung
4% Sammelgel	3 mL H ₂ O destilliert; 1,3 mL Tris Puffer (pH 6,8); 0,7 mL Polyacrylamid; 25 µL 10% APS (Ammoniumpersulfat); 50 µL 10% SDS (Natriumdodecylsulfat); 5 µL TEMED (Tetramethylethylendiamin)
5X KCM	500 mM KCL, 250 mM MgCl ₂ , 150 mM CaCl ₂
10% Trenngel	2,2 mL H ₂ O destilliert; 3 mL Tris Puffer (pH 8,8); 2,7 mL Polyacrylamid; 50 µL 10% APS (Ammoniumpersulfat); 100 µL 10% SDS (Natriumdodecylsulfat); 5 µL TEMED (Tetramethylethylendiamin)
12,5% Trenngel	1,5 mL H ₂ O destilliert; 3 mL Tris Puffer (pH 8,8); 3,3mL Polyacrylamid; 50 µL 10% APS (Ammoniumpersulfat); 100 µL 10% SDS (Natriumdodecylsulfat); 5 µL TEMED (Tetramethylethylendiamin)
Agarosegel 0,8-1,5%	0,8-1,5% Agarose in 1x TAE Puffer mit SYBR Safe 1:10000
Elektrophorese-Puffer 10X	151,4 g Tris (pH 8,3), 720,7 g Glycin, 50 g SDS, auf 5 L mit destilliertem H ₂ O auffüllen
Gel-Transfer-Puffer	15 g Tris, 71 g Glycin, 790 g Methanol, auf 5 L mit destilliertem H ₂ O auffüllen

Lämmli-Puffer 2X	4% SDS; 20% Glycerol; 10% Mercaptoethanol; 0,004% Bromphenol blau; 0,125 M Tris pH 6,8 mit HCl eingestellt
Lysis-Puffer	25 mL 1M HEPES (pH 7.5); 15 mL 5M NaCl; 2,5 mL 200 mM EDTA; 100 mL 50% Glycerol; 5 mL Triton X-100; 2,1 g NaF; 2,23 g Na ₄ P ₂ O ₇ ·10H ₂ O
Lysis-Reagenz	5 mL Lysispuffer; 25 µL Aprotinin; 50 µL PMSF (Protease-Inhibitor); 50 µL Orthovanadat
TAE-Puffer 10x (pH 8,0)	242,3 g Tris; 57,1 ml Ethansäure 100%; 18,61 g EDTA 2Na x 2H ₂ O; auf 5 L mit destilliertem H ₂ O auffüllen
TBS-Puffer 10x (pH 8,0)	60,57 g Tris; 483,3 g Natriumchlorid; H ₂ O, pH mit HCl eingestellt
TBS-T-Puffer	100 mL TBS-Puffer 10x (pH 8,0); 1 mL Tween 20; 900 mL H ₂ O
Tris-HCl-Puffer pH 6,8	908,55 g Tris (pH 6,8); auf 5 L mit destilliertem H ₂ O auffüllen
Tris-HCl-Puffer pH 8,8	908,55 g Tris (pH 8,8); auf 5 L mit destilliertem H ₂ O auffüllen

3.1.3 Zytokine, Chemotherapeutika und Inhibitoren

Die Inhibitoren Aza und Dec sowie das Zytostatikum Ara-C wurden in DMSO unter sterilen Bedingungen gelöst und in geringen Mengen bei -80°C gelagert um ein wiederholtes Auftauen und Gefrieren der Lösungen zu verhindern.

Tabelle 4: Zytokine, Chemotherapeutika und Inhibitoren

Material	Beschreibung	Art.-Nr.	Hersteller
Interleukin-3 (IL-3)	Rekombinantes murin	3500584	Immuno Tools
Azacitidin	50mM Inhibitor	S1782	SelleckChem, USA
Decitabin	50mM Inhibitor	S1200	SelleckChem, USA
Ara-C	20mM Zytostatikum	S1648	SelleckChem, USA
MG-132	Proteasomen Inhibitor	133407-82-6	Calbiochem ^R , Deutschland

siRNA Wt1	siRNA-ID.: S14912	4392420	Silencer ^R Select by life technologies TM
Stealth siRNA	Negativ Kontrolle	12935200	Thermo Fisher Scientific, USA

3.1.4 Antikörper

Tabelle 5: Antikörper

Antikörper	Art.-Nr.	Hersteller	Verdünnung
Anti-Wt1 (D6M6S)	13580	Cell Signaling Technology, USA	1:1000
Anti-GAPDH (6C5)	Sc-32233	Santa Cruz, USA	1:6000
Anti-ALPHA-Tubulin-Maus	T6199	Sigma-Aldrich, USA	1:20000
Ziege-Anti-Maus-IgG	Sc-516102	Santa Cruz Biotechnology, USA	1:6000
Ziege-Anti-Hase-IgG	A-0545	Sigma Aldrich, USA	1:6000

3.1.5 Plasmide

Tabelle 6: Plasmide

Material	Beschreibung	Hersteller
pCMV6- Entry Myc-DDk-tagged; Wt1_Isoform A	Expressionsvektor	OriGene Technologies, USA
pCMV6-Entry Myc-DDk-tagged; Wt1_Isoform D	Expressionsvektor	OriGene Technologies, USA
pCDNA6/V5-His ABC	Expressionsvektor	Invitrogen, Deutschland
pMSCV-IHRES-eGFP-(MIG)	Retroviraler Expressionsvektor	AG Spiekermann

3.1.6 Oligonukleotide

Tabelle 7: Sequenzierprimer

Bezeichnung	Primer-Sequenz 5'-3'	Tm (°C)
Wt1_Vorwärts_1	CAGGGTTACAGCACGGTCA	60.728
Wt1_Vorwärts_2	CCAGTGTAAACTTGTCAGCGA	60.339
Wt1_Rückwärts_1	TGGGATCCTCATGCTTGAAT	60.426

Tabelle 8: Mutageneseprimer

Bezeichnung	Primer-Sequenz 5'-3'	Tm(°C)
Wt1_D464G Vorwärts	TTCTCCCGGTCCGGCCACCTGAAGACC	78.61 °C
Wt1_D464G Rückwärts	GGTCTTCAGGTGGCCGGACCGGGAGAA	78.61 °C
Wt1_R380W Vorwärts	GTAGCCCCGACTCTTGTATGGTCGGCATCTG	80.31 °C
Wt1_R380W Rückwärts	CAGATGCCGACCATAACAAGAGTCGGGGCTA	80.31 °C
Wt1_R430x Vorwärts	GACTTCAAGGACTGTGAATGAAGGTTTTCTCGTTC AG	78.28 °C
Wt1_R430x Rückwärts	CTGAACGAGAAAACCTTCATTCACAGTCCTTGAAG TC	78.28 °C
Wt1_S381x Vorwärts	GCCCCGACTCTTGTACGGTAGGCATCTGAG	80.27 °C
Wt1_S381x Rückwärts	CTCAGATGCCTACCGTACAAGAGTCGGGGC	80.27 °C

3.1.7 Kits

Tabelle 9: Kits

Material	Hersteller
In-Fusion [®] HD Cloning Kit	Clontech, Frankreich
CloneAmp [™] HiFi PCR Premix	Clontech, Frankreich
MycoAlert [®] Mycoplasma Detection Kit	Lonza, Schweiz
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Deutschland
QIAGEN Plasmid Mini Kit	Qiagen, Deutschland
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Deutschland
QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis	Agilent Technologies, USA

3.1.8 Geräte

Tabelle 10: Geräte

Material	Hersteller
CO ₂ -Brutschrank der Serie CB 210	Binder, Deutschland
Cytospin	Shandon Labortechnik , Deutschland
Drehrad	Phoenix Instrument, Deutschland
Durchlichtmikroskop	Carl Zeiss, Deutschland
Eismaschine	Hoshizaki, Niederlande
Elektrophorese-Kammer Xcell SureLock [™]	Invitrogen, Deutschland
FACS Vantage SE	BD Biosciences, USA
Feinwaage	Kern & Sohn, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Dmi8 (11889113)	Leica, Deutschland
Fusion SL 4 400 WL	Vilber Lourmat, Deutschland
Gefrierbehälter Mr. Frosty [™]	Thermo Fisher Scientific, USA

Gefrierschrank -80°C	Thermo Fisher Scientific, USA
GloMax® Discover Mikropplatten Lesegerät	Promega, USA
Heizblock	Eppendorf, Deutschland
Inkubator	Binder, Deutschland
Kipp-/Rollenmischer	Carl Roth, Deutschland
Kühlgerät -20°C	Liebherr, Schweiz
Kühlschrank	Tritec, Deutschland
Magnetrührer	Heidolph, Deutschland
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Scientific, USA
Netzgerät PowerPac™ 300	Bio Rad, Deutschland
PCR Thermocycler PeqSTAR	Peqlab, USA
pH Messgerät	WTW, Deutschland
Pipetten	Gilson, Deutschland
Sicherheitswerkbänken	Brener, Deutschland
Stickstofftanks	Cryoson, Deutschland
Tischzentrifuge Centrifuge 5424 R	Eppendorf, Deutschland
Tischzentrifuge	Sigma, Deutschland
Transferkammer	Bio-Rad, Deutschland
Vi-Cell™ XR	Beckman Coulter, Deutschland
Vortexer	Cenco, Niederlande
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Deutschland
Zentrifuge Heraeus™ Multifuge™ X1R/ Heraeus Megafuge 40R	Thermo Fisher Scientific, USA

3.1.9 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 11: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Diamond Tower Pack D10, D200, D1000	Gilson, USA
Einmal-Küvetten	Brand, Deutschland
Erlenmeyerkolben 50-1000 mL	Duran, Deutschland
Gelkassetten	Thermo Fisher Scientific, USA
Glasflaschen 100-1000 mL	Duran, Deutschland
Konische Zentrifugenröhrchen 15 mL, 50 mL	Sarstedt, Deutschland
Konische Zentrifugenröhrchen 50 mL	Thermo Fisher Scientific, USA
Mikroröhrchen Safe Seal 1,5 mL, 2,0 mL	Sarstedt, Deutschland
Multiwell Platten 6-Well	Greiner Bio One, Deutschland
Nalgene™ Kryoröhrchen	Thermo Fisher Scientific, USA
Nitrocellulose-Membran 0.45 µM	GE Healthcare, UK
PCR-Röhrchen 0,2 mL	Biozym Scientific, Deutschland
Pipettenspitzen 5-10 µL	Sorenson, USA
Pipettenspitzen 0,1-10 µL	Sorenson, USA
Pipettenspitzen Gel-loading	Sigma-Aldrich, USA
Sterile Spritzenvorsatzfilter 0,2 µM	Sarstedt, Deutschland
TC-Platten 6- bis 96-well, Standard	Sarstedt, Deutschland
TC-Platten 6- bis 96-well, Suspension	Sarstedt, Deutschland
TC-Platte 10 cm	Sarstedt, Deutschland
TC-Flaschen T25, T75, T175 Standard	Sarstedt, Deutschland
TC-Flaschen T25, T75, T175 Suspension	Sarstedt, Deutschland
VASCO® blaue Nitril Untersuchungshandschuhe	B. Braun, Deutschland

3.1.10 Programme

Tabelle 12: Programme

Bezeichnung	Anwendung	Bezugsquelle
Biorender	Illustrationen	Biorender AG, online
E-Capt 15.06	Agarosegelaufzeichnung	Vilber Lourmat, Deutschland
Fusion Capt Advance 16.11	Darstellung und Quantifizierung von Immunoblots	Vilber Lourmat, Deutschland
GraphPad Prism 8.4.3	Statistische Analysen und Darstellung der Daten	GraphPad Software, USA
IBS 1.0	Graphische Darstellung von Proteinen	CUCKOO AG, online
ImageJ 1.52q	Quantifizierung von Immunoblots	ImageJ developers, online
Incscape 0.92.2	Abbildungsdesign	Incscape, online
Mendeley Toolbar 1.19.4	Referenzenverwaltung	Mendeley, Elsevier
Microsoft Office 16.38	Manuskript	Microsoft, USA
SnapGene 5.0.6	Primerdesign und Darstellung der Konstrukte	GSL Biotech LLC, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Die Zelllinien (Tab. 13) wurden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen. Phoenix eco-Zellen wurden bei der American Type Culture Collection (ATCC, USA) bezogen. Alle Zelllinien wurden nach Herstellerangaben kultiviert. Die Zellkulturen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und Wasserdampfsättigung in einem Brutschrank inkubiert, dies für maximal zwei Monate und unter regelmäßigen Kontrollen des Zellwachstums und ihrer Zellvitalität unter dem Durchlichtmikroskop. Bei Verdacht auf eine Kontamination mit Mykoplasmen wurden die Zellen mit dem MycoAlert Mycoplasma Detection Kit nach Herstellerangaben getestet und bei Verunreinigungen verworfen. Das Zentrifugieren der Zellen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Es wurde, wenn nicht anders angegeben, auf 37°C erwärmtes Zellkulturmedium verwendet.

Tabelle 13: Zelllinien

Bezeichnung	Kat.-No.	Spezies	Zelltyp
Ba/F3	ACC-300	Murin	Pro B-Zelllinie
Eol-1	ACC-386	Human	AML
HL-60	ACC-3	Human	AML
Kasumi-1	ACC-220	Human	AML
KG-1 α	ACC-421	Human	AML
K562	ACC-10	Human	CML in Blastenkrisis
ME-1	ACC-537	Human	AML
Molm-13	ACC-554	Human	AML
MV4-11	ACC-102	Human	Akute monozytische Leukämie
MONO-MAC-1 (MM1)	ACC-252	Human	Akute monozytische Leukämie
MONO-MAC-6 (MM6)	ACC-124	Human	Akute monozytische Leukämie
NB-4	ACC-207	Human	Akute promyelozyten Leukämie
OCI-AML3	ACC-582	Human	AML
OCI-AML5	ACC-247	Human	AML
U-937	ACC-5	Human	Histiozytisches Lymphom
SKM-1	ACC-547	Human	AML
THP-1	ACC-16	Human	Akute monozytische Leukämie
HEK-293T	ACC-305	Human	Embryonale Nierenzellen
Phoenix Eco	CTRL-3214	Human	Embryonale Nierenzellen

3.2.1.1 Kultivieren von Zellen

Zellkulturmedien RPMI, MEM, DMEM wurden bei Thermo Fisher Scientific (USA) bezogen und mit 0,5% Penicillin und Streptomycin, sowie mit 10% oder 20% fetalem bovinem Serum versetzt. Je nach Zellkultur wurden nach Herstellerangaben weitere Zusätze verwendet. MM1- und MM6-Zellen wurden unter Zusatz von 1 mM *Sodium Pyruvate* und 2 mM L-glutamine + nicht-essenziellen Aminosäuren kultiviert, bei MM6-Zellen wurde zusätzlich 10 µg/mL Humaninsulin hinzugefügt. Ba/F3-Zellen wurden unter Zugabe von Interleukin 3 (IL-3) in RPMI-Medium mit 10% FBS kultiviert. Als IL-3 Quelle diente das von WEHI-Zellen in den Medienüberstand produzierte IL-3. Dafür wurde der Medienüberstand der WEHI-Zellen abgenommen und gefiltert bevor er dem RPMI-Medium hinzugefügt wurde. Wenn nicht anders angegeben wurden Ba/F3-Zellen in RPMI-Medium mit 10% WEHI Überstand kultiviert.

3.2.1.2 Passagieren von Suspensionszellen

Das Passagieren von Suspensionszellen erfolgte alle 48 bis 72 Stunden. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:3 bis 1:5 abgenommen, zentrifugiert, der Überstand verworfen und in ein auf 37°C erwärmtes, frisches Medium aufgenommen und kultiviert.

3.2.1.3 Passgieren von adhärennten Zellen

Das Passagieren von adhärennten Zellen erfolgte ebenfalls alle 48 bis 72 Stunden. Dafür wurde der Überstand entfernt, die Zellen mit D-PBS gewaschen, für 5 Minuten mit Trypsin inkubiert und mit erwärmtem DMEM-Medium vorsichtig von der Platte gelöst. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:3 abgenommen, in ein Falcon aufgenommen, zentrifugiert, der Überstand verworfen und in ein auf 37°C erwärmtes DMEM-Medium aufgenommen und kultiviert.

3.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl und Vitalität der Zellen wurde im Vi-Cell™ XR (Beckman Coulter, Deutschland) mittels Standard-Trypanblau Methode bestimmt. Die Methode basiert auf der Diffusion des blauen Farbstoffs durch die poröse Membran der toten Zellen, diese werden dadurch angefärbt und können so identifiziert werden. Anschließend wurden die Zellen im Vi-Cell™ XR gezählt. Die Zahl der vitalen Zellen der unbehandelten Kontrollen wurde in Proliferationsversuchen als 100% gesetzt.

3.2.1.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden zur Lagerung eingefroren. Dafür wurden 6×10^6 Zellen abgenommen, zentrifugiert, mit D-PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen um die Zellen in 1mL der Gefrierlösung FCS mit 10% DMSO aufzunehmen. Anschließend wurde die Suspension in einem Nalgene™ Kryoröhrchen (Thermo Fisher Scientific, USA) aufgenommen, in einen mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter gegeben und bei -80°C über 72 Stunden schonend eingefroren. Langfristig wurden die Zellen bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff in Stickstofftanks gelagert.

Zur Inkulturnahme wurden die gefrorenen Zellen, im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, in ein auf 37°C erwärmtes Medium aufgenommen und zentrifugiert. Der Überstand der Zellkultur wurde verworfen, die Zellen in frischem Medium aufgenommen und in einer 24-Well Platte bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Zellkultur konnte mit der Zeit expandiert werden.

3.2.1.6 Transiente Transfektion und stabile Transduktion

Die stabile Transduktion der Ba/F3-Zellen erfolgte mittels retroviraler Transduktion. Dieser wurde durch transiente Transfektion von Phoenix eco-Zellen oder HEK-293T-Zellen generiert.

3.2.1.6.1 Transiente Transfektion

Am Tag vor der Transfektion wurden $6,5 \times 10^6$ Phoenix eco- oder HEK-293T-Zellen, auf einer 10 cm Platte, in 10 ml DMEM-Medium ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium auf frisches DMEM-Medium gewechselt. 2 Stunden nach Mediumwechsel wurde die Transfektion durchgeführt. Dafür wurden 13 μg des DNA-Plasmids, 450 μL autoklaviertes H_2O und 2M CaCl_2 vorsichtig vermischt und nach Zugabe von 500 μL HBS-Puffer 2X vier Minuten inkubiert. Die Lösung wurde anschließend tröpfchenweise auf den Zellen verteilt und die Zellen bis zum Medienwechsel nach 18 Stunden inkubiert. Nach Ablauf von 48 Stunden wurde die Effizienz der Transfektion kontrolliert. Bei erfolgreicher Transfektion exprimierten die Zellen das auf den DNA-Plasmiden konjugierte grün fluoreszierende Protein (GFP). Durch die Expression des GFPs emittierten die Zellen blaues oder ultraviolettes Licht in einer Wellenlänge, die unter dem Fluoreszenzmikroskop als grün wahrgenommen wurde. Anschließend wurde der Virusüberstand abgenommen und über einen sterilen Spritzenfilter gefiltert. Die Zellen wurden entweder lysiert und die Proteinexpression per Immunoblot detektiert oder verworfen.

3.2.1.6.2 Stabile Transduktion

Für die Transduktion der Ba/F3-Zellen wurde der in 3.2.1.6.1 produzierte Virusüberstand verwendet. Zunächst wurden $1,5 \times 10^6$ Ba/F3-Zellen zentrifugiert, von dem Überstand getrennt und in 1,5 mL frischem Medium aufgenommen. Es wurde eine Suspension aus den Zellen, 1,5 mL Virusüberstand und 8 $\mu\text{g/mL}$ Polybrene hergestellt und in einer 6-Well-Platte bei 30°C , 90 Minuten, mit 2500 rpm zentrifugiert. Nach 2,5 Stunden Inkubationszeit wurde die Suspension mit frischem Medium verdünnt und kultiviert. Nach ausreichender Expansion wurden die Zellen per fluoreszenzaktivierter Zellsortierung mit dem FACS Vantage SE (BD Biosciences, USA) sortiert, bis sie eine zu über 90% homogene Population erreichten.

3.2.1.7 Leukämische Zelllinien

3.2.1.7.1 Proliferationsanalyse unter Azacytidin und Decitabin Behandlung

Zur Analyse des Proliferationsverhaltens leukämischer Zellen unter medikamentöser Therapie wurden Verdünnungsreihen der Medikamente angesetzt und die Zellen in diesen 72 Stunden inkubiert. Ausgehend von 3 unabhängigen Duplikaten wurden Proliferationskurven erstellt, mit Hilfe derer die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50} -Wert) errechnet wurde.

Die in DMSO gelösten 50 nM Ausgangslösungen wurden mit Medium auf Aza Konzentrationen von 20 μM bis 0,1 μM , sowie Dec Konzentrationen von 5 μM bis 0,01 μM verdünnt. Bei jedem Versuchsansatz wurde eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt. Nach Zählung und Vitalitätsprüfung wurden 2×10^6 Zellen abgenommen, zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 4 mL warmem Medium aufgenommen. Pro Probe wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen in eine Kammer einer 48-Well Platte vorgelegt, das Medikament zugesetzt und mit Medium auf ein Volumen von 1 mL gebracht. Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden bei 37° im Brutschrank wurde die Zellzahl per Vi-CellTM XR (Beckman Coulter, Deutschland) ermittelt.

Je nach Versuchsansatz wurden verschiedene Zellkulturmedien und Zusätze verwendet. Für den Zusatz von Vitamin C wurden 100 mg in 10 ml destilliertem H_2O gelöst, über einen sterilen Spritzenfilter gefiltert und in Konzentrationen von 284 μM und 56,8 μM der Zellkultur zugesetzt. Bei Versuchsansätzen mit Liponsäure wurden 0,2 mg in 1 mL destilliertem H_2O gelöst, über einen sterilen Spritzenfilter gefiltert und in einer Konzentration von 971 μM der Zellkultur zugesetzt. Der Zusatz von Nukleotiden in der Zellkultur erfolgte indem 624 mL Zellkulturmedium mit 1 mg Nukleotide versetzt

wurden, dadurch entstanden Nukleotid-Konzentrationen von 0,04 mM. Das Medium wurde nachfolgend für die Versuche verwendet.

3.2.1.7.2 Generierung von Zellpellets unter Behandlung mit Aza und Dec

Die Bestimmung des Aza- und Dec-Gehalts der DNA/RNA sowie der epigenetischen DNA Basen 5-mC und 5-hmC wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Carell (Chemie Department der LMU) durchgeführt.

Die in DMSO gelösten 50 nM Ausgangslösungen wurden mit RPMI-Medium auf eine Aza-Konzentration von 3 μ M, sowie in eine Dec-Konzentration von 0,5 μ M verdünnt. Als Kontrolle wurde bei jedem Probenansatz eine mit 6 μ l DMSO behandelte Probe mitgeführt. Es wurden 12 $\times 10^6$ Zellen abgenommen, zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen in 24 mL RPMI-Medium aufgenommen und in Suspensionsflaschen überführt. Die Medikamente wurden zuletzt hinzugefügt. Die Proben wurden für 24 Stunden oder für 72 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Für die ersten Messungen (4.1.3) wurden 5 $\times 10^6$ Zellen abgenommen, zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen in 1 mL der Gefrierlösung, aus FCS mit 10% DMSO, aufgenommen und gefroren, wie bereits in 3.2.1.5 beschrieben. Dies stellte sich als nicht optimal für die analytischen Methoden heraus. Für die nachfolgenden Messungen (4.1.4) wurden die Zellen deshalb wie folgt gefroren: Es wurden 5 $\times 10^6$ Zellen abgenommen, zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Probe mit kühlem D-PBS gewaschen und in ein Mikroröhrchen SafeSeal (Sarstedt, Deutschland) überführt. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand sorgfältig abgenommen. Der möglichst flüssigkeitsarme Zellrest wurde anschließend in flüssigem Stickstoff gefroren. Anschließend wurden die Analysen von Sarah Schiffers (AG Prof. Carell [Chemie Department der LMU]), wie in 2.2.4.3 beschrieben, durchgeführt.¹¹⁶

3.2.1.8 Ba/F3-Zellen

3.2.1.8.1 Proliferationsanalyse unter Ara-C und Dec Behandlung

Zur Analyse des Proliferationsverhaltens Wt1-transduzierter-Ba/F3-Zellen unter medikamentöser Therapie wurden Verdünnungsreihen der Medikamente angesetzt und die Zellen in diesen 72 Stunden inkubiert. Ausgehend von mindestens 3 unabhängigen Duplikaten wurden Proliferationskurven erstellt, anhand derer der IC₅₀-Wert errechnet wurde.

Die in DMSO gelösten 20 mM Ara-C- und 50 mM Dec-Ausgangslösungen wurden mit Medium auf Konzentrationen von 1 μ M bis 0,01 μ M verdünnt. Bei jedem Versuchsansatz

wurde eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt. Nach Zählung und Vitalitätsprüfung wurden $5,6 \times 10^5$ Zellen abgenommen und zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 7mL erwärmtem Medium resuspendiert. Pro Probe wurden 4×10^4 Zellen in ein Fach einer 48-Well Platte vorgelegt und nach Zusatz des Medikaments mit Medium auf ein Volumen von 1mL gebracht. Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden bei 37° im Brutschrank wurde die Zellzahl per Vi-Cell™ XR (Beckman Coulter, Deutschland) ermittelt.

3.2.1.8.2 Behandlung mit dem MG-132-Proteasomeninhibitor

Zur Untersuchung eines möglichen proteasomalen Abbaus der Wt1-Proteine in Ba/F3-Zellen wurden 5×10^6 Zellen abgenommen, zentrifugiert, der Überstand verworfen und in 10 mL frisches Medium aufgenommen. Nach Zugabe des MG-132-Proteasomeninhibitors in Konzentrationen von $10 \mu\text{M}$ und $20 \mu\text{M}$ wurden die Zellen für 4 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen, sowie die Analyse der Wt1-Expression im Immunoblot.

3.2.1.8.3 Generierung von Zellpellets Wt1 transduzierter Ba/F3-Zellen

Die Bestimmung des 5-mC- und 5-hmC-Gehalts der Wt1-transduzierten Ba/F3-Zellen wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Professor Carell (Chemie Department der LMU) durchgeführt. Hierfür wurden 5×10^6 Zellen abgenommen, zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen mit D-PBS gewaschen und in ein Mikroröhrchen SafeSeal (Sarstedt, Deutschland) überführt. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand sorgfältig abgenommen. Der möglichst flüssigkeitsarme Zellrest wurde abschließend in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Analysen wurden von Sarah Schiffers (AG Prof. Carell [Chemie Department der LMU]), wie in 2.2.4.3 beschrieben, durchgeführt.¹¹⁶

3.2.1.8.4 IL-3 abhängige Proliferation Wt1 transduzierter Ba/F3-Zellen

Wt1-transduzierten Ba/F3-Zellen wurden unter abnehmenden IL-3 Konzentrationen kultiviert und ihr Proliferationsverhalten untersucht. Dafür wurden 4×10^4 Zellen in RPMI-1640-Medium, mit 10% FBS, in einer 48-Well-Platte ausgesät und mit rekombinantem IL-3 in Konzentrationen von 1; 0,1; 0,01 ng/mL oder ohne IL-3 für 72 Stunden bei 37° im Brutschrank inkubiert und abschließend die Zellzahl ermittelt.

3.2.2 Proteinbiochemische Methoden

Die Proteinexpression wurde mit der Methode des Immunblots, auch Western Blot genannt, untersucht. Die Proteingewinnung setzte die vorangegangene Lyse der Zellen voraus. Anschließend konnten diese auf eine Trägermembran übertragen werden um sie mit spezifischen Antikörpern nachzuweisen und zu quantifizieren.

3.2.2.1 Proteinisolation

Zunächst erfolgte die Proteinisolation. Um die vorzeitige Denaturierung der Proteine zu verhindern wurde hierbei stets bei niedrigen Temperaturen auf Eis gearbeitet.

Nach Herstellung des Lysisreagenz wurden die Suspensionszellen gezählt, 5×10^6 Zellen abgenommen, zentrifugiert und zweimal mit kaltem D-PBS gewaschen um sie erneut zu zentrifugieren. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 100 μL Lysisreagenz aufgenommen. Adhärenente Zellen wurden mit D-PBS gewaschen, für 5 Minuten mit Trypsin inkubiert und mit 37°C warmen DMEM-Medium von der Platte gelöst. Anschließend wurden sie in ein Röhrchen aufgenommen, zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden, je nach Größe der Zellkultur, in 300-600 μL Lysisreagenz resuspendiert. Folgende Schritte erfolgten analog für Suspensionszellen und adhärenente Zellen. Die in Lysisreagenz aufgenommenen Zellen wurden 30 Minuten auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert und anschließend bei 13000 rpm in der Kühl-Zentrifuge bei 4°C zentrifugiert. Dadurch wurden die löslichen Proteine von den Zellresten getrennt und konnten mit dem Überstand abgenommen werden.

3.2.2.2 Bradford Proteinbestimmung

Um einheitliche Proteinmengen zu erhalten wurden die Proteinkonzentrationen per photometrischer Methode nach Bradford bestimmt. Es wurde 250 μL Bradfordreagenz 1:5 verdünnt und mit 1 μL Proteinlysate und 4 μL Wasser für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion wurde mit dem GloMax[®] Discover (Promega, USA) bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Durch die vorangegangene Messung einer Verdünnungsreihe mit bovinem Serum Albumin bekannter Konzentrationen bei gleicher Wellenlänge, konnte die Eichformel aufgestellt werden. Die Proben wurden jeweils unter Vergleich einer Kontrolle ohne Proteinlysate gemessen und die exakte Proteinmenge der Proben errechnet.

3.2.2.3 SDS-Gel Proteinelektrophorese

Die SDS-Gel Proteinelektrophorese diente dazu die Proteine an Hand ihrer Größe aufzutrennen. Die Proteine wandern dabei an einem elektrischen Feld Richtung Anode am unteren Ende des Gels durch die gitterartige Struktur des Polyacrylamid-Gels hindurch. Dafür wurden sie vorweg denaturiert und durch die Zugabe des Lämmli-Puffer negativ geladen.

Die Komponenten der Trenngels wurden wie in der in (Tab. 3) angegebenen Reihenfolge gemischt und das 10%-12.5% Trenngel zügig in die unteren dreiviertel einer Gelkassette gefüllt. Der Überstand wurde mit Isopropanol aufgefüllt. Nach 30 Minuten war das Gel in einer waagrechten Linie auspolymerisiert und das obere Viertel der Gelkassette wurde mit einem 4% Sammelgel befüllt. Die für die Aufteilung der Proben nötigen Depottaschen wurden durch einen in das Sammelgel gesteckten Kamm erzeugt. Vor Verwendung wurde der Kamm entfernt und die Taschen mit vollentsalztem Wasser gespült. Die Proteinlysate wurden im Verhältniss 1:1 mit Lämmli-Puffer 2X gemischt und mit Wasser auf einheitliche Volumina gebracht (20-40 μ L). Die Proben wurden, nach 5-minütiger Denaturierung bei 95°C im Heizblock, in die Geltaschen geladen. Zum Vergleich des Molekulargewicht der Proteine wurde ein Größenmarker in eine der Geltaschen mit aufgetragen. In einer mit Elektrophorese Puffer befüllten Elektrophorese-Kammer Xcell SureLock™ (Invitrogen, Deutschland) wurden die Gele in das Netzgerät PowerPac™ 300 (Bio Rad, Deutschland) an 70 – 110 V Strom gelegt.

3.2.2.4 Immunoblot

Zunächst wurden die Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen um sie mit Antikörpern zu inkubieren. Anschließend wurden die Proteine per Chemilumineszenz sichtbar und quantifizierbar gemacht.

Dazu wurde das Gel in einer mit Transferpuffer befüllten Transferkammer (Bio Rad, Deutschland) auf eine Nitrocellulose-Membran gelegt und über Nacht bei 4°C an das Netzgerät PowerPac™ 300 (Bio Rad, Deutschland) bei 100 mA angeschlossen. Abschließend wurde der Strom für 1 Stunde auf 200 mA erhöht. Durch das senkrecht auf das SDS-Gel wirkende elektrische Feld, wurden die Proteine aus dem SDS-Gel auf die Nitrocellulose-Blotting-Membran transportiert. Um eine unspezifische Proteinbindung zu verhindern, wurde die Nitrocellulose-Membran für 1,5 Stunden in 5 g Milchpulver mit 100mL TBS-T (5% Milch) blockiert und anschließend 3 Mal für 10 Minuten mit TBS-T gewaschen. Der Primärantikörper wurde in 5% Milch verdünnt und die Membran in dieser über 1 bis 3 Stunden inkubiert. Danach wurde dreimal mit TBS-T für 10 Minuten

gewaschen um die Membran mit dem Sekundärantikörper, in 5% Milch verdünnt, für weitere 1 bis 3 Stunden zu inkubieren. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurde die Nitrocellulose-Membran erneut dreimal mit TBS-T für 10 Minuten gewaschen.

Die Pierce™ ECL Plus Lösung (Thermo Scientific, USA) wurde 1:40 verdünnt, auf der Membran, unter Ausschluss von UV-Strahlen, für 2 Minuten inkubiert und durch Chemilumineszenz die Protein-Antikörperbindung mit dem Fusion SL 4 400 WL (Vilber Lourmat, Deutschland) sichtbar gemacht.

Alle Inkubationsschritte und Waschschrte erfolgten in konischen Zentrifugenröhrchen, bei Raumtemperatur, auf einem Kipp-Rollenmischer (Carl Roth, Deutschland).

3.2.3 Molekulargenetische Methoden

Für die funktionelle Charakterisierung der neu detektierten Wt1-Mutationen, sowie der Isoformen A und D wurden die Wt1-Isoformen aus dem pCMV6-Vektor (OriGene Technologies, USA) in den Expressionsvektor pCDNA6/V5-Vektor und den retroviralen pMIG-Vektor kloniert. Ausgehend von der Wt1-Isoform D wurden die Mutationen mit dem Verfahren der ortsspezifischen Mutagenese, sowohl im pCDNA6-Vektor als auch im pMIG-Vektor, generiert.

3.2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion

Das Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) diente zur Vervielfältigung von DNA-Sequenzen. Hierfür wurde der PCR Premix CloneAmp™ HiFi (Clontech, Frankreich) im PCR Thermocycler PeqSTAR (Peqlab, USA) verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Der PCR-Mix wurde mit der DNA und den Primern inkubiert und sukzessive die Denaturierung der DNA, das Annealing der Primer und die Elongation des DNA-Abschnitts durchlaufen. Die Reaktion erfolgte 35 Mal 5 bis 40 Sekunden, bei Temperaturen von 53°C bis 98°C. Anschließend wurde die DNA bei 4°C gekühlt. Als Kontrolle diente ein PCR Ansatz ohne zu amplifizierende DNA-Sequenz. Die Größe der amplifizierten DNA Fragmente wurde mit einem Agarosegel überprüft.

3.2.3.2 Klonierung

Für Klonierungsarbeiten wurde das Klonierungskit In-Fusion^R HD Cloning Kit (Clontech, Frankreich) verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Zunächst wurde der Plasmidvektor verdaut, für den Verdau des pCDNA6-Vektors wurden die Restriktionsenzyme KpnAI und XbAI verwendet, für den pMIG-

Vektor wurde HpaI verwendet. Alle Restriktionsenzyme wurden bei New England Biolabs (Deutschland) erworben. Es wurden jeweils 500 ng des Vektors, mit jeweils 1,5 µL der Restriktionsenzyme mit destilliertem Wasser auf 20 µL gebracht. Die DNA wurde mit Klonierungsprimer per PCR aus dem pCMV-Vektor amplifiziert. Hierfür wurden 10ng des Wt1 pCMV-Vektor, mit 5 µL des PCR Premix und jeweils 1 µL der Klonierungsprimer, mit destilliertem Wasser auf 20 µL gebracht und die PCR wie in 3.2.1 beschrieben durchgeführt. Die komplementären Enden des Vektors und der DNA wurden ligiert. Dafür wurden 2 µL des Fusion HD Enzyme Premix, mit 50 ng des PCR-Produkts und 150 ng des Vektor mit destilliertem Wasser auf 10 µL gebracht und für 15 Minuten bei 50°C inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde in StellarTM kompetenten Bakterien (Takara Bio, Japan) mittels Hitzeschock transformiert. Dafür wurden 50 µL der Zellen auf Eis aufgetaut, mit 2,5 µL der DNA für 30 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend wurde der Ansatz für 45 Sekunden bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt. Nach einer erneuten Inkubation auf Eis für 2 Minuten, wurde die Suspension mit S.O.C-Medium auf ein Volumen von 500 µL gebracht und 1 Stunde bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Nachfolgend wurde die Suspension auf einer mit Ampicillin (50-100 µg/ml) bedeckten LB-Agar-Platte über Nacht kultiviert. Abschließend wurden die Zellen expandiert und die DNA-Plasmide durch Lyse der Bakterien isoliert.

Durch den Verdau der Plasmid-DNA durch Restriktionsenzyme und dem anschließenden Größenvergleich der Fragmente in einem Agarosegel konnte die Korrektheit der Klonierung geprüft werden. Nachfolgend konnte die Plasmid-DNA entweder direkt mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Deutschland) aufgereinigt werden oder nach dem Entfernen aus dem Agarosegel mit dem QIAquick Gel Extraktions Kit (Qiagen, Deutschland) isoliert werden. Alle Arbeitsschritte wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Konzentration der DNA-Plasmide wurde per Nanodrop1000 photometrisch bestimmt. Die neu entstanden Konstrukte wurden vollständig sequenziert und langfristig bei -20°C gelagert.

3.2.3.3 Mutagenese

Die Wt1-Mutationen S380W, S381x, R403x, D464G wurden per PCR-basierter ortsgerichteter Mutagenese der Wt1-Isoform D sowohl im pCDNA-Vektor als auch im pMIG-Vektor hergestellt. Hierfür wurde des QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, USA) verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden genau nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Mutationen wurden mit Hilfe von Mutageneseprimern in die DNA eingefügt und die DNA-Plasmide anschließend per PCR

repliziert. Durch den Verdau der Wildtyp-DNA-Plasmide wurde die mutierte Plasmid-DNA angereichert. Für die Transformation der DNA-Plasmide wurden die in dem Kit enthaltenen E.coli Bakterien verwendet. Alle neu entstanden Konstrukte wurden vor der weiteren Verwendung vollständig sequenziert.

3.2.3.4 Transformation von E.coli Bakterien

Die chemische Transformation kompetenter E.coli Bakterien diente der Amplifikation der Wt1-Konstrukte. Hierfür erfolgte die Inkubation von 25 μL Bakterien, 10 μL Plasmid-DNA und 10 μL 5X KCM-Lösung und 5 μL Wasser für 20 Minuten auf Eis und für weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur, gefolgt von 1 Stunde Inkubation bei 37°C und 200 rpm nach Zugabe von LB-Medium oder S.O.C-Medium, sowie der anschließenden Kultivierung der Bakterien auf einer mit Antibiotikum, je nach Vektor Ampicillin (50-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder Kanamycin (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$), bedeckten LB-Agar-Platte. Abschließend wurden die Kolonien expandiert und die DNA-Plasmide durch Lyse der Bakterien isoliert.

3.2.3.5 Isolation der Plasmid-DNA

Für die Isolation der Plasmid-DNA aus den transformierten Bakterien wurde das QIAGEN Plasmid Mini- oder Maxi-Kits (Qiagen, Deutschland) verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Je nach Protokoll wurden verschieden große Mengen an Plasmid-DNA generiert. Hierfür wurde entweder eine über Nacht angesetzte Bakterienkultur von 2 mL verwendet oder diese weiter kultiviert um eine größere Menge der Bakterien und der DNA-Plasmide zu erhalten. Dafür wurden die 2 mL der Bakterienkultur über Nacht in 100 mL LB-Medium mit einem selektivem Antibiotikum bei 37°C und 210 rpm expandiert. Die kleinere Probe wurde für 3 Minuten zentrifugiert, die größere Probe für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Bakterien nach Herstellerangaben lysiert, die DNA aufgereinigt, gebunden und mit 70% Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen der purifizierten DNA wurde diese in Isopropanol resuspendiert und in ein neues Flakon überführt. Die Konzentration der DNA-Plasmide wurde per Nanodrop1000 photometrisch bestimmt. Anschließend wurden die DNA-Plasmide direkt weiterverwendet oder bei -20°C gelagert.

3.2.3.6 Agarosegel Elektrophorese

Per Agarosegel Elektrophorese wurde die Größe der DNA-Proben und Plasmide überprüft. Gegeben falls wurden die Plasmide vorweg mit Restriktionsenzymen (New England Biolabs, Deutschland) verdaut. Die Proben wurden mit einem Ladefarbstoff gemischt und auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Zum Größenvergleich wurde in eine Tasche ein DNA-Marker geladen. Sollten die Proben anschließend weiterverwendet werden, wurden diese aus dem Agarosegel mit einem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten und mit dem Gelextraction Kit (Qiagen, Deutschland) nach Herstellerprotokoll zurückgewonnen.

3.2.3.7 Sequenzierung

Alle neu entstandenen Wt1-Konstrukte wurden bei Sequiserve (Deutschland) per Sanger Sequenzierung auf die Richtigkeit der DNA-Sequenz geprüft.

3.2.4 Datenanalyse

Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm Graphpad Prism (USA), Version 8.0.1, durchgeführt. Zur Errechnung des IC_{50} -Werts wurden Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt. Alle Experimente erfolgten, wenn nicht anders angegeben, in mindestens 3 unabhängigen Versuchen. Es wurde stets der Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Die Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem, ungepaarten student's t-Test und $P < 0.05$ wurde als statistisch signifikant erachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Die Bedeutung des Einbaus von HMA in das Genom leukämischer Zellen mit Bezug auf Zytostatikatoxizität und klinisches Ansprechen

4.1.1 Die Wirkung von HMA in unterschiedlichen Nährmedien

Wir haben festgestellt, dass OCI-AML3-Zellen in RPMI-Medium wesentlich besser auf die Behandlung mit HMA ansprechen als in MEM-Medium. Zur weiteren Untersuchung wurden die Zelllinien MV4-11- und OCI-AML3-Zellen sowohl in RPMI-Medium als auch in MEM-Medium kultiviert und mit HMA für 72 Stunden behandelt. Die Behandlung der Zellen mit HMA in MEM-Medium führte bei beiden Zelllinien zu einem geringeren Ansprechen auf HMA (Abb. 5).

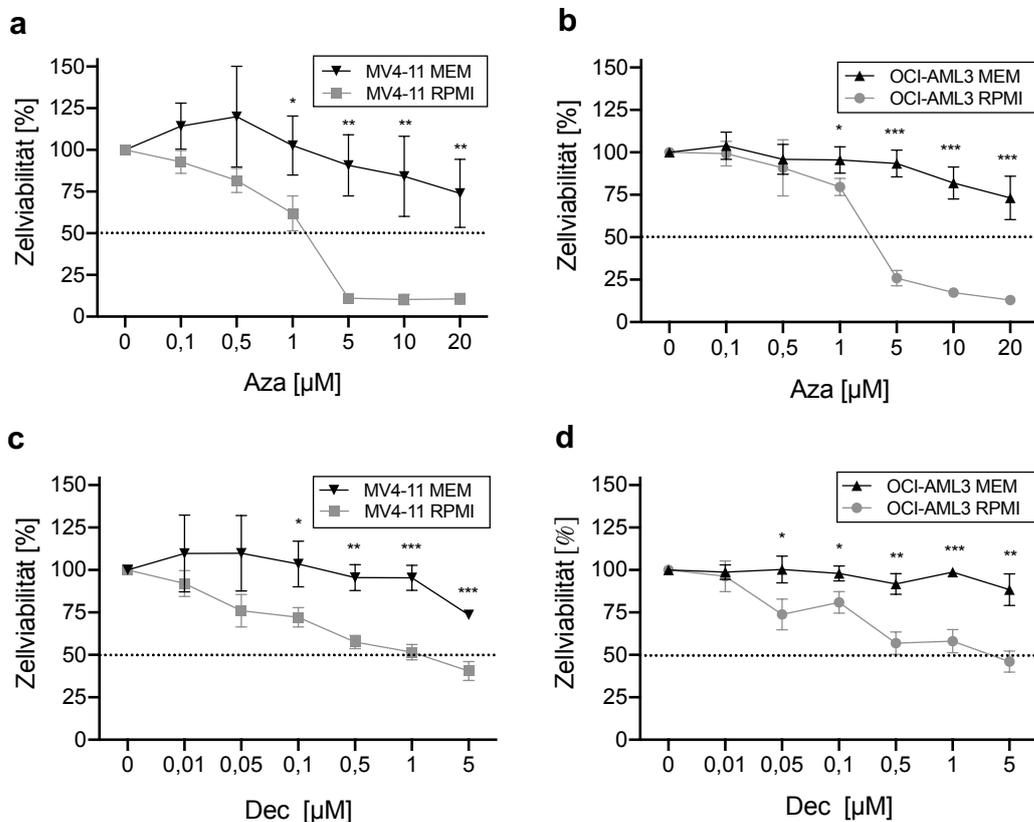


Abbildung 5: MEM-Medium führt zur Resistenz gegen HMA.

Vergleich der Empfindlichkeit von MV4-11-Zellen (a,c) und OCI-AML3-Zellen (b,d) gegenüber Aza (a,b) und Dec (c,d) in RPMI-Medium sowie in MEM-Medium. Die Zellen wurden jeweils für 72 Std. mit HMA in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Die Dosis-Wirkungskurve wurde aus mind. 3 unabhängigen Versuchen ermittelt und als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Auswertung mittels zweiseitigen, ungepaarten student's t-Test, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. Die y-Achse beschreibt die Zellviabilität prozentual zur unbehandelten Kontrolle.

MEM-Medium unterschied sich von RPMI-Medium unter anderem durch die Anwesenheit von Vitamin C, Liponsäure und Nukleotiden im Zellkulturmedium. Zum besseren Verständnis des Resistenzmechanismus sowie zur Sicherstellung einheitlicher Untersuchungsbedingungen wurden diese weiter untersucht. Dafür wurden MV4-11- und Kasumi-1-Zellen in RPMI-Medium unter Zusatz von Vitamin C oder Liponsäure kultiviert. OCI-AML5-Zellen wurden in RPMI-Medium, in MEM-Medium ohne Nukleotide und in MEM-Medium mit Nukleotiden kultiviert. Alle Zelllinien wurden für 72 Stunden mit HMA behandelt. Die Anwesenheit von Vitamin C oder Liponsäure im Zellkulturmedium hatte keinen Einfluss auf die Sensitivität der Zellen gegenüber HMA (Abb. 6a-d). Die Anwesenheit von Nukleotiden im Zellkulturmedium führte zur Resistenz von OCI-AML5-Zellen gegen HMA (Abb. 6e, f). In RPMI-Medium und in MEM-Medium ohne Nukleotide zeigten die Zellen ein gutes Ansprechen auf die Therapie mit HMA. Da sowohl OCI-AML5- als auch OCI-AML3-Zellen in RPMI-Medium eine gute Viabilität und ein gutes Zellwachstum zeigten, wurden, zur Schaffung einheitlicher Untersuchungsbedingungen, für die folgenden Experimente alle Zellen in RPMI-Medium kultiviert.

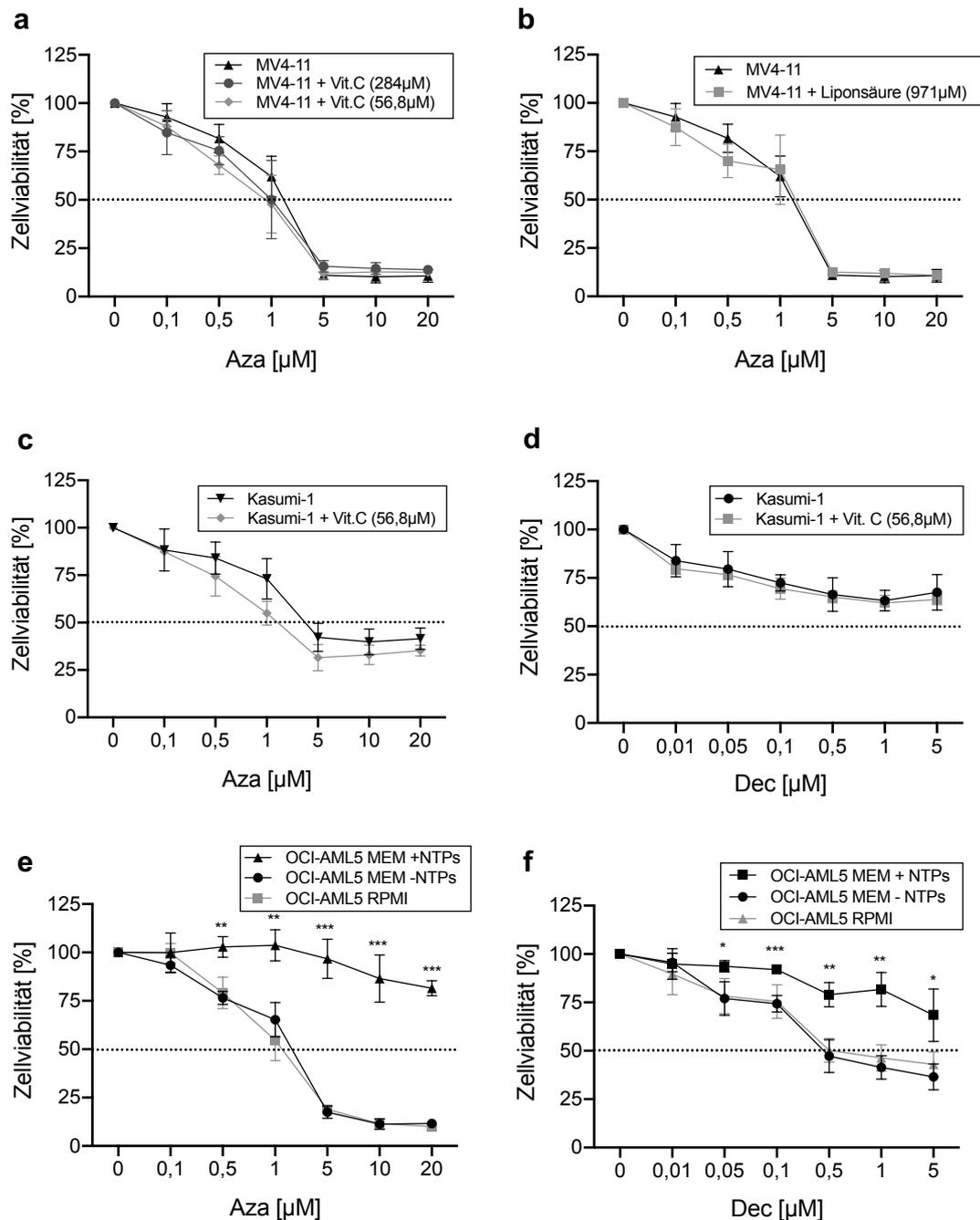


Abbildung 6: Zusatz von Nukleotiden führt zur Resistenz gegen HMA.

Vergleich der Empfindlichkeit von MV4-11-Zellen gegenüber Aza unter der Zugabe von Vitamin C (a) und Liponsäure (b), sowie der Sensitivität von Kasumi-1-Zellen gegenüber Aza (c) und Dec (d) unter der Zugabe von Vitamin C und der Sensitivität von OCI-AML5-Zellen gegenüber Aza (e) und Dec (f) unter der Zugabe von Nukleotiden im Zellkulturmedium. Die Zellen wurden jeweils für 72 Std. mit HMA, in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Die Dosis-Wirkungskurve wurde aus mind. 3 unabhängigen Versuchen ermittelt und als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Auswertung mittels zweiseitigen, ungepaarten student's t-Test, *P<0.05, **P<0.01,***<0.001. Die y-Achse beschreibt die Zellviabilität prozentual zur unbehandelten Kontrolle.

4.1.2 Sensitivität leukämischer Zelllinien gegenüber hypomethylierenden Agenzien

Zunächst wurde die Empfindlichkeit der leukämischen Zelllinien gegenüber Aza und Dec ermittelt. Hierfür wurden 16 leukämische Zelllinien mit Aza und Dec für 72 Stunden behandelt. Die Konzentrationen der Medikamente wurden an Hand der Blutplasmaspiegel von Patienten unter Behandlung mit HMA gewählt.^{71,72,167} Alle Zellen wurden in RPMI-Medium ohne Zusätze kultiviert.

Die leukämischen Zelllinien zeigten unterschiedliche Empfindlichkeit für HMA (Abb. 7). Die IC₅₀-Werte für Aza lagen im Bereich von 0,5 µM (SKM-1) bis 5,9 µM (Kasumi-1). Die Zelllinien OCI-AML3 (2,7 µM), MM1 (3,4 µM), Kasumi-1 (5,9 µM) zeigten eine deutlich geringere Sensitivität für Aza als die übrigen Zellen. Die Zelllinie ME-1 war resistent gegen die Behandlung mit Aza, für sie konnte kein IC₅₀-Wert ermittelt werden. Damit lag der IC₅₀-Wert mindestens über dem Konzentrationsmaximum von 20 µM und wurde deshalb bei der graphischen Darstellung symbolisch über dem Konzentrationsmaximum dargestellt. Die IC₅₀-Werte für Dec lagen im Bereich von 0,06 µM (NB-4) bis 4,4 µM (SKM-1). Für die Zellen MM6 (4,1 µM), U-937 (4,1 µM), SKM-1 (4,4 µM) ergab sich trotz hoher Sensitivität für Aza eine geringe Sensitivität für Dec. Die Zelllinien ME-1, Kasumi-1 und MM1 waren resistent gegen die Behandlung mit Dec. Für sie konnte kein IC₅₀-Wert ermittelt werden. Damit lag der IC₅₀-Wert mindestens über dem Konzentrationsmaximum von 5 µM und wurde deshalb bei der graphischen Darstellung symbolisch über dem Konzentrationsmaximum dargestellt. Die von mir gewonnenen Ergebnisse der IC₅₀-Werte für Aza und Dec wurden zudem für die Kooperation mit Sarah Schiffers aus der Arbeitsgruppe von Prof. Carell (Chemie Department der LMU) genutzt und wurden in der Promotionsarbeit von Sarah Schiffers ebenfalls verwendet.¹¹⁶

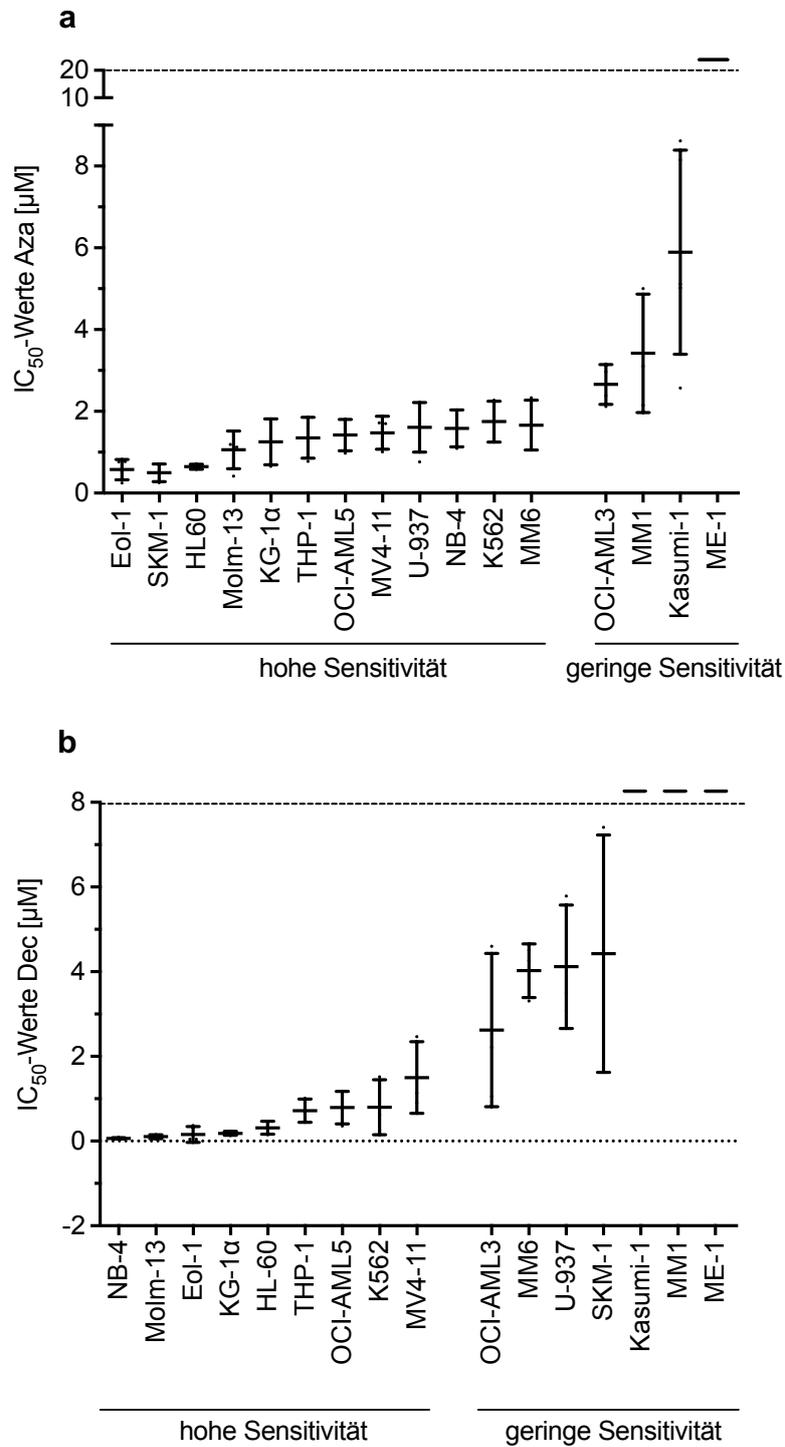


Abbildung 7: Leukämische Zelllinien zeigen unterschiedliche Sensitivität für HMA.

Vergleich der Empfindlichkeit leukämischer Zelllinien gegenüber Aza (**a**) und Dec (**b**) in RPMI-Medium. Die Zellen wurden jeweils für 72 Std. mit HMA behandelt. Der IC₅₀-Wert wurde aus mind. 3 unabhängigen Versuchen ermittelt und als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Die y-Achse beschreibt den IC₅₀-Wert (µM).

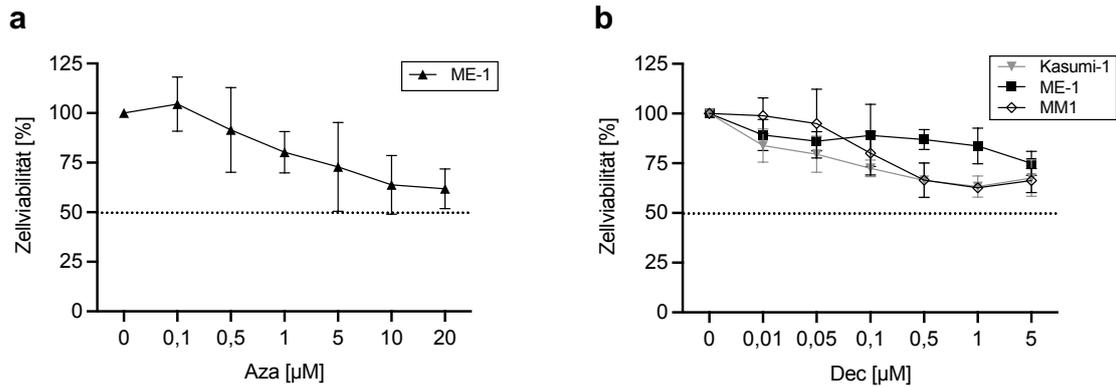


Abbildung 8: Resistenz leukämischer Zelllinien gegen HMA.

Darstellung der Empfindlichkeit leukämischer Zelllinien ME-1 gegenüber Aza (a) und ME-1, MM1 und Kasumi-1 gegenüber Dec (b). Die Zellen wurden jeweils für 72 Std. mit HMA, in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Die Dosis-Wirkungskurve wurde aus mind. 3 unabhängigen Versuchen ermittelt und als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Die y-Achse beschreibt die Zellviabilität prozentual zur unbehandelten Kontrolle.

Es ergab sich keine Korrelation der IC_{50} -Werte für Aza und Dec ($p=0,27$; $R^2=0,035$) (Abb. 9). Die Zelllinien HL60 ([Aza:0,7 μM][Dec:0,3 μM]) und Molm-13 ([Aza:1,06 μM][Dec:0,1 μM]) waren in unseren Versuchen sowohl für Aza als auch für Dec sensitiv. Für die Zelllinien MM1([Aza:3,4 μM][Dec:/]) und Kasumi-1([Aza:5,9 μM][Dec:/]) ergab sich für beide Agenzien eine geringe Sensitivität. Die Zelllinien wurden zur weiteren Untersuchung möglicher Resistenzmechanismen gegen HMA in 4.1.4 verwendet.

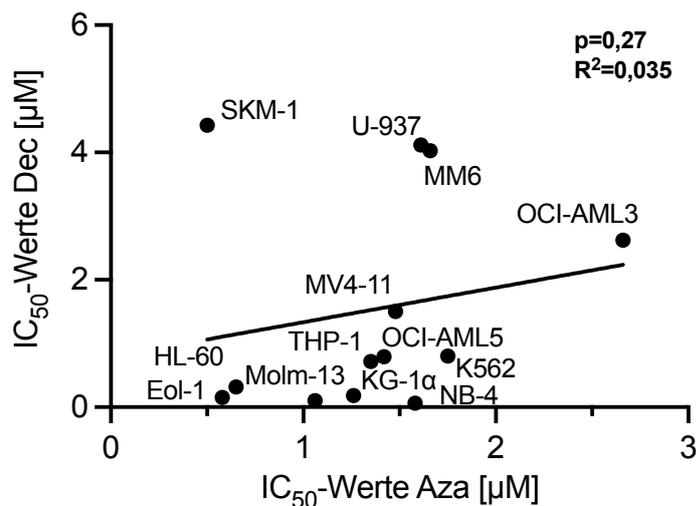


Abbildung 9: Keine Korrelation der IC_{50} -Werte für Aza und Dec.

Vergleich der IC_{50} -Werte der leukämischer Zelllinien für Aza und Dec. Auswertung mittels einseitigem Korrelationskoeffizient nach Pearson * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** <0.001 . Die Achsen beschreiben die IC_{50} -Werte (μM).

4.1.3 Die Wirkung von HMA auf das Genom leukämischer Zellen

Zur Analyse der Wirkung von HMA auf die DNA bzw. die RNA leukämischer Zellen, wurden diese für 24 Stunden mit einer Einzeldosis Aza (3 μ M), Dec (0,5 μ M) behandelt. Die Messung der Inkorporation sowie der DNA- und RNA-Methylierung, in 4.1.3 und in 4.1.4, erfolgte in Kooperation mit Sarah Schiffers aus der Arbeitsgruppe von Prof. Carell (Chemie Department der LMU). Die aus der Kooperation gewonnenen Ergebnisse wurden ebenfalls in der Promotionsarbeit von Sarah Schiffers verwendet.¹¹⁶ Die Konzentrationen der Substanzen, in 4.1.3 und in 4.1.4, wurden nach den maximal erreichbaren Blutplasmaspiegeln der Patienten unter Therapie mit hypomethylierenden Agenzien gewählt.^{71,72,167} Es wurden zunächst mehrere Zellen in Einzelproben verwendet und diese in technischen Triplets gemessen (n=3). Hierbei wurde jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung angegeben.

Aza wurde bei allen behandelten Zellen in die DNA (Abb. 10a) und in RNA (Abb. 11a) eingebaut. Die Zelllinien zeigten quantitative Unterschiede in der Inkorporation von Aza. Einige Zellen, wie MM6, Molm-13 und THP-1 bauten Aza besonders stark ein, sowohl in die DNA als auch in die RNA. Im Gegensatz dazu bauten U-937- und Kasumi-1-Zellen nur ca. 50% der Menge in ihre DNA und RNA ein. Der Einbau von Aza in die DNA war bei allen Zellen deutlich stärker als in die RNA. Bei allen mit Aza behandelten Zellen nahm die DNA-Methylierung signifikant ab (Abb. 10c). Außer bei Kasumi-1-Zellen bewirkte die Behandlung mit Aza bei allen Zellen auch eine signifikante Abnahme der RNA-Methylierung (Abb. 11c). Insgesamt nahm die RNA-Methylierung unter Aza, bei allen Zellen außer Kasumi-1, stärker ab als die DNA-Methylierung. Die Menge der Abnahme von 5-mC korrelierte weder in der RNA noch in der DNA mit der Menge des Einbaus von Aza. Die behandelten leukämischen Zelllinien inkorporierten Dec ausschließlich in die DNA und nicht in die RNA (Abb. 10b; 11b). Die Zelllinien zeigten quantitative Unterschiede in der Inkorporation von Dec in die DNA. Bei Dec waren jedoch weniger starke quantitative Unterschiede unter den Zelllinien festzustellen als bei Aza. Insgesamt bauten alle Zelllinien mehr Dec in die DNA ein als Aza, besonders deutlich war der Effekt bei den Zelllinien MV4-11, U-937 und Kasumi-1. Die DNA-Methylierung nahm bei allen mit Dec behandelten Zellen signifikant ab (Abb. 10d). Insgesamt nahm die DNA-Methylierung bei der Behandlung mit Dec stärker ab, als bei der Behandlung mit Aza. Besonders deutlich war der Effekt bei THP-1, K562 und U-937-Zellen. Die Menge der Abnahme von 5-mC korrelierte nicht mit der Menge des Einbaus von Dec in die DNA. Die Behandlung mit Dec zeigte mit Ausnahme der HL60-Zellen keinen Effekt auf die RNA-Methylierung (Abb. 11d).

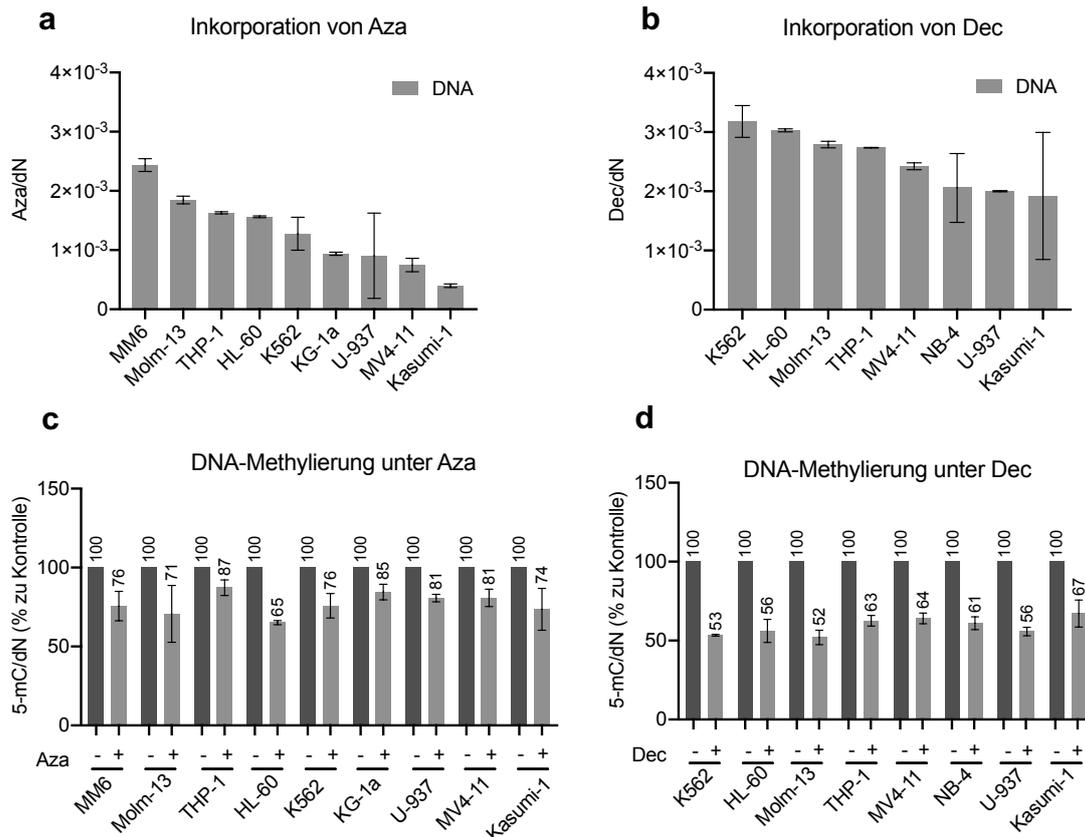


Abbildung 10: Die Wirkung von HMA auf die DNA leukämischer Zellen.

Leukämischen Zelllinien wurden in biologischen Einzelproben jeweils für 24 Std. mit Aza 3 μ M (a,c) oder Dec 0,5 μ M (b,d) behandelt und die Inkorporation der Medikament in die DNA (a,b) sowie die DNA-Methylierung (c,d) gemessen. Die Darstellung erfolgt als Mittelwert aller Messungen mit Standardabweichung (n=3). Die y-Achse beschreibt den Einbau von Aza bzw. Dec Molekül pro Nukleotid der DNA (a,b) sowie die DNA-Methylierung in 5-mC pro Nukleotid prozentual zur Kontrolle (c,d).

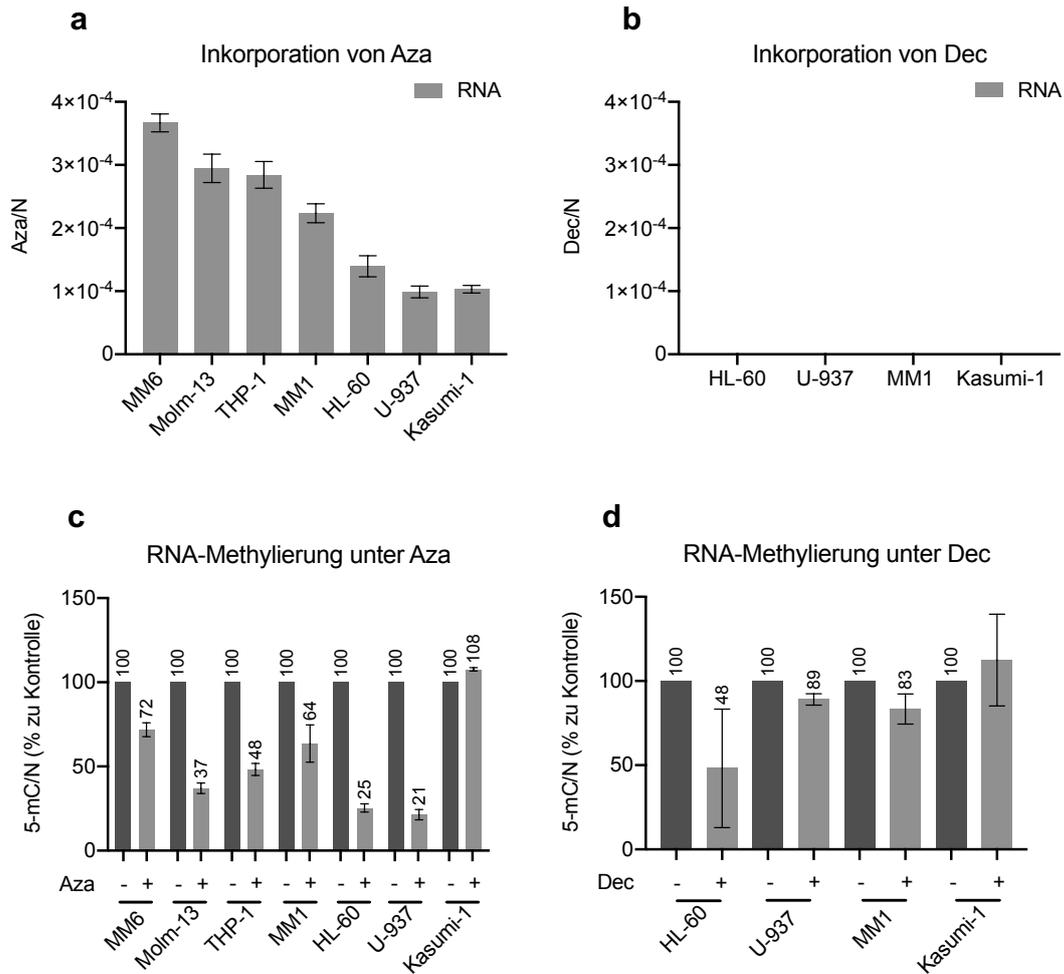


Abbildung 11: Die Wirkung von HMA auf die RNA leukämischer Zellen.

Leukämischen Zelllinien wurden in biologischen Einzelproben für 24 Std. mit Aza 3 μ M (**a,c**) oder Dec 0,5 μ M (**b,d**) behandelt und die Inkorporation der Medikament in die RNA (**a,b**) sowie die RNA-Methylierung (**c,d**) gemessen. Es konnte keine Inkorporation von Dec in die RNA nachgewiesen werden (**b**). Die Darstellung erfolgt als Mittelwert aller Messungen mit Standardabweichung (n=3). Die y-Achse beschreibt den Einbau von Aza bzw. Dec Molekül pro Nukleotid der RNA (**a,b**) sowie die RNA-Methylierung in 5-mC pro Nukleotid prozentual zur Kontrolle (**c,d**).

4.1.4 Die Wirkung von HMA auf das Genom leukämischer Zellen mit unterschiedlicher Sensitivität für HMA

Zur Analyse der Wirkung von HMA auf die DNA bzw. die RNA leukämischer Zellen mit unterschiedlicher Sensitivität für HMA wurden jeweils zwei Zelllinien mit hoher und geringer Sensitivität für Aza bzw. Dec ausgewählt. HL-60 und Molm-13 waren sowohl für Aza als auch für Dec sensitiv und wurden deshalb für die sensitive Gruppe verwendet. MM1 und Kasumi-1 sprachen sowohl auf die Behandlung mit Aza als auch mit Dec gering an und wurden deshalb für die Gruppe der geringen Sensitivität verwendet. Die Zellen wurden für 24 Stunden und für 72 Stunden mit einer Einzeldosis Aza (3 μ M), Dec (0,5 μ M) behandelt. Dabei wurden Triplets der Zellen generiert und diese wiederum in technischen Triplets gemessen (n=9), wobei jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung angegeben wurde.

Nach 24 Stunden bauten alle behandelten Zellen Aza in die DNA ein (Abb. 12a). Nach 72 Stunden zeigten alle Zellen bereits eine signifikant Abnahme des inkorporierten Azas. Bei Molm-13 nahm die DNA-Methylierung nach 24 Stunden, aufgrund der hohen Standardabweichung, nicht auf signifikante Werte ab (Abb. 12c). Nach 72 Stunden nahm die DNA-Methylierung der mit Aza behandelten Zellen nur bei Kasumi-1-Zellen weiter ab. Bei der Behandlung mit Dec bauten alle behandelten Zellen nach 24 Stunden Dec in die DNA ein (Abb.12b). Hier zeigten sich stärkere Unterschiede bei der Inkorporation. HL60- und Kasumi-1-Zellen bauten signifikant mehr Dec in die DNA ein als Aza. Nach 72 Stunden nahm die Menge des inkorporierten Dec bei HL60-Zellen signifikant ab. Bei Kasumi-1 und MM1 war eine nur schwache signifikante Abnahme zu erkennen. Molm-13-Zellen zeigten eine signifikante Zunahme des inkorporierten Dec. Bei allen mit Dec behandelten Zellen nahm die DNA-Methylierung nach 24 Stunden signifikant ab (Abb. 12d). Nur bei Kasumi-1 Zellen war nach 72 Stunden bei der Behandlung mit Dec eine weitere Abnahme der DNA-Methylierung zu erkennen. Bei HL-60- und Molm-13-Zellen war eine leichte Zunahme der DNA-Methylierung zu erkennen. Bei Zellen mit hoher Sensitivität für Dec nahm die DNA-Methylierung stärker ab als bei Zellen mit geringer Sensitivität für Dec. Insgesamt nahm die DNA-Methylierung bei der Behandlung mit Dec stärker ab als bei der Behandlung mit Aza (Abb. 12c,d).

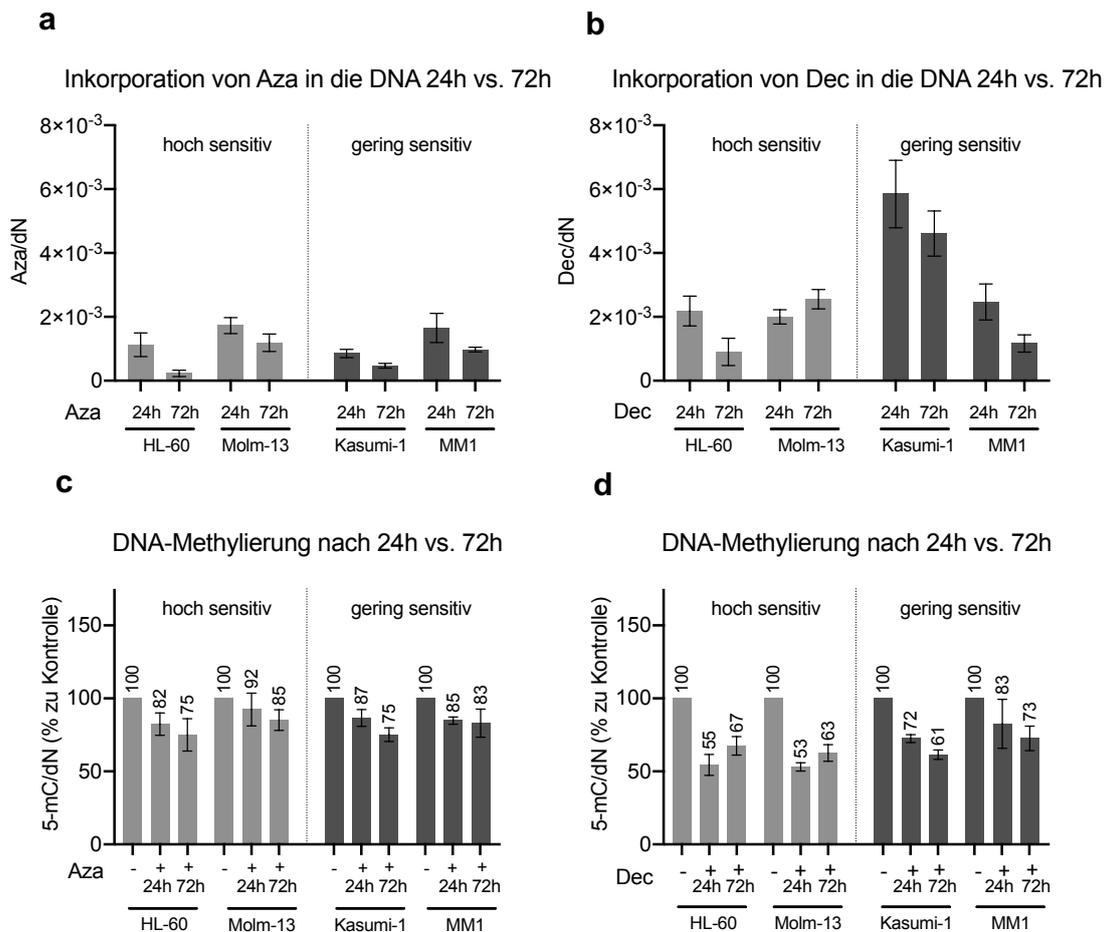


Abbildung 12: Die Wirkung von HMA auf die DNA leukämischer Zellen unterschiedlicher Sensitivität für HMA.

Leukämische Zelllinien wurden in biologischen Triplets für 24 Std. und 72 Std. mit Aza 3 μ M (a,c) oder Dec 0,5 μ M (b,d) behandelt und die Inkorporation der Medikation in die DNA (a,b) sowie die DNA-Methylierung (d,c) in technischen Triplets gemessen. Die Darstellung erfolgt als Mittelwert aller Experimente mit Standardabweichung (n=9). Die y-Achse beschreibt den Einbau von Aza bzw. Dec Molekül pro Nukleotid der DNA (a,b) sowie die DNA-Methylierung in 5-mC pro Nukleotid prozentual zur Kontrolle (c,d).

Nach 24 Stunden bauten alle behandelten Zellen Aza in die RNA ein (Abb. 13a). Insgesamt wurde weniger Aza in die RNA als in die DNA eingebaut. Nach 72 Stunden war signifikant weniger Aza in der RNA von Molm-13- und Kasumi-1 messbar. Bei HL60 und MM1 war keine signifikante Abnahme zu beobachten, wobei hier hohe Standardabweichungen auftraten. Alle Zellen zeigten nach 24 Stunden eine signifikante Abnahme der RNA-Methylierung (Abb. 13b). Nach 72 Stunden war die RNA-Methylierung von HL60 und Molm-13 nicht signifikant verändert. Bei Kasumi-1 und MM1 nahmen die die RNA-Methylierung nach 72 Stunden weiter ab. Insgesamt nahm die RNA-Methylierung etwas stärker ab als die DNA-Methylierung unter Aza-Therapie.

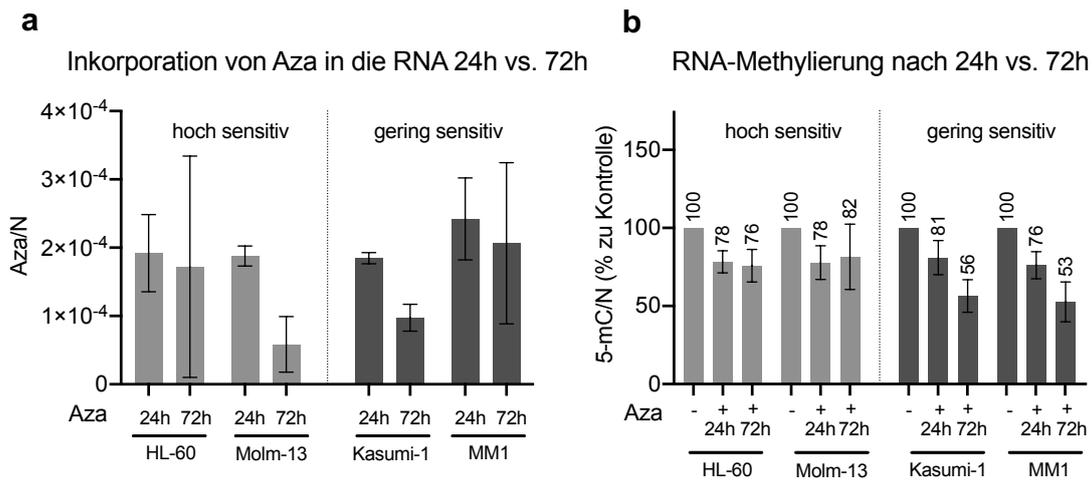


Abbildung 13: Die Wirkung von Aza auf die RNA leukämischer Zellen unterschiedlicher Sensitivität für HMA.

Leukämischen Zelllinien wurden in biologische Triplets für 24 Std. und 72 Std. mit Aza 3 μ M behandelt und die Inkorporation der Medikation in die RNA (a) sowie die RNA-Methylierung (b) in technischen Triplets gemessen. Die Darstellung erfolgt als Mittelwert aller Experimente mit Standardabweichung (n=9). Die y-Achse beschreibt den Einbau von Aza Molekül pro Nukleotid der RNA (a) sowie die RNA-Methylierung in 5-mC pro Nukleotid prozentual zur Kontrolle (b).

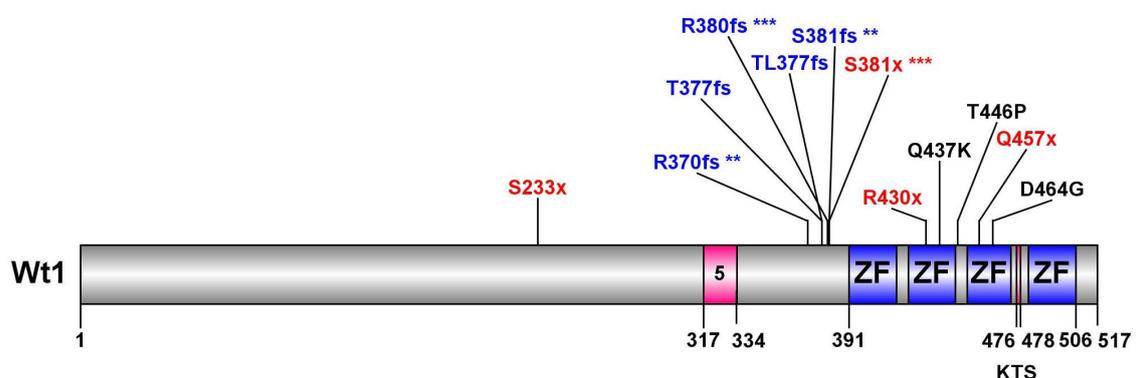
Insgesamt ließ sich feststellen, dass sowohl bei der Inkorporation von Aza in die DNA als auch in die RNA zellspezifische Unterschiede bestanden. Wir konnten jedoch weder bei der Inkorporation von Aza in die DNA noch in die RNA einen Zusammenhang mit der Zytostatikasensitivität gegenüber Aza erkennen. Darüber hinaus konnte bei allen behandelten Zellen eine Abnahme der DNA- bzw. RNA-Methylierung festgestellt werden, diese korrelierte jedoch weder mit der Zytostatikasensitivität gegenüber Aza noch mit der Inkorporation von Aza in die DNA bzw. RNA. Bei der Behandlung mit Dec ließ sich eine stärkere Abnahme der DNA-Methylierung bei den sensitiven Zelllinien feststellen, diese hing jedoch nicht mit einer stärkeren Inkorporation von Dec in die DNA sensitiver Zellen zusammen. Ferner war auffällig, dass Dec trotz niedriger Dosierung stärker in die DNA eingebaut wurde als Aza. Die Inkorporation von Aza bzw. Dec in die DNA bzw. RNA war bei den meisten Zellen nach 72 Std. bereits rückläufig, wobei die Abnahme der DNA- bzw. RNA-Methylierung bei den meisten Zellen weiter anhielt.

4.2 Funktionelle Charakterisierung des Wilms' Tumor Gen 1 (Wt1) in der akuten myeloischen Leukämie

4.2.1 Wt1-Mutationen in AML-Patientendaten

Zwei Arbeitsgruppen an unserer Klinik beobachteten eine Zunahme der Häufigkeit von Wt1-Mutationen im Rezidiv der AML nach IC (Greif et al.) bzw. nach SZT (Vosberg et al.).^{33,34} Um nähere Erkenntnisse über die Entwicklung der Wt1-Mutationen im Progress der AML zu gewinnen, analysierten wir die bereits publizierten Daten der beiden Arbeitsgruppen. In der CN-AML-Patientenkohorte (n=50) von Greif et al. wurden bei 12% (n=6) der Patienten im Rezidiv nach intensiver Chemotherapie Wt1-Mutationen detektiert, bei 10% (n=5) der Patienten waren im Rezidiv neue Wt1-Mutationen aufgetreten.³³ In der zweiten an unserer Klinik durchgeführten Studie von Vosberg et al. konnten an einem Patientenkollektiv von 12 AML-Patienten bei 50% (n=6) der Patienten im Rezidiv nach SZT Wt1-Mutationen festgestellt werden, bei 41,7% (n=5) waren dabei neue Wt1-Mutationen aufgetreten.³⁴ Insgesamt lagen 64,7% (n=11/17) der Wt1-Mutationen in Exon 7, 17,6% (n=3/17) in Exon 8 zwei davon im Bereich des zweiten Zinkfingers, 11,8% (n=2/17) in Exon 9 im Bereich des dritten Zinkfingers, sowie 5,9% (n=1/17) in Exon 2. Dabei wurden vor allem *Nonsense*- oder *Frameshift-Mutationen* detektiert. Bei insgesamt drei Patienten konnte im Rezidiv ein neues Auftreten der trunkierenden Mutationen S381x beobachtet werden. Des Weiteren wurden *Missense-Mutationen* beschrieben, vor allem im Bereich des zweiten und dritten Zinkfingers.^{33,34} Als Referenz wurde in dieser Arbeit die Wt1-Isoform D (NM_024426.3) verwendet.

a



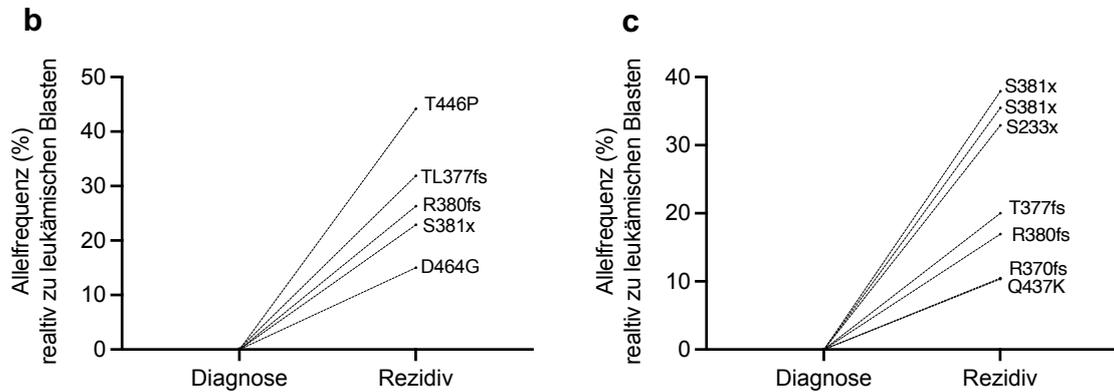


Abbildung 14: Wt1-Mutationen im AML Rezidiv.

Graphische Darstellung der per Genom Sequenzierung detektierten Wt1-Mutationen im AML Rezidiv von Greif et al. und Vosberg et al. (a).^{33,34} *Frameshift-Mutationen* (blau), *Missense-Mutationen* (schwarz), *Non-sense-Mutationen* (rot). Kennzeichnung (*) bedeutet die Mutation wurden zwei (**) bzw. drei (***) mal detektiert. Isoform D (NM_024426.3) mit Wt1-Zinkfingerdomäne (ZF) nach NCBI. Abbildungen wurden mit dem Programm IBS erstellt.¹³⁴ Entwicklung der rezidiv-spezifischen Wt1-Mutationen von Greif et al.³³ (b) und Vosberg et al.³⁴ (c). Darstellung an Hand der Allelfrequenz (%) relativ zu den leukämischen Blasten. Referenz Isoform D (NM_024426.3).

Tabelle 14: Wt1 Transkriptvarianten.

Darstellung der verwendeten Wt1 Transkriptvarianten der verschiedenen Arbeitsgruppen.

	Referenzsequenz	Isoform	Protein	Kts	Exon 5	Zinkfinger
Diese Arbeit	NM_000378.4	A	497 As	-	-	4
Diese Arbeit	NM_024426.3	D	517 As	+	+	4
Greif Et Al. ³³	NM_001198551	E	302 As	-	+	4
Vosberg Et Al. ³⁴	NM_000378.4	A	497 As	-	-	4

4.2.2 Wt1-Mutationen und Wt1-Expression in leukämischen Zelllinien

Zur Erhebung des Mutationsstatus leukämischer Zelllinien wurden diese auf Wt1-Mutationen sowie weiterer Mutationen in Genen der epigenetischen Regulation untersucht. Zusätzlich wurden die Zellen auf Mutationen in TP53-Gen analysiert, da für diese in Patientendaten ein positiv-prognostischer Wert auf das Ansprechen auf Dec-Therapie beschrieben wurde.^{96,97} Hierbei wurden bereits erhobene Sequenzierungsdaten der Zelllinien unserer Arbeitsgruppe verwendet.

Bei 18,75% (n= 3/16) der leukämischen Zelllinien konnten wir Mutationen im Wt1 Gen feststellen. Bei 62,5% (n= 10/16) Zelllinien konnten Mutationen in TP53 festgestellt werden. Bei dem Großteil handelte es sich um *Missense-Mutationen* sowie um eine *Frameshift-Mutationen* und eine *Deletion*.

Tabelle 15: Mutationen in leukämischen Zelllinien (Auswahl).

Mutationen in leukämischen Zelllinien, erhoben in Genomsequenzierungsdaten der Arbeitsgruppe Spiekermann. Referenz ist die Isoform D (NM_024426.3).

	Wt1	DNMT3A	IDH1/2	Tet2	TP53	FLT3
Eo1-1	-	-	-	-	-	-
NB-4	-	-	-	-	c.347g>a;R116q	-
Molm-13	-	E182K	-	-	-	ITD
KG-1α	-	-	-	-	c.555+1g>a	V557I
HL-60	-	-	-	-	-	-
OCI-AML5	-	-	-	S825x; Y1148C	-	-
THP-1	-	-	-	-	R42fs	-
MV4-11	-	-	-	-	R116W	ITD
K562	-	-	-	-	-	-
OCI-AML3	-	R693C	-	-	-	-
MM1/MM6	-	-	-	-	R141H	V592A
U-937	R369x	-	-	-	c.442+1g>a	-
SKM-1	P95fs	-	-	L1418fs	R116Q	-
Kasumi-1	-	-	-	-	R116Q	-
ME-1	R495Q	-	-	-	170_175del	T820N

Die in SKM-1-Zellen gefundene *Frameshift-Mutation* (P95fs) liegt in Exon 1 und führt zu einem verfrühtem Stopcodon und führt zu einem um 362 Aminosäuren verkürztem Wt1 Protein. Bei U-937 liegt die Wt1-Mutation (R369x) in Exon 7 der Region des ersten Zinkfingers und führt zu einem Stopcodon, was zu einem um 148 Aminosäuren verkürzten Wt1-Protein führt. Die für ME-1 beschriebene Wt1-Punktmutation (R495q) liegt in Exon 10 in der Region des vierten Zinkfingers. Als Referenz wurde die Wt1-Isoform D (NM_024426.3) verwendet.

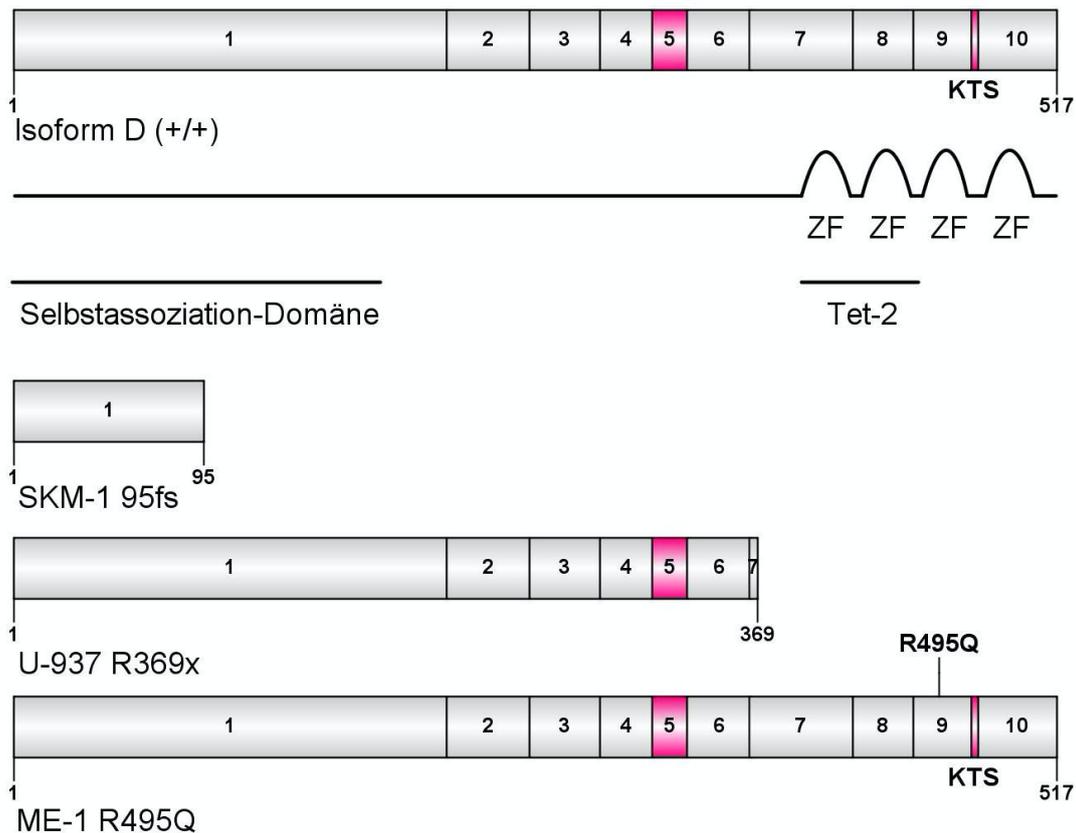


Abbildung 15: Wt1-Mutationen in leukämischen Zelllinien.

Graphische Darstellung der in Sequenzierungsdaten der Arbeitsgruppe Spiekermann festgestellten Wt1-Mutationen in leukämischen Zelllinien. Isoform D (NM_024426.3) mit Wt1-Zinkfingerdomäne (ZF) nach NCBI, Wt1-Tet-2-Proteininteraktionsdomäne (Tet-2) nach Wang et al. und Selbstassoziations-Domäne nach Reddy et al.^{131,133} Abbildungen wurden mit dem Programm IBS erstellt.¹³⁴

Um die endogene Wt1-Proteinexpression der leukämischen Zelllinien zu untersuchen wurde diese an drei unabhängigen Ganzzelllysaten der Zellen per Immunoblot detektiert. Die Wt1-Proteinexpression wurde stets relativ zur GAPDH-Expression angegeben. Als Vergleichswert der Wt1-Proteinexpression der Zelllinien wurde die Wt1-Proteinexpression der Zelllinie K562 gewählt. Dabei wurden Zelllinien mit einer Wt1-

Proteinexpression von mindestens 0,5 des Vergleichswert als starke Wt1-Proteinexpression kategorisiert und Zelllinien mit einer Wt1-Proteinexpression von unter 0,5 des Vergleichswert als schwache Wt1-Proteinexpression kategorisiert. Bei 81,25% (n=13/16) der Zelllinien wurde eine endogene Wt1-Proteinexpression detektiert (Abb. 16a). Insgesamt ließen sich die Zellen in drei Gruppen einteilen. 37,5% der Zelllinien (n=6/16) zeigten eine starke Wt1-Proteinexpression, 43,75% der Zelllinien (n=7/16) eine vergleichsweise schwache Wt1-Proteinexpression und bei 18,75% der Zelllinien (n=3/16) war keine Wt1-Proteinexpression festzustellen. Bei der Zelllinie mit der Wt1-Punktmutation, ME-1, war eine starke endogene Wt1-Expression festzustellen. Die Zelllinien mit der frühen trunkierenden Mutation SKM-1 zeigten eine schwache Proteinexpression. U-937-Zellen, mit der trunkierende Mutation in Exon 7 wiesen keine endogene Wt1-Expression auf.

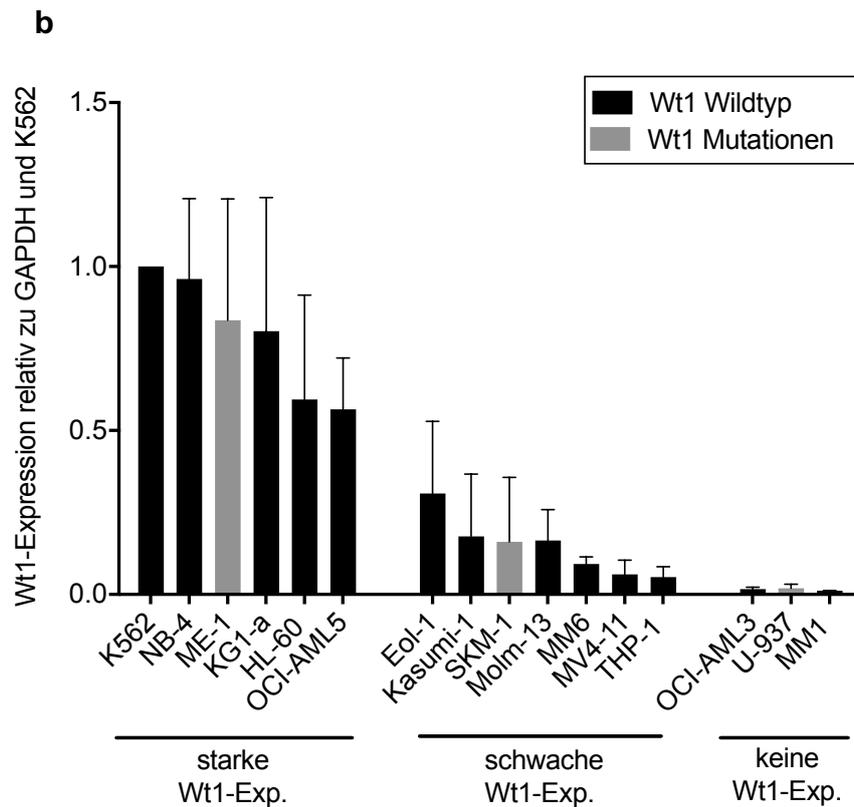
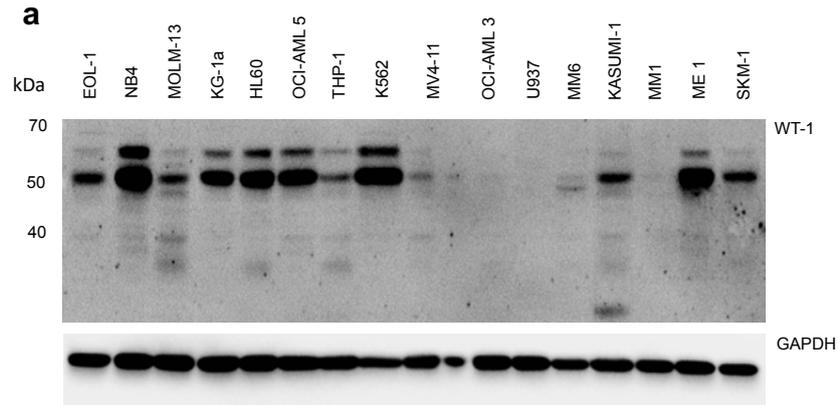


Abbildung 16: Endogene Wt1-Expression in leukämischen Zelllinien.

Endogene Wt1-Proteinexpression in repräsentativem Immunoblot (a). Mittelwerte mit Standardabweichung der endogenen Wt1-Expression aus drei unabhängigen Immunoblots relativ zu endogenen GAPDH-Expression (b). Die Wt1-Proteinexpression der Zellen wurde relativ zur Wt1-Proteinexpression der K562-Zellen des jeweiligen Immunoblots dargestellt. Die Zellen wurden anhand des Mittelwerts der endogenen Wt1-Expression in starke (über 0,5 der K562 Wt1-Proteinexpression) und schwache (unter 0,5 der K562 Wt1-Proteinexpression) Wt1-Proteinexpression eingeteilt. Zellen bei denen keine Wt1-Expression festgestellt werden konnten bildeten eine eigene Gruppe. Die y-Achse beschreibt die Wt1-Proteinexpression relativ zu endogenem GAPDH- und K562-Wt1-Proteinexpression.

Auffallend war, dass Wt1-mutierte Zelllinien in unseren vorangegangenen Experimenten (Abb. 7) geringer auf die Behandlung mit Dec ansprachen. Um erste Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang der Wt1-Proteinexpression und der Sensitivität gegenüber HMA zu erhalten, wurde die endogene Wt1-Proteinexpression der leukämischen Zelllinien mit dem jeweiligen IC_{50} -Wert der Zelllinien für Aza bzw. Dec verglichen.

Für Aza ließ sich kein Zusammenhang der endogenen Wt1-Proteinexpression mit der Sensitivität der Zellen für Aza feststellen (Abb. 17a). Im Gegensatz dazu ließ sich bei Dec ein Zusammenhang der Wt1-Expression mit der Sensitivität der Zellen für Dec feststellen (Abb. 17b). Dabei waren 100% der leukämischen Zelllinien (n= 5/5) mit starker endogener Wt1-Proteinexpression sensitiv gegenüber Dec. 100% (n=2/2) der Zelllinien ohne endogenen Wt1-Proteinexpression sowie 100% (n=3/3) der Wt1-mutierten Zelllinien sprachen gering auf die Behandlung mit Dec an. Für die Zelllinien mit einer schwachen endogenen Wt1-Proteinexpression war es nicht möglich eine eindeutige Aussage über das Ansprechen auf Dec zu machen. Da für die Berechnung einer Korrelation der IC_{50} -Werte mit der endogenen Wt1-Proteinexpression ein IC_{50} -Wert nötig war, dieser aber für einige der Zelllinien aufgrund des geringen Ansprechens auf Aza bzw. Dec nicht bestimmt werden konnte, war es nicht möglich eine Korrelation zu errechnen.

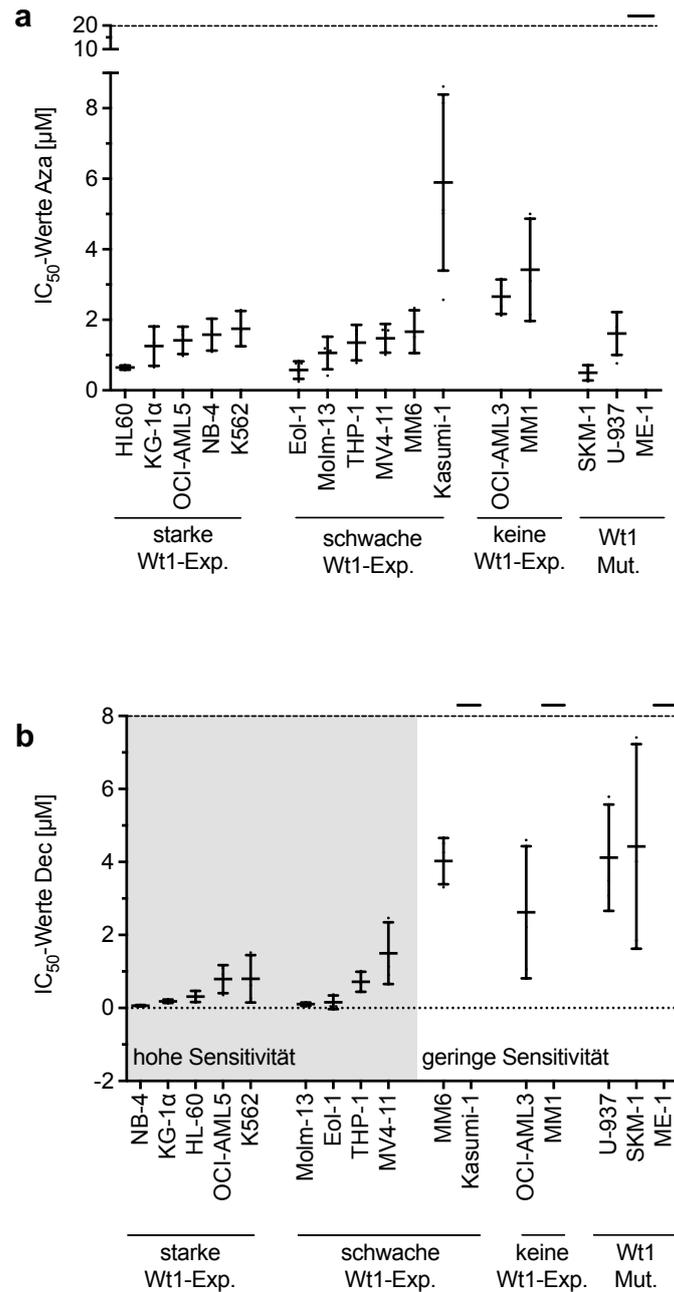


Abbildung 17: Zusammenhang der endogenen Wt1-Expression bzw. der Wt1-Mutationen mit der Sensitivität für HMA.

Vergleich der IC₅₀-Werte (Abb. 7) für Aza (a) und Dec (c) mit der endogene Wt1-Proteinexpression (Abb. 16b) sowie mit dem Wt1-Mutationsstatus (Tabelle 15). Der IC₅₀-Wert wurde aus mind. 3 unabhängigen Versuchen ermittelt und als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Die Zellen für die kein IC₅₀-Wert ermittelt werden konnte wurden über dem Konzentrationsmaximum dargestellt. Die y-Achse beschreibt den IC₅₀-Wert (μM). Die Zellen wurden anhand des Mittelwerts der endogenen Wt1-Expression in starke (über 0,5 der K562 Wt1-Proteinexpression) und schwache (unter 0,5 der K562 Wt1-Proteinexpression) Wt1-Proteinexpression eingeteilt. Zellen bei denen keine Wt1-Expression festgestellt werden konnten bildeten eine eigene Gruppe.

4.2.3 Funktionelle Charakterisierung Wt1 exprimierender Ba/F3-Zellen

4.2.3.1 Erzeugung Wt1 exprimierender Ba/F3-Zellen

Zur Analyse der zellulären Bedeutung der mit dem rezidiv-assoziierten Wt1-Mutationen wurden in Anlehnung an die Publikation Greif et al. vier Wt1-Mutationen, zwei rezidiv-spezifische Mutationen (S381x, D464G) und zwei stabil-exprimierte Mutationen (R380W, R430x), funktionell charakterisiert. Damit wurden zwei Punktmutationen in Exon 7 (R380W) und Exon 9 (D464G) sowie zwei Stopmutationen in Exon 7 (S381x) und Exon 8 (R430x) generiert (Abb. 18). Die Mutagenese wurde in der Isoform D (NM_024426.3) durchgeführt, da diese die am häufigsten exprimierte Wt1-Isoform darstellt. Um ein mögliches onkogenes Potenzial der Wt1-Isoformen zu analysieren, wurden zusätzlich zu den Wt1-Mutationen die Wt1-Isoformen A und D funktionell charakterisiert.

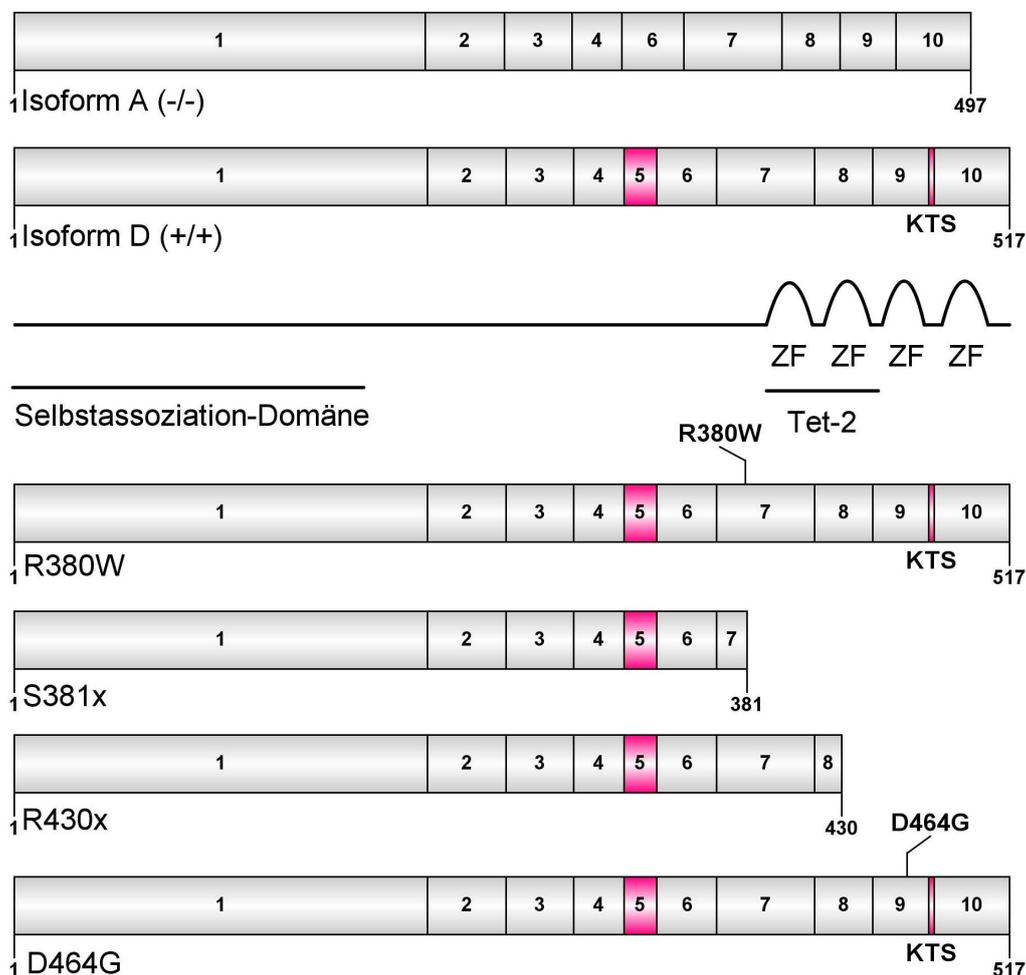


Abbildung 18: Wt1-Konstrukte.

Graphische Darstellung der Wt1-Mutationen sowie der Isoformen A (NM_024426.3) und Isoform D (NM_024426.3) mit Wt1-Zinkfingerdomäne (ZF) nach NCBI, Wt1-Tet-2-Proteininteraktionsdomäne (Tet-2) nach Wang et al. und Selbstassoziations-Domäne nach Reddy et al..^{131,133} Abbildungen wurden mit dem Programm IBS erstellt.¹³⁴

Nach erfolgreicher Mutagenese wurde die cDNA in den pcDNA6-Vektor und in den retroviralen pMIG-Vektor kloniert. Zunächst erfolgte die transiente Transfektion von Phoenix Eco- und HEK239T-Zellen mit den Wt1-Konstrukten. Anschließend wurden Zellen in der murinen Pro-B-Zelllinie Ba/F3 mit den Wt1-Konstrukten stabil transduziert. Hierfür wurde der Virusüberstand der mit Wt1-transfizierten Phoenix Eco-Zellen verwendet (Abb. 19b). Abschließend wurde die Wt1-Expression per Immunoblot detektiert. In Phoenix Eco- und HEK-293T-Zellen war bei allen Konstrukten eine deutliche Wt1-Expression zu erkennen, lediglich das Konstrukt der S381x-Mutante zeigte eine schwächere Expression (Abb. 19a, b). Alle Konstrukte ließen sich in Ba/F3-Zellen stabil exprimieren. Diese zeigten keine endogene Wt1-Expression. Bei den Konstrukten der Isoform A und D sowie bei den Mutanten R380W und S381x war eine deutlich geringe Wt1-Expression festzustellen als bei den übrigen Konstrukten (Abb. 19c). Der Western-Blot wurde mehrfach wiederholt mit gleichbleibendem Ergebnis. Eine fehlerhafte Transduktion wurde durch eine erneute Transduktion der Konstrukte ausgeschlossen.

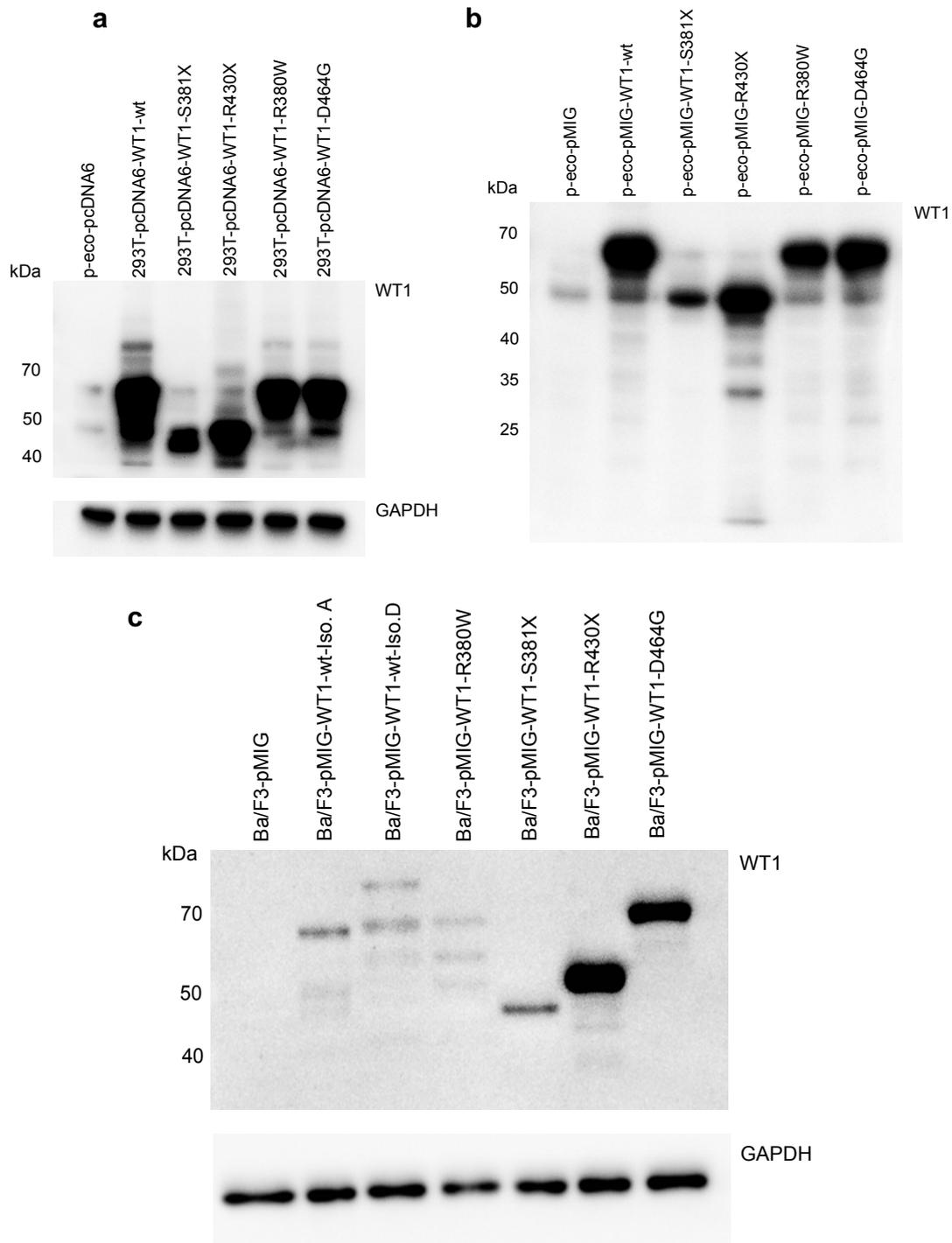


Abbildung 19: Wt1-Proteinexpression in verschiedenen zellulären Systemen.

Wt1-Proteinexpression in Ganzzelllysaten per Immunoblot mit dem Anti-Wt1-Antikörper (D6M6S, Cell Signaling) detektiert in Wt1-transfizierten HEK-293T-Zellen (**a**), Phoenix Eco-Zellen (**b**), sowie in Wt1-transduzierten Ba/F3-Zellen (**c**). Endogenes GAPDH diente als Ladungskontrolle (**a,c**).

4.2.3.2 Untersuchung eines proteasomalen Abbaus der Wt1-Konstrukte in Ba/F3-Zellen
 Zur Analyse eines möglichen proteasomalen Abbaus der Wt1-mRNA in Wt1-transduzierten Ba/F3-Zellen wurden die Zellen für 4 Stunden mit einem MG-132-Proteasomeninhibitor behandelt und die Wt1-Proteinexpression in Ganzzelllysaten per Immunoblot detektiert.

Die Behandlung mit dem MG-132-Proteasomeinhibitor führte bei keiner der Konstrukte zu einer Veränderung der Wt1-Proteinexpression (Abb. 20).

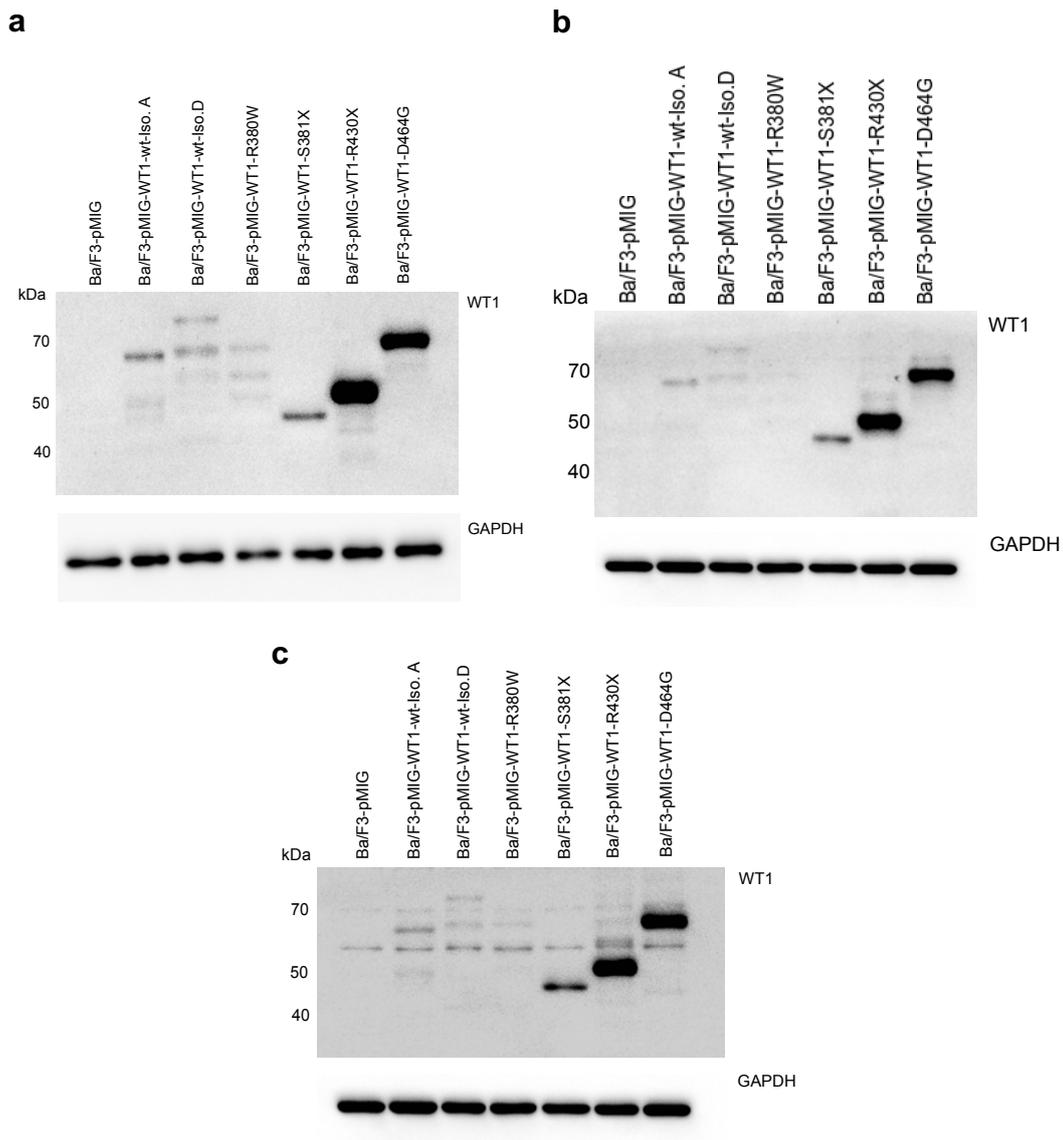


Abbildung 20: Kein Effekt des MG-132 Proteasomeninhibitors.

Nach Inkubation Wt1-transduzierter Ba/F3-Zellen für 4 Std. mit einem MG-132-Proteasomeninhibitor in Konzentrationen von 10 μM (b) und 20 μM (c) wurde die Wt1-Proteinexpression in Ganzzelllysaten per Immunoblot mit dem Anti-Wt1-Antikörper (D6M6S, Cell Signaling) detektiert, endogenes GAPDH diente als Ladungskontrolle. Kontrolle durch unbehandelten Ba/F3-Zellen (a).

4.2.3.3 Ermittlung eines proliferativen Vorteils Wt1 exprimierender Ba/F3-Zellen

Native Ba/F3-Zellen benötigen für die Proliferation den Zusatz des Zytokins IL-3 (1 ng/mL). Zur Ermittlung eines möglichen proliferativen Vorteils der Wt1-Mutationen sowie der Wt1-Isoformen A und D wurden die Wt1-transduzierten Ba/F3-Zellen unter absteigenden IL-3 Konzentration für 72 Stunden kultiviert und ihr Wachstum analysiert. Es konnte weder ein proliferativer Vorteil der Konstrukte beobachtet werden, noch führten diese zu einer IL-3 unabhängigen Proliferation (Abb. 21).

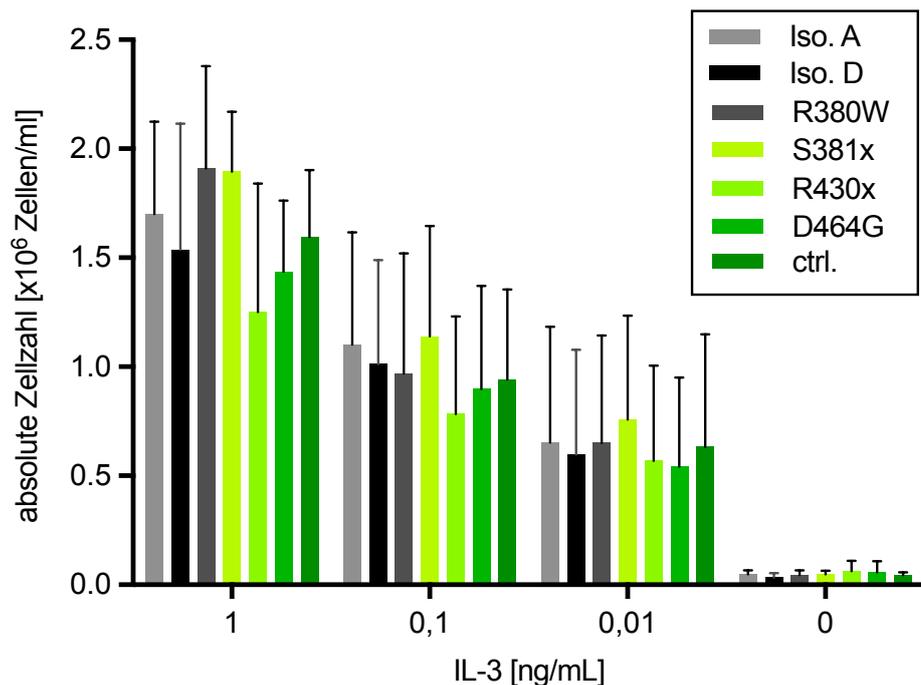


Abbildung 21: Keine proliferative Wirkung der Wt1-Konstrukte.

Wt1-transduzierte Ba/F3-Zellen wurden jeweils für 72 Std. bei unterschiedlichen IL-3-Konzentrationen (1;0,1;0,01;0 ng/mL) inkubiert. Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung (n=3). Die y-Achse beschreibt die absolute Zellzahl $\times 10^6$ Zellen/ml.

4.2.3.4 Veränderungen der DNA-Methylierung Wt1 exprimierender Ba/F3-Zellen

Zur Untersuchung eines möglichen Effekts der Wt1-Konstrukte auf die epigenetische Markierung der Zellen wurden sowohl die globale Methylierung (5-mC) als auch die globale Hydroxymethylierung (5-hmC) der DNA der transduzierten Ba/F3-Zellen analysiert. Hierfür wurden Zellproben generiert und die Bestimmung der epigenetischen Markierung in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Carell (Chemie Department der LMU) von Sarah Schiffer durchgeführt.

In unseren Untersuchungen blieben sowohl das globale 5-mC als auch das globale 5-hmC der Wt1-transduzierten Ba/F3-Zellen unverändert (Abb. 22).

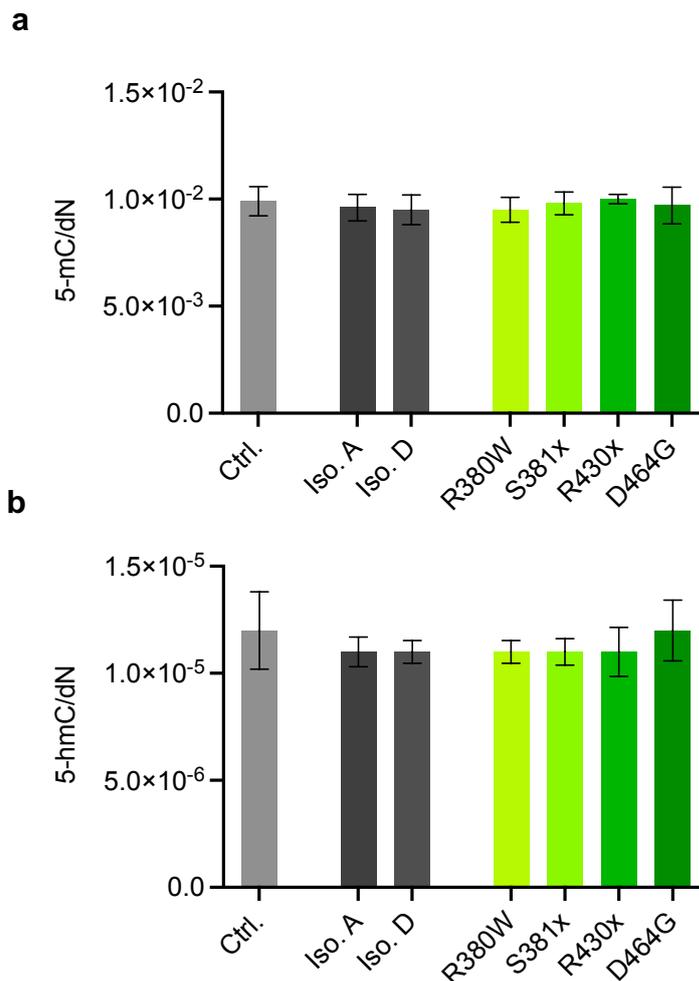


Abbildung 22: Kein Effekt der Konstrukte auf die epigenetische Markierung.

Vergleich der globalen Methylierung (a) sowie der globalen Hydroxymethylierung (b) Wt1-transduzierter Ba/F3-Zellen. Messung der 5-mC- und 5-hmC-Level wurden von Sarah Schiffer durchgeführt. Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung (n=9). Die y-Achse beschreibt 5-mC (a) bzw. 5-hmC (b) pro Nukleotid der DNA.

4.2.3.5 Zytostatikasensitivität Wt1 exprimierender Ba/F3-Zellen

Es wurde sowohl der Einfluss der Wt1-Konstrukte auf die Sensitivität für Ara-C als auch für Dec untersucht. Hierfür wurden die Wt1-transduzierten Ba/F3-Zellen für 72 Stunden mit den Medikamenten inkubiert und anschließend die Sensitivität anhand des IC_{50} -Werts ermittelt. Die Konzentrationen der Medikamente wurden an den Blutplasmaspiegeln der Patienten unter Therapie gewählt.^{72,167,168}

Die Wt1-Isoform A zeigte eine geringere Sensitivität für die Behandlung mit Ara-C. Dies zeigte sich in einem gegenüber der Kontrolle 1,7-fach erhöhten IC_{50} -Wert (Abb. 23a). Bei den übrigen Wt1-Konstrukten war kein Effekt zu erkennen (Abb. 23).

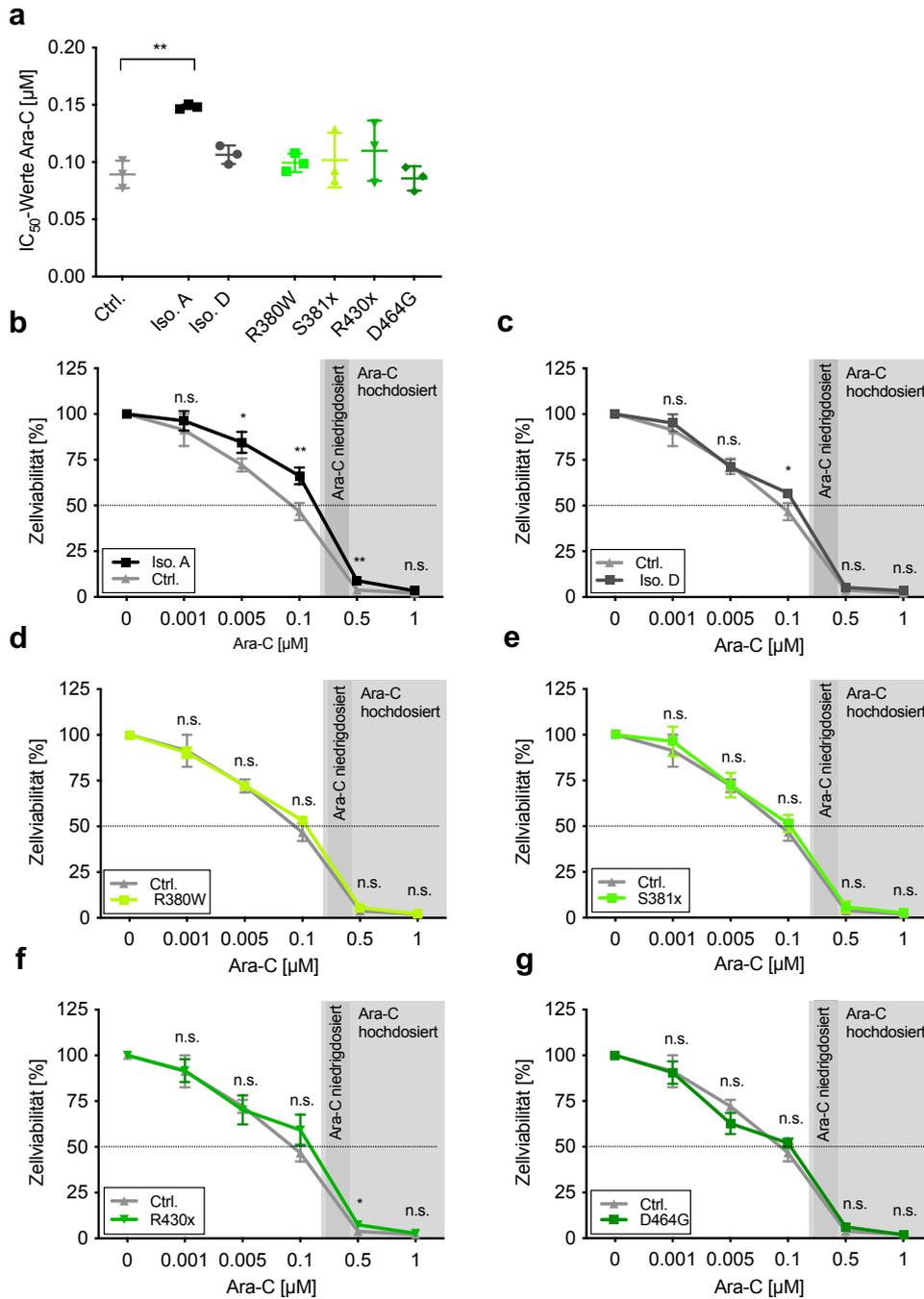


Abbildung 23: Expression der Wt1-Isoform A führt zur geringeren Sensitivität für Ara-C.

IC₅₀-Werte der Wt1-transduzierten Ba/F3-Zellen für Ara-C (a). Vergleich der Dosis-Wirkungskurve der Kontrolle mit der Wt1-Isoform A (b), der Wt1-Isoform D (c) und der Wt1-Mutante R380W (d), S381x (e), R430x (f), D464G (g). Die Zellen wurden für 72 Std. mit Ara-C in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Der Wert wurden aus mind. 3 unabhängigen Versuchen ermittelt und als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Der grau hinterlegte Bereich gibt die mittlere Plasmakonzentrationen der Patienten unter niedrig (100mg/m²) bzw. hochdosierter (3000mg/m²) Ara-C Infusion an.¹⁶⁸ Auswertung mittels zweiseitigen, ungepaarten student's t-Test, *P<0.05, **P<0.01, ***<0.001, n.s.= nicht signifikant. Die y-Achse beschreibt IC₅₀-Wert für Ara-C (μM) (a) bzw. die Zellviabilität prozentual zur unbehandelten Kontrolle (b,c,d,e,f,g).

Bei der Behandlung mit Dec zeigte sich ebenfalls für die Isoform A eine geringere Sensitivität, der IC₅₀-Wert war gegenüber der Kontrolle 2,3-fach erhöht (Abb. 24a). Zudem sprach die R430x-Mutante signifikant schlechter auf die Behandlung mit Dec an, ihr IC₅₀-Wert war zur Kontrolle 2,6-fach erhöht (Abb. 24a).

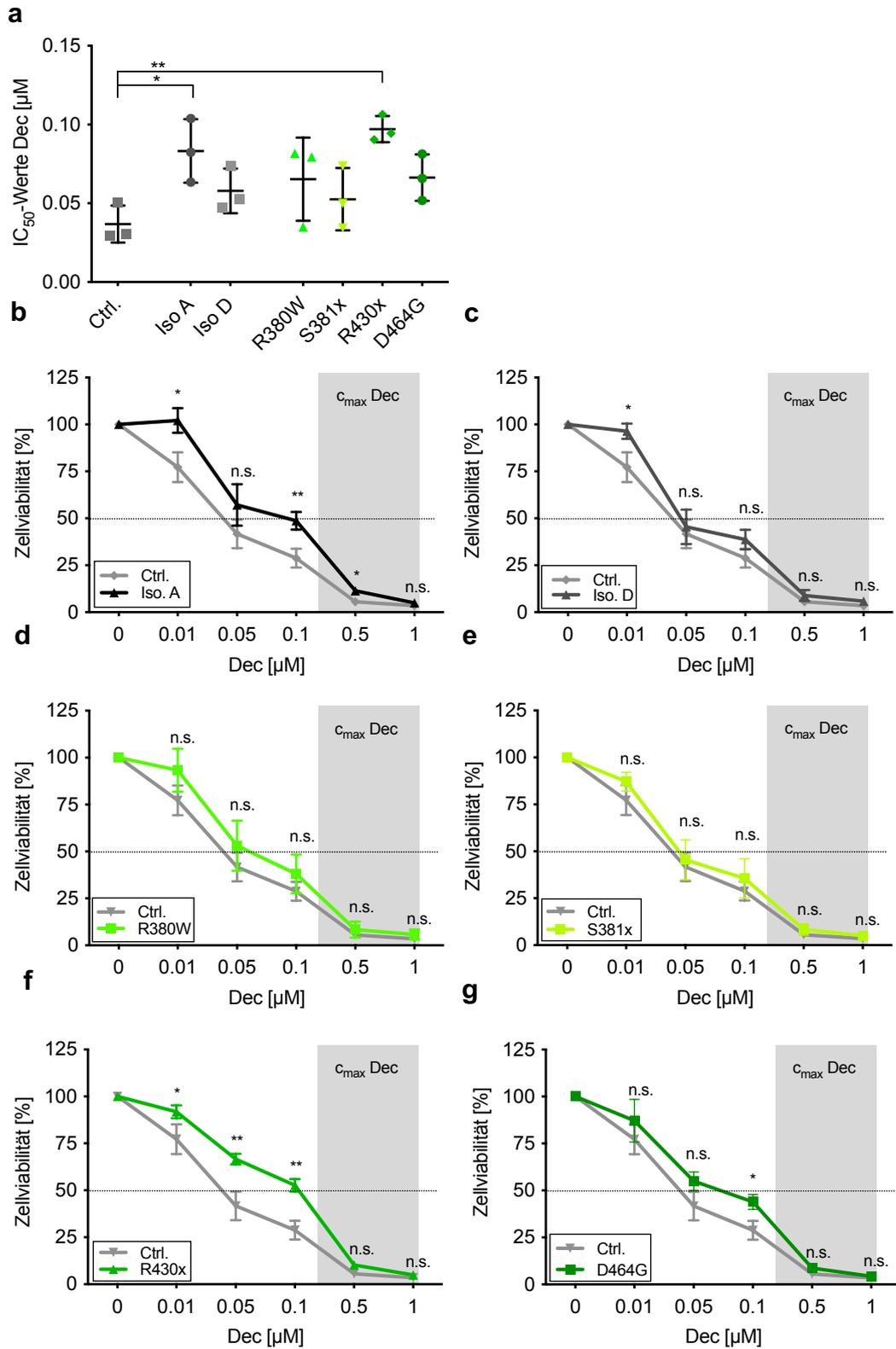


Abbildung 24: Expression der Mutation-R430x sowie der Wt1-Isoform A führt zur geringeren Sensitivität für Dec.

Vergleich der IC₅₀-Werte der Wt1-transduzierten Ba/F3-Zellen für Dec (**a**). Vergleich der Dosis-Wirkungskurve der Kontrolle mit der Wt1-Isoform A (**b**), der Wt1-Isoform D (**c**) und der Wt1 Mutante R380W (**d**), S381x (**e**), R430x (**f**), D464G (**g**). Die Zellen wurden für 72 Std. mit Dec in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Der Wert wurden aus mind. 3 unabhängigen Versuchen ermittelt und als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Der grau hinterlegte Bereich gibt die max. Plasmakonzentrationen der Patienten unter Dec (15 mg/m²) Infusion an.^{72,167} Auswertung mittels zweiseitigen, ungepaarten student's t-Test, *P<0.05, **P<0.01, ***<0.001, n.s.= nicht signifikant. Die y-Achse beschreibt IC₅₀-Wert Dec (µM) (**a**) bzw. die Zellviabilität prozentual zur unbehandelten Kontrolle (**b,c,d,e,f,g**).

5 Diskussion

5.1 Die Bedeutung des Einbaus von hypomethylierenden Agenzien in die DNA und RNA mit Bezug auf Zytostatikatoxizität und klinisches Ansprechen

Azacytidin (Aza) und Aza-deoxycytidin (Decitabin, Dec) werden als hypomethylierende Substanzen für die Therapie älterer AML-Patienten, die keine intensive Chemotherapie erhalten können, angewendet.⁸⁷ Durch kovalente Bindung von DNMTs induzieren die in das Genom inkorporierten Agenzien eine transiente Abnahme der DNA-Methylierung. Diese führt zur Reaktivierung stillgelegter Tumorsuppressoren und stimuliert die Expression von immunmodulierenden Genen.^{68,80} Aza wird zusätzlich in die RNA inkorporiert, was vermutlich zu einer Hemmung der Proteinbiosynthese führt.^{81,82,83} Bis zu 70% der Patienten sind jedoch resistent gegen eine Therapie mit HMA und können nur noch durch eine SZT geheilt werden.^{88,89,90,91} Bis heute sind keine Prognosen über das Ansprechen auf die Therapie mit HMA möglich. Analytische Schwierigkeiten verhinderten lange genauere Kenntnisse über den Einbau der HMA in das Genom. Diese wären notwendig, um die Wirkung der HMA besser zu verstehen und prognostische Marker identifizieren zu können.^{68,73,86,112} Mit der neuentwickelten Methode der Arbeitsgruppe von Prof. Carell (Chemie Department der LMU) ist es nunmehr möglich, den Einbau der HMA in das Genom gleichzeitig mit der DNA- und RNA-Methylierung exakt zu bestimmen.^{113,114,116} Zur Identifikation möglicher Resistenzmechanismen gegen HMA analysierten wir die Inkorporation der Agenzien in das Genom, die epigenetische Markierung unter HMA-Therapie, sowie jeweils die Veränderung der Inkorporation sowie der epigenetischen Markierung nach 24 und 72 Stunden.

In unseren Vorversuchen zeigte sich, dass die Kultivierung der Zellen in MEM-Medium zu einer Resistenz der Zellen gegen HMA führt. Das schlechtere Ansprechen der Zellen wurde durch das Vorhandensein von Nukleotiden im Zellmedium vermittelt. Ein wahrscheinlicher Mechanismus ist, dass Nukleotide kompetitiv den Einbau von HMA in das Genom hemmen. Dies konnte für Nukleotidanaloga, wie Ara-C, bereits *in vitro* gezeigt werden.^{41,45} Um einheitliche Untersuchungsbedingungen zu schaffen, wurden nachfolgend alle Zellen in RPMI-Medium ohne den Zusatz von Nukleotiden kultiviert. Anschließend wurde die Zytostatika-Empfindlichkeit der leukämischen Zelllinien für Aza und Dec ermittelt. Einige der leukämischen Zelllinien zeigten eine deutlich reduzierte Empfindlichkeit für Aza und Dec. Es konnte jeweils eine Gruppe mit hoher Sensitivität und eine mit niedriger Sensitivität identifiziert werden. Übereinstimmend mit

Quin et al. konnten wir keine Korrelation der IC_{50} -Werte für Aza und Dec feststellen.⁸⁴ Dies könnte unter anderem an den teilweise unterschiedlichen Wirkungsmechanismen der beiden Agenzien liegen.^{85,86} Für die Zelllinie U-937 wurde von Quin et al. und für die Zelllinien OCI-AML3 und HL60 wurden von Hollenbach et al. ein von unseren Ergebnissen abweichender IC_{50} -Wert beschrieben.^{84,86} Abweichungen in den IC_{50} -Werten der Zellen können mit den teilweise verschiedenen Bezugsquellen der Zellen, abweichenden Behandlungsmethoden und labortechnischer Varianz zusammenhängen. Zur Analyse der Inkorporation von HMA in das Genom sowie der epigenetischen Veränderungen unter Therapie wurden zwei Versuchsansätze gewählt. In 4.1.3 wurden zunächst Einzelproben mehrerer leukämischer Zelllinien in technischen Triplets (n=3) nach 24 Std. Behandlung analysiert. Die Proben wurden in einer speziellen Gefrierlösung gefroren. Dies stellte sich als nicht optimal für die analytischen Methoden heraus und hatte eventuell Einfluss auf die Messergebnisse. Dieser war vermutlich gering, da wir dennoch große Mengen der inkorporierter Agenzien detektieren konnten, welche Vergleichswerten der Arbeitsgruppe von Prof. Carell (Chemie Department der LMU) entsprachen.^{113,116} Allerdings konnten für einige wenige Zellen nicht alle Messungen durchgeführt werden. Anschließend wurden in 4.1.4 jeweils zwei Zelllinien mit hoher und geringer Sensitivität für HMA ausgewählt und diese in biologischen und technischen Triplets (n=9) nach 24 Std. und nach 72 Std. Behandlung ohne Trägersubstanz gefroren und analysiert. Die Ergebnisse werden im Folgenden gemeinsam diskutiert. Unsere erste Hypothese war, dass leukämische Zellen mit einer geringeren Sensitivität für Aza/Dec weniger Substrate in ihre DNA/RNA inkorporieren. Wir konnten deutliche zellspezifische Unterschiede in der Inkorporation der Agenzien erkennen, diese korrelierte jedoch nicht direkt mit der Sensitivität der Zellen. Auffallend war außerdem, dass Dec trotz 6-fach niedriger Dosierung bei den meisten Zellen signifikant stärker in die DNA inkorporiert wurde. Molm-13 und MM1 bauten Dec und Aza vergleichsweise gleich stark in die DNA ein. Die Beobachtungen lassen vermuten, dass die vergleichbare Wirksamkeit von Dec in deutlich niedrigen Dosen auf die effektivere Inkorporation von Dec in die DNA zurückzuführen ist. Ein limitierender Schritt bei der Inkorporation von Aza in die DNA ist die benötigte Umwandlung durch die Ribonukleotid Reduktase.⁶⁸ Aimiuwu et al. zeigten erst kürzlich, dass durch die Inkorporation von Aza in die RNA die Aktivität der Ribonukleotid Reduktase gehemmt wird. Sie vermuten, dass dies zu einer verminderten Inkorporation von Aza in die DNA führt.¹⁶⁹ Auch wir konnten beobachten, dass Aza als Ribonukleotid in die RNA der Zellen inkorporiert wurde, wobei in unseren Experimenten insgesamt mehr Aza in die DNA als in die RNA inkorporiert

wurde. Interessanterweise wurde in zwei Publikationen durch indirekte Messungen der Substrate, per radioaktiver Markierung, mehr Aza in der RNA detektiert als in der DNA.^{73,86} Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz ist, dass es durch die indirekte Messung der Substrate per radioaktiver Markierung zu einer Verzerrung der Ergebnisse kommen könnte.¹¹³ Unsere zweite Hypothese war, dass der hypomethylierende Effekt von Aza/Dec auf die DNA/RNA in leukämischen Zellen mit geringer Sensitivität weniger stark ausgeprägt ist als bei Zellen mit hoher Sensitivität. Außerdem vermuteten wir, dass der hypomethylierende Effekt mit der Inkorporation der Agenzien assoziiert ist. Zum Teil konnten wir dies für die Behandlung mit Dec bestätigen. Hier nahm die DNA-Methylierung der sensitiven Zellen deutlich stärker ab als bei den resistenten Zellen. Auch Quin et al., beschreiben, dass für einen vergleichbaren hypomethylierenden Effekt bei resistenten Zellen höhere Dosen Dec nötig sind.⁸⁴ Vergleicht man die Inkorporation von Aza und Dec, wurde Dec meist stärker inkorporiert und führte damit auch zu einer stärkeren Abnahme der DNA-Methylierung. Deutlich stärkere hypomethylierende Effekte wurden auch von Jones et al. bei der Behandlung mit Dec beobachtet. In dessen Versuchen war ungefähr die 10-fache Menge an Aza nötig um ähnliche hypomethylierende Effekte zu erreichen wie unter Dec-Therapie.¹⁷⁰ Es bleibt jedoch zu erwähnen, dass die beiden Agenzien sich teilweise deutlich in ihren Wirkungsmechanismen unterscheiden.^{85,86} Es kann somit nicht sicher festgestellt werden, ob die stärkere hypomethylierende Wirkung unter Dec ausschließlich auf die stärkere Inkorporation von Dec zurückzuführen ist. Dagegen spricht auch, dass in Molm-13- und MM1-Zellen Aza und Dec vergleichsweise gleich stark inkorporiert wurden, dennoch führt Dec bei diesen Zellen zu einer stärkeren Abnahme der DNA-Methylierung. Im Vergleich der Zellen untereinander war die Menge der Inkorporation der Agenzien nicht mit der stärkeren Abnahme der DNA-/RNA-Methylierung assoziiert. Die Inkorporation von Aza in die RNA führte in unseren Untersuchungen außerdem zu einer Abnahme der RNA-Methylierung. Auch Schaefer et al. beschreiben *in vitro* eine Abnahme der RNA-Methylierung unter Aza-Therapie, höchstwahrscheinlich durch die Hemmung der DNMT2 vermittelt.⁸³ Unklar bleibt, ob sich diese Beobachtungen auch auf die klinische Wirkung der Agenzien übertragen lassen. So konnten Unnikrishnan et al. in *in vivo* Untersuchungen keine Abnahme der RNA-Methylierung unter Aza-Therapie beobachten.¹¹⁵

In mehreren Studien wurde die geringe Plasmahalbwertszeit von HMA im Zusammenhang mit der chemischen Instabilität der Agenzien beschrieben.^{71,72,171,172} Welche Auswirkungen diese auf die Inkorporation der Substrate und die epigenetischen

Veränderungen unter HMA-Therapie haben, ist weitgehend unbekannt. Wir stellten die Hypothese auf, dass HMA durch ihre geringe HWZ nach kurzer Zeit wieder aus dem Genom entfernt werden, wodurch die hypomethylierende Wirkung abnimmt. Wir vermuteten, dass diese Prozesse bei Zellen mit geringer Sensitivität möglicherweise beschleunigt ablaufen. Bei den meisten Zellen war bereits nach 72 Stunden eine Abnahme der inkorporierten Substanzen zu beobachten. Diese war auf Grund der Standardabweichung nicht bei allen Zellen signifikant. Anzunehmen ist, dass durch den Umsatz der DNA, DNA-Reparaturmechanismen und Zellzykluskontrollen die inkorporierten Agenzien sukzessive abgebaut werden.¹⁷³ Gleichzeitig stehen keine weiteren Substrate mehr für die Inkorporation zu Verfügung, da die HWZ der Substrate in wässriger Lösung bei 37°C ungefähr 7 Std. für Aza und ungefähr 21 Std. für Dec beträgt.⁶⁸ Damit erklärt sich vermutlich auch weshalb Aza in unseren Versuchen vergleichsweise stärker aus der DNA abgebaut wurde als Dec. Alterationen in zellulären Kontrollmechanismen können in Tumorzellen zu einem unterschiedlich raschen Abbau der Agenzien aus der DNA führen.¹⁷³ Auch wir beobachteten zellspezifische Unterschiede in der Veränderung der inkorporierten Substrate. Dies könnte allerdings auch mit den unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten der Zellen zusammenhängen, welche unter anderem durch die antiproliferative Wirkung der Agenzien beeinflusst wird. Die hypomethylierende Wirkung der Agenzien hielt bei allen Zellen über 72 Stunden an. Unsere Ergebnisse stimmen folglich mit den Beobachtungen von Liu et al. überein, in welchen die Verminderung der globalen DNA-Methylierung und die Suppression der DNMT1 in leukämischen Ziellinien bis zu 10 Tage nach der Behandlung mit HMA anhielt.¹⁷⁴ Anzunehmen ist somit, dass der proteasomale Abbau der DNMT wesentlich für den über die Inkorporation fortdauernden hypomethylierenden Effekt der Agenzien ist.

Wenngleich von uns und weiteren Autoren keine direkte Korrelation der Inkorporation mit der Sensitivität der Zellen beobachtet werden konnte, ist diese vermutlich dennoch wesentlich an der Effektivität der Therapie beteiligt.⁸⁴ Hierbei bestehen jedoch wahrscheinlich zellspezifische Unterschiede. So beschreiben auch Unnikrishnan et al., dass nur bei einem Teil der Aza-resistenten MDS- und CMML-Patienten das schlechtere Ansprechen durch eine ausbleibende Inkorporation von Aza in das Genom bedingt wird.¹¹⁵ Eine verminderte Inkorporation der Agenzien kann vermutlich aus einem zu geringen zellulären Transport, aus einem verminderten intrazellulären Metabolismus der HMA sowie aus Veränderungen im Zellzyklus resultieren.^{106-111,175} Unnikrishnan et al.

beobachteten, dass bei Aza resistenten MDS-Patienten sich ein großer Teil der hämatopoetischen Zellen in Ruhephasen der Zellteilung befinden.¹⁷⁵ Die Sensitivität der leukämischen Zellen hing in der Behandlung mit Dec mit der effektiven Abnahme der Methylierung zusammen. Bei einem ausbleibenden hypomethylierenden Effekt könnten sowohl Veränderung von Zielstrukturen, wie DNMT, als auch die indirekte Stabilisierung der DNA-Methylierung, im Tet-2-IDH1/2-Wt1-Signalweg, eine Rolle spielen.^{109,176} Zudem ist denkbar, dass vorbestehende Methylierungsmuster das Ansprechen auf HMA beeinflusst. Meldi et al. konnten an CMML-Patienten spezifische Methylierungsmuster distaler regulatorische Domänen identifizieren, welche mit dem Ansprechen auf Dec-Therapie assoziiert waren.¹⁰⁵ Es bleibt zu erwähnen, dass möglicherweise auch zytotoxische und immunmodulatorische Mechanismen eine Rolle in der Resistenz gegen HMA spielen. So beobachteten Cluzeau et al., dass die vermehrte Expression des anti-apoptotischen Faktors BCL2L10 mit der Aza-Resistenz *in vitro* assoziiert ist.¹⁷⁷ In unseren Untersuchungen konnten wir zudem die zeitlich begrenzte Wirksamkeit der Agenzien bestätigen. In den letzten Jahren wurde an verschiedenen Strategien gearbeitet, um die Wirksamkeit der HMA zu optimieren.^{114,178,179} Ein vielversprechender therapeutischer Ansatz ist die verlängerte Substitution von Aza in Form von oralem Aza (CC-486).^{180,181,182} CC-486 wird aktuell in einer Placebo-kontrollierten Phase III Studie (QUAZAR AML-001) in der Erhaltungstherapie älterer AML-Patienten, die keine allogene SZT erhalten können, geprüft. Hier zeigt sich in ersten Ergebnissen ein verlängertes Gesamtüberleben sowie rezidiv-freies Überleben der Patienten.^{183,184} Insgesamt stellt die Resistenz gegen HMA am ehesten ein zellspezifisches und multifaktorielles Geschehen dar, bei dem wahrscheinlich sowohl die Inkorporation der Agenzien selbst, als auch der Inkorporation nachgeschaltete Mechanismen sowie immunmodulatorische und zytotoxische Prozesse eine Rolle spielen. Untersuchungen zur intrazellulären Dynamik der Agenzien sind jedoch auch in Zukunft vonnöten, um die molekularen Mechanismen der HMA zu klären und langfristig die Therapie mit HMA zu optimieren.

5.2 Funktionelle Charakterisierung des Wilms' Tumor Gen 1 (Wt1) in der Akuten myeloischen Leukämie

Mit Hilfe moderner Genom Sequenzierungsmethoden wurde in den letzten Jahren ein neues Verständnis für die Komplexität und Dynamik der AML gewonnen. Verschiedene Subpopulationen der Leukämie existieren in einem fortlaufend kompetitiven Prozess zueinander und nicht selten wird das Rezidiv der Erkrankung mit Veränderung im Mutationsstatus begleitet.^{10,11,12,33,34} Dabei sind die funktionellen Konsequenzen vieler häufig wiederkehrender Mutationen bis heute nicht abschließend geklärt. Bei bis zu 14% der AML-Patienten können bei Diagnose Mutationen im Wt1 Gen festgestellt werden.^{10,12} Einige Autoren beschreiben sogar eine Zunahme der Mutationen im Rezidiv der Leukämie.^{33,34,165} Zusätzlich kann bei einem Großteil der Patienten eine Wt1-Überexpression beobachtet werden, die in einigen Studien mit einer schlechteren Prognose und Resistenzen gegen Therapien assoziiert ist.^{153,154,155,157,158} Möglicherweise ist dabei auch das gestörte Verhältnis der Wt1-Isoformen untereinander von Bedeutung.¹²³ In der Hämatopoese wird Wt1 temporär und zellspezifisch exprimiert und ist damit vermutlich an der dynamischen Regulation des Wachstums und der Differenzierung hämatopoetischer Progenitorzellen beteiligt.^{118,141} Dennoch sind die molekularen Mechanismen einer möglichen Wt1 vermittelten Leukämogenese und Resistenzentwicklung weitgehend unbekannt. Die funktionelle Charakterisierung der Wt1-Mutationen sowie der Wt1-Isoformen A/D könnten dazu beitragen dies besser zu verstehen.

5.2.1 Die Bedeutung häufig wiederkehrender Wt1-Mutationen im Progress der Leukämie

Die analysierten Wt1-Mutationen sind vor allem *Frameshift-Mutationen* und *Nonsense-Mutationen* die sich insbesondere in den Hotspot-Regionen in Exon 7 und 8 befinden, wie die Mutationen S381x und R430x.^{33,34} Diese führen vermutlich zu einem kompletten bzw. partiellen Verlust der Zinkfinger und damit zum dem Verlust der DNA-Interaktionsdomäne, die essentiell für die Transkriptionsfaktoraktivität von Wt1 ist. Zusätzlich gehen damit wichtige Proteininteraktionsdomänen sowie ein Teil ihrer Kernlokalisierungssignale verloren.¹¹⁹ Die zweithäufigsten Mutationen sind *Missense-Mutationen* in Exon 9, wie die Mutation D464G.^{33,34} Für diese konnte im Denys-Drash-Syndrom (DDS) gezeigt werden, dass sie zur Destabilisierung des dritten Zinkfingers und damit zu einer gestörten DNA-Bindung führen.^{185,186} Vergleichbare Wt1-Mutationen werden sowohl in der kindlichen AML (12%) als auch in der T-ALL (10%) beschrieben.

Diese sind sowohl in der erwachsenen als auch in der kindlichen AML mit FLT3-ITD-Mutationen assoziiert. In der T-ALL treten Wt1-Mutationen gemeinsam mit NOTCH1-Mutationen auf. Bei T-ALL Patienten kann auch eine Zunahme der Wt1-Mutationen im Rezidiv beobachtet werden. Interessanterweise werden bei 54% der kindlichen AML-Patienten auf dem zweiten Allel ebenfalls Wt1-Mutationen detektiert, wobei es sich bei erwachsenen AML-Patienten und T-ALL-Patienten vor allem um heterozygote Mutationen handelt.^{187,188} Wt1-Mutationen im Wilms Tumor sind überwiegend homozygote Deletionen des gesamten oder von Teilen des Wt1-Gens, die sowohl als Keimbahnmutationen als auch somatische Mutationen auftreten und zu einem kompletten Funktionsverlust der Proteine führen. Zudem kommen *Insertionen*, *Missense-Mutationen* und *Nonsense-Mutationen* nahezu im gesamten Bereichs des Wt1-Gens vor.^{189,190} *Missense-Mutationen* im Exon 9 wurden auch in einer sekundären AML eines Patienten mit WAGR-Syndrom (**W**ilms-Tumor, **A**niridie, **g**enitale Fehlbildungen, **g**eistige **R**etardierung) detektiert und sind in den Positionen R462 und D464 die häufigsten Mutationen im DDS.¹⁹⁰ Damit können in hämatologischen und nicht hämatologischen Neoplasien insbesondere Wt1-Mutationen beobachtet werden, die vermutlich zu dem vollständigen bzw. partiellen Funktionsverlust der Wt1-Proteine führen. Möglicherweise ist dabei in der AML bereits die Inaktivierung eines Allels ausreichend. Heterozygote *loss-of-function-Mutationen* können durch den Abbau mutierter Proteine im Rahmen des *non sense mediated RNA decay* oder proteasomale Degradierung zu einer *Haploinsuffizienz* der Gene führen.¹⁹¹ Moffett et al. beschreiben, dass trunkierende Wt1-Mutationen im DDS und im Wilms Tumor im Rahmen eines dominant-negativen Effekts, durch Dimerisierung mit dem aminoterminalen Bereich des Wildtyp-Proteins dessen Aktivität hemmen können.^{192,133} Es zeichnet sich zunehmend ab, dass dies auch auf hämatologischen Neoplasien zutreffen könnte.¹⁸⁸ Denkbar ist auch, dass verbleibende Wildtyp-Allele durch mutationsunabhängige Prozesse inaktiviert werden. Erst vor Kurzem wurde die Rolle des Hitzeschockproteins Hsp90 in der Aktivierung von Wt1 beschrieben.¹⁹³ Zusätzlich wird Wt1 durch eine Reihe posttranskriptioneller Modifikationen wie Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Sumoylierung prozessiert.^{127,129,130}

Bei 81,25% (n=13/16) der leukämischen Zelllinien konnten wir eine Wt1-Expression detektieren, diese war bei 37,5% (n=6/16) vergleichsweise stark und bei 43,75% (n=7/16) deutlich schwächer. Damit stimmen unsere Ergebnisse mit bereits publizierten Daten überein.¹⁵³ Bei 12,5% (n=2/16) unserer leukämischen Zellen konnten wir trotz Wildtyp-Wt1 keine Wt1-Proteinexpression detektieren. Laut Garg et. al. spiegelt die quantitativ

unterschiedliche Wt1-Expression die Differenzierungsstufe hämatopoetischen Zellen wieder.¹⁹⁴ Die ließ sich in unseren Untersuchungen, wie auch in denen von Siehl et al., nicht feststellen.¹⁹⁵ U-937-Zellen hatten keine endogene Wt1 Expression; hierbei ist ein dominant-negativer Effekt der trunkierenden Mutation in Exon 7 möglich.¹³³ Bei der frühen trunkierenden Mutationen in SKM-1 Zellen, die vermutlich zu einem partiellen Verlust der Selbstassoziations-Domäne führt, ist eher kein dominant negativer Effekt zu erwarten. Demnach könnte die schwache Wt1-Expression in SKM-1 Zellen Ausdruck einer *Haploinsuffizienz* von Wt1 sein.¹⁹¹ Die Punktmutation im 4. Zinkfinger in ME-1-Zellen führt möglicherweise nicht zu einem Abbau des mutierten Proteins was sich vermutlich in der vergleichsweise starken Proteinexpression der Zellen widerspiegelt. Die untersuchten Wt1-Mutationen S380W, S381x, R430x, D464G sowie die Wt1-Isoformen A/D wurden transient in HEK-293T-Zellen und in Phoenix Eco-Zellen exprimiert, zudem wurden sie stabil in Ba/F3-Zellen exprimiert. Ba/F3-Zellen eignen sich durch ihr IL-3-abhängiges Wachstum zur Untersuchung eines onkogenen Potenzials der Konstrukte. In HEK-293T-Zellen und in Phoenix Eco-Zellen wurden, bis auf die Mutation S381x, alle übrigen Wt1-Konstrukte gleich stark exprimiert. In Ba/F3-Zellen wurden die Wt1-Wildtyp-Isoformen A/D sowie die Mutationen R380W und S381x nur schwach exprimiert. Einen proteasomalen Abbau der Konstrukte konnten wir in Ba/F3-Zellen nicht nachweisen. Möglicherweise spielen hierbei weitere zelluläre Kontrollmechanismen wie der *non sense mediated RNA decay* eine Rolle.¹⁹¹ Fraglich ist allerdings warum hiervon die Mutanten R430x und D464G nicht betroffen sind.

In unseren Untersuchungen ließ sich in keiner der Konstrukte ein pro-proliferativer-Phänotyp erkennen. Interessanterweise beschreiben erstmalig Vidovic et al. die unkontrollierte Proliferation CD34+ Progenitorzellen unter der Expression trunkierender Wt1-Mutationen.¹⁹⁶ Wie dies mechanistisch vermittelt wurde, konnte allerdings nicht gezeigt werden.

Ein möglicher Mechanismus einer Wt1 vermittelten Leukämogenese könnte die epigenetische Inaktivierung spezifischer Gene sein. Hierbei scheint insbesondere die Interaktion mit Tet-2 Proteinen eine Rolle zu spielen.¹³¹ Wang et al. stellten durch Ko-Expression von Tet-2 und Wt1 in HEK-293T-Zellen eine Zunahme des 5-hmC sowie eine Abnahme des 5-mC in Bereich der Transkriptionsstartpunkte in Zielgenen von Wt1 fest. Sowohl die gezielte Herunterregulierung von Wt1 als auch von Tet-2 führte zu einer 5-hmC Abnahme und einer 5-mC Zunahme in diesen Bereichen, dabei konnte kein additiver Effekt durch die gezielte Herunterregulierung von beiden Genen beobachtet werden. Zudem konnten Wang et al. die physische Interaktion der Tet-2 Proteine mit der

Zinkfingerregion der Wt1 Proteine nachweisen.¹³¹ In unseren Untersuchungen ließen sich bei keiner der Wt1-Konstrukte signifikante Veränderungen in der epigenetischen Markierung der DNA feststellen. Jedoch konnten wir in unseren Untersuchungen nur die globalen Veränderungen der Methylierung beurteilen. Nicht auszuschließen ist daher, dass uns Alterationen in spezifischen Genloki entgangen sind. Hier könnten neue mathematische Verfahren helfen um übergeordnete Strukturen epigenetischer Veränderungen besser erkennen zu können. Rampal et al. stellten in Wt1 mutierten Patientenproben sowohl eine globale als auch Genlokus-spezifische Abnahme des 5-hmC fest, diese fand in Bereichen von Enhancern, distal regulatorischen Domänen und Genkörpern statt. Eine Zunahme des 5-mC ließ sich vor allem in Bereichen der Introns nahe Transkriptionsstartpunkten feststellen und war weniger stark mit der Wt1-Expression assoziiert.¹³² Sinha et al. konnten den kausalen Zusammenhang trunkierender Wt1-Mutationen mit der Hypermethylierung spezifischer CpG Inseln nachweisen, diese betrafen vor allem Zielgene des PRC2-Komplex, welche folglich inaktiviert wurden.¹⁹⁷ Pronier et al. konnten nachweisen, dass heterozygote Wt1-Mutationen im Lauf der Zeit zur Akkumulation epigenetischer und genetischer Veränderungen führen um damit die malignen Transformation hämatopoetischer Zellen induzieren.¹⁹⁸

Es ist denkbar, dass die von uns analysierten Veränderungen in Wt1 durch die funktionelle Inaktivierung von Wt1 auch die Zytostatikasensitivität der Zellen beeinflussen. Ara-C stellt einen wesentlichen Bestandteil der Zytostatikatherapie in der AML dar, zudem entwickelten sich einige der untersuchten Wt1-Mutationen unter dieser.^{19,21,22,33} In unseren Untersuchungen ließ sich jedoch bei keiner der untersuchten Wt1-Mutationen eine Resistenz gegen Ara-C beobachten. Nachdem wir in leukämischen Zelllinien ohne endogene Wt1-Expression ein geringeres Ansprechen auf Dec beobachten konnten, untersuchen wir dies auch in den Wt1-transduzierten Ba/F3-Zellen. Bei diesen ließ sich in der R430x-Mutante eine geringer Sensitivität für Dec nachweisen. Dies könnte mechanistisch durch den Verlust der Tet-2-Interaktionsdomäne der trunkierenden Wt1-Mutation vermittelt werden. Wang et al. vermuten, dass sowohl Tet-2-Mutationen als auch Wt1-Mutationen durch den Verlust der gemeinsamen Interaktionsdomäne mit einem Funktionsverlust von Tet-2 einhergehen.¹³¹ Es ist denkbar, dass Störungen in der epigenetischen Regulation der Zellen die demethylierende Wirkung von Dec beeinflussen. Zudem verlieren trunkierende Wt1-Mutationen wichtige DNA-Interaktionsdomänen, was wahrscheinlich die Transkriptionsfaktoraktivität der Proteine beeinflusst. Becker et al. beschreiben, dass sich in Wt1-mutierten CN-AML-Patienten die Expression bis zu 193 genetischer Bereiche verändert, dies betrafen vor allem Gene der

Regulation metabolischer und proliferativer Prozesse.¹⁹⁹ In der Leukämie sind Resistenzen gegen Zytostatika häufig mit der Expression des P-Glykoprotein, auch Multidrug-Resistance-Protein Gen 1 (MDR-1) genannt, assoziiert.⁴⁰ Dabei schleusen die membranständigen Transporter aktiv Zytostatika aus der Zelle heraus.^{38,39} Die Untersuchungen von McCoy et al. zeigten schon 1999, dass Wt1 die Tetradecanoylphorbol-acetat (TPA) vermittelte Aktivierung von MDR-1 *in vitro* hemmt. Dies wird vermutlich durch direkte Interaktion der Wt1-Zinkfingerdomäne mit dem MDR-1-Promoter vermittelt.²⁰⁰ Damit stehen trunkierende Wt1-Mutationen durch den Verlust der Zinkfingerdomäne auch im Verdacht die MDR-1-Expression der leukämischen Zellen zu beeinflussen. Wobei man hierbei auch eine Resistenz gegen Ara-C erwarten würde. Des Weiteren ist fraglich, warum wir den Effekt in der S381x-Mutante nicht beobachten konnten. Möglich ist, dass dies aus der deutlich schwächeren Expression der Mutation in Ba/F3-Zellen resultiert.

Insgesamt geben unsere Ergebnisse Hinweise darauf, dass inaktivierende Wt1-Mutationen die Zytostatikasensitivität für Dec verringern können. Die eher schwachen Effekte der Konstrukte in der murinen ProB-Zelllinie Ba/F3 könnten durch die spezifische Rolle von Wt1 in verschiedenen Organismen und Geweben erklärt sein.¹¹⁸ Zudem haben wir in Ba/F3-Zellen nur einen pro-proliferativen Effekt (IL-3 Empfindlichkeit) untersucht, weitere Effekte sind in diesem Modell nicht abzubilden, könnten aber zum Beispiel bei Expression in CD34+ humanen oder murinen Vorläuferzellen untersucht werden. Darüber hinaus könnten die unterschiedlichen Expressionslevel der Konstrukte in Ba/F3-Zellen eine Rolle spielen. Denkbar wäre, dass das Einbringen der Mutation mit Hilfe von molekularbiologischen Verfahren, wie der CRISPR/Cas9-Methode, in eine AML-Ziellinie mit endogener Wt1-Expression mehr Aufschluss geben könnte. Unklar bleibt auch, ob Wt1-Mutationen für die maligne Transformation hämatopoetischer Zellen weitere genetische oder epigenetische Veränderungen sowie Veränderungen des *Microenvironment* benötigen. Hierbei könnten insbesondere häufig beschriebene Ko-Mutationen, wie CEBPA und FLT3-ITD, Hinweise auf einen funktionellen Synergismus geben.^{161,162}

5.2.2 Die Rolle der Wt1-Isoformen in der Zytostatikaresistenz der AML

Veränderungen in Wt1 können zu einer Reihe von seltenen kongenitalen Syndromen sowie zu soliden und hämatologischen Neoplasien führen.²⁰¹ So kann der Verlust der (+)-KTS-Isoformen zu dem seltenen Frasier-Syndrom führen, bei dem es zu einem Pseudohermaphroditismus sowie zu einer fortschreitenden Glomerulopathie kommt.²⁰² Auch mit der malignen Transformation hämatopoetischer Zellen ändert sich das hochkonservierte Verhältnis der Wt1-Isoformen untereinander; dabei kommt es zu einer relativen Zunahme der Wt1-Isoformen A (-/-), B (+/-), C (-/+) sowie zu einer Abnahme der Wt1-Isoform D (+/+).¹²³ In Patientendaten konnte die Zunahme der (-)-KTS-Isoformen zu Lasten der (+)-KTS-Isoformen mit einer schlechten Prognose der Leukämie in Verbindung gebracht werden.²⁰³ Insgesamt lässt dies ein unterschiedliches onkogenes Potenzial der Wt1-Isoformen vermuten. Aktuelle Forschungsergebnisse sind diesbezüglich jedoch widersprüchlich. Die funktionelle Charakterisierung der Isoform A sowie der Isoform D sollte dazu beitragen deren Rolle in der AML besser zu verstehen. Wir transduzierten parallel zu den Wt1-Mutationen die Wt1-Isoformen A/D in murine Ba/F3-Zellen. Die beiden Isoformen wurden in dem zellulären System nur schwach exprimiert, hierbei konnte kein proteasomaler Abbau der Konstrukte nachgewiesen werden, eine fehlerhafte Transduktion wurde ebenfalls ausgeschlossen. Anschließend analysierten wir das IL-3 abhängige Proliferationsverhalten, die epigenetische Markierung der Zellen sowie die Zytostatikasensitivität für Ara-C und Dec. Dabei ließ sich kein Effekt der Wt1-Isoformen auf die Proliferation und die Epigenetik der Ba/F3-Zellen erkennen. In der Wt1-Isoform A (-/-) war ein geringeres Ansprechen auf die Behandlung mit Ara-C und Dec zu beobachten. Hierbei ist als möglicher Mechanismus eine differentielle Genexpression durch die veränderte Transkriptionsfaktor-Aktivität der Isoform A in Betracht zu ziehen. Dabei scheint insbesondere die Insertion der KTS-Region zwischen dem dritten und vierten Zinkfinger die Funktion der Isoformen zu beeinflussen. Das alternative Splicen der KTS-Region führt zu einer verringerten Flexibilität des vierten Zinkfinger und erhöht dadurch die DNA-Bindungsaffinität. (-)-KTS-Isoformen, wie die Isoform A, haben demnach eine höhere DNA-Bindungsaffinität sowie eine stärkere Transkriptionsfaktoraktivität.²⁰⁴ Zudem beschreiben Li et al., dass (-)-KTS-Isoformen in leukämischen Zelllinien die Expression von Chemokinen und Zelladhäsionsmolekülen fördern, was eine Zytostatikaresistenz begünstigen könnte.²⁰⁵ Als Nukleotidanaloga besitzen Ara-C und Dec Gemeinsamkeiten in ihrem Transport und zellulärem Metabolismus. Sowohl Ara-C als auch Dec werden über den ENT1 Transporter in die Zellen aufgenommen und unter anderem über die dCK in ihre aktiven

Metaboliten konvertiert. Anschließend können beide Agenzien über die CDA wieder abgebaut werden.⁴¹ Sowohl die Wirkung von Ara-C als auch die von Dec kann durch Expressionsänderungen in ENT1, dCK sowie CDA maßgeblich beeinflusst werden.^{84,106,110,111} Des Weiteren ist denkbar, dass Veränderungen in Zellzyklus, in Reparaturmechanismen sowie in der Apoptose zu einer Resistenz gegen Ara-C und Dec führen.³⁷ Hierbei ist für einige regulatorischer Gene bereits beschrieben, dass Wt1 für deren Expression relevant ist.¹²⁴ Es bleibt zu erwähnen, dass vermutlich auch das Einfügen des Exons 5, innerhalb der Proteininteraktionsdomäne, Einfluss auf die zelluläre Funktion der Wt1-Isoformen nimmt. So wurde für (+)-Exon-5-Isoformen in leukämischen Zellen eine antiapoptotische Wirkung beschrieben, welche möglicherweise auch an der Resistenz gegen Chemotherapeutika und dem Rezidiv der AML beteiligt sein könnte.^{206,207,208,209,210}

Abschließend ist festzuhalten, dass unsere Analysen eine mögliche Beteiligung der Wt1-Isoform A an der Resistenz gegen Nukleotidanaloga in der AML aufzeigen. Dies bedarf in Zukunft die Klärung eines spezifischen Mechanismus sowie die Miteinbeziehung der weiteren Wt1-Hauptisoformen. Darüber hinaus sind die eher schwachen Effekte der Wt1-Konstrukte vermutlich in dem verwendeten zellulärem System der Ba/F3-Zellen zu begründen, sowie in der relativ schwachen Expression der Isoformen in diesem. Auch hier könnte ein Einbringen der Konstrukte mit molekularbiologischen Verfahren, wie der CRISPR/Cas9-Methode, in einer AML-Zelllinie mit endogener Wt1-Expression spezifischere Erkenntnisse erbringen.

6 Zusammenfassung

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine komplexe und dynamische Erkrankung, die sich durch die klonale Proliferation gering- bzw. undifferenzierter myeloischer Vorläuferzellen auszeichnet. Unbehandelt führt sie innerhalb eines Jahres zu lebensbedrohlichen Blutungen, Infektionen und Anämien. Seit fast vier Jahrzehnten bilden Cytarabin (Ara-C) gemeinsam mit Anthrazyclinen die Grundlage der intensiven Chemotherapie (IC) in der AML. Bei älteren Patienten, die keine IC vertragen, kommen häufig hypomethylierende Agenzien (HMA) zum Einsatz. Dabei stellt die Therapieresistenz in beiden therapeutischen Strategien ein großes Hindernis dar. HMA führen über Inkorporation in das Genom zur Abnahme der DNA-Methylierung, was in der Aktivierung Tumorsuppressoren sowie in der Stimulation immunmodulatorischer Prozesse endet. Häufig wiederkehrenden genetischen Mutationen konnten mit Hilfe von modernen Genomsequenzierungsprojekten in den Zusammenhang mit Resistenz gegen Chemotherapien gebracht werden. Das Wilm's Tumor Gen (Wt1) wurde sowohl in verschiedenen Neoplasien als auch in kongenitalen Syndromen beschrieben. Durch alternatives Splicing entstehen vier Hauptisoformen, welche vermutlich unterschiedliche zelluläre Funktionen besitzen. In der AML kommen in bis zu 14% Wt1-Mutationen vor. Diese sind mit Therapieversagen, Rezidiven und einem verkürztem Überleben der Patienten assoziiert. In einer Diagnose-Rezidiv-Kohorte an unserer Klinik wurden bei 10% der 50 CN-AML-Patienten neue Wt1-Mutationen im AML-Rezidiv detektiert. Die funktionellen Konsequenzen der Wt1-Mutationen in der AML sind bis heute jedoch nicht abschließend geklärt.

Ziel des Projekts war es Mechanismen in der AML zu identifizieren, die zu Resistenzen gegen Erstlinientherapien, Ara-C, und Zweitlinientherapien, HMA, führen. Im ersten Teilprojekt wurde mit Blick auf die Zytostatikasensitivität die Inkorporation von HMA in das Genom, die epigenetische Markierung unter Therapie sowie deren zeitliche Entwicklung untersucht. Im zweiten Teilprojekt wurde die Bedeutung des Wilms Tumor Gens in der AML analysiert.

In unseren Untersuchungen war die Inkorporation in das Genom zwar wesentlich an der Wirkung der HMA beteiligt, die Sensitivität der einzelnen Zellen hing jedoch nicht direkt mit dieser zusammen. Die Sensitivität war insbesondere bei Dec mit der effektiven Abnahme der DNA-Methylierung assoziiert. Zudem beobachteten wir die zeitlich begrenzte Wirksamkeit der Agenzien.

In 81% der leukämischen Zelllinien fand sich eine unterschiedlich starke endogene Wt1-Expression. Zelllinien ohne Wt1-Wildtyp-Expression sprachen schlechter auf die

Behandlung mit Dec an. In Anlehnung an die Diagnose-Rezidiv-Kohorte unserer Klinik untersuchen wir vier, zwei rezidiv-spezifische und zwei stabil-exprimierte Wt1-Mutationen sowie die Isoformen A/D funktionell. Wir transduzierten hierfür die Mutationen bzw. Isoformen in Ba/F3-Zellen. Es ließ sich bei keiner der Mutationen einen Effekt auf das Proliferationsverhalten, die epigenetische Markierung oder die Ara-C-Sensitivität der Zellen feststellen. Möglicherweise benötigen Wt1-Mutationen hierfür weitere genetische oder epigenetische Alterationen sowie Veränderungen des *Microenvironment*. Hierbei ist ein funktioneller Synergismus mit beschriebenen Ko-Mutationen, wie CEBPA und FLT3-ITD, denkbar. In weiteren Untersuchungen sprach die Mutation R430x geringer auf die Behandlung mit Dec an. Dabei könnte sowohl eine beeinträchtigte epigenetische Regulation durch Verlust der Tet-2-Proteininteraktionsdomäne, als auch eine differentielle Genexpression durch den Verlust der DNA-Interaktionsdomäne eine Rolle spielen. In der Wt1-Wildtyp-Isoform A ließ sich zudem ein geringeres Ansprechen auf Ara-C und Dec feststellen. Hierbei ist möglicherweise ebenfalls eine veränderte Genexpression durch die vermutlich stärkere Transkriptionsfaktoraktivität der Isoform A von Bedeutung. Insgesamt ist vorstellbar, dass die eher schwachen Effekte der Wt1-Konstrukte in den murinen ProB-Zellen Ba/F3 mit der temporären und zellspezifischen Rolle von Wt1 zusammenhängen. Hier könnte das Einbringen der Konstrukte mit Hilfe von molekularbiologischen Verfahren, wie der CRISPR/Cas9-Methode, in leukämischen Zellen mit endogener Wt1-Expression mehr Aufschluss geben.

Zusammenfassend geben unsere Analysen Hinweise darauf, dass die Resistenz gegen HMA am ehesten ein multifaktorielles, zellspezifisches Geschehen ist, bei dem vermutlich sowohl die Inkorporation der Agenzien, als auch nachgeschaltete Mechanismen eine Rolle spielen. Ferner deuten die Ergebnisse der Arbeit darauf hin, dass sowohl Wt1-Mutationen als auch Veränderungen in der Expression der Wt1-Isoformen zur Zytostatikaresistenz gegen Erst- und Zweitlinien-Therapien beitragen können. Ein der großen Herausforderungen der onkologischen Forschung der nächsten Jahre wird weiterhin sein, zu beantworten wie die verschiedenen genetischen und epigenetischen Veränderungen miteinander interagieren und damit das Therapieansprechen des einzelnen Patienten beeinflussen.

7 Literaturverzeichnis

1. Estey, E. & Döhner, H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet* **368**, 1894–907 (2006).
2. Visser, O. *u. a.* Incidence, survival and prevalence of myeloid malignancies in Europe. *Eur. J. Cancer* **48**, 3257–3266 (2012).
3. Juliusson, G. *u. a.* Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood* **113**, 4179–4187 (2009).
4. Arber, D. A. *u. a.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127**, 2391–2405 (2016).
5. Döhner, H. *u. a.* Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* **115**, 453–474 (2010).
6. Grimwade, D. *u. a.* The Importance of Diagnostic Cytogenetics on Outcome in AML: Analysis of 1,612 Patients Entered Into the MRC AML 10 Trial. *Blood* **92**, 2322–2333 (1998).
7. Schlenk, R. F. *u. a.* Mutations and Treatment Outcome in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1909–1918 (2008).
8. Ley, T. J. *u. a.* ARTICLES DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature* **456**, 66–72 (2008).
9. Mardis, Elaine R. , Ding, Li, D. D. J. Recurring Mutations Found by Sequencing an Acute Myeloid Leukemia Genome. *N Engl J Med* **361**, 1058–66 (2009).
10. Papaemmanuil, E. *u. a.* Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **374**, 2209–2221 (2016).
11. The Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* **368**, 2059–74 (2013).
12. Metzeler, K. H. *u. a.* Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* **28**, 686–698 (2016).
13. Genovese, G. *u. a.* Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence. *N Engl J Med* **371**, 2477–87 (2014).
14. Busque, L. *u. a.* Recurrent Somatic TET2 Mutations in Normal Elderly Individuals With Clonal Hematopoiesis. *Nat Genet* **44**, 1179–1181 (2012).
15. Jaiswal, S. *u. a.* Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *N Engl J Med* **26**, 2488–98 (2014).

16. Xie, M. *u. a.* Age-related cancer mutations associated with clonal hematopoietic expansion. *Nat Med* **20**, 1472–1478 (2014).
17. Toyota, M. *u. a.* Methylation profiling in acute myeloid leukemia. *Blood* **97**, 2823–2829 (2001).
18. Kroeger, H. *u. a.* Aberrant CpG island methylation in acute myeloid leukemia is accentuated at relapse. *Blood* **112**, 1366–1373 (2008).
19. Cheson, B. D. *u. a.* Revised Recommendations of the International Working Group for diagnosis, standardization of response criteria, treatment outcomes, and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* **21**, 4642–4649 (2003).
20. Döhner, H. *u. a.* Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* **129**, 424–447 (2017).
21. Longo, D. L., Döhner, H., Weisdorf, D. J. & Bloomfield, C. D. Acute Myeloid Leukemia. *n engl j med* **12**, 1136–52 (2015).
22. Rai, K. R. *u. a.* *Treatment of Acute Myelocytic Leukemia: A Study by Cancer and Leukemia Group B.* *Blood* **58**, (1981).
23. Schlenk, R. F. *u. a.* Midostaurin added to chemotherapy and continued single-agent maintenance therapy in acute myeloid leukemia with FLT3-ITD. *Blood* **133**, 840–851 (2019).
24. Burnett, A. K. *u. a.* Identification of Patients with Acute Myeloblastic Leukemia Who Benefit from the Addition of Gemtuzumab Ozogamicin: Results of the MRC AML15 Trial. *J. Clin. Oncol.* **29**, 369–377 (2011).
25. Hiddemann, W. *u. a.* Management of Acute Myeloid Leukemia in Elderly Patients. *J Clin Oncol* **17**, 3569–3576 (2020).
26. Erba, H. P. Has there been progress in the treatment of older patients with acute myeloid leukemia? *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **23**, 495–501 (2001).
27. Shah, A., Andersson, T. M. L., Racht, B., Björkholm, M. & Lambert, P. C. Survival and cure of acute myeloid leukaemia in England, 1971-2006: a population-based study. *Br. J. Haematol.* **162**, 509–516 (2013).
28. Meyers, J. *u. a.* Medicare Fee-for-Service Enrollees with Primary Acute Myeloid Leukemia: An Analysis of Treatment Patterns, Survival, and Healthcare Resource Utilization and Costs. *Appl Heal. Econ Heal. Policy* **11**, 275–286 (2013).
29. Grimwade, D. *u. a.* The predictive value of hierarchical cytogenetic classification

- in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood* **98**, 1312–1320 (2001).
30. Byrd, J. C. *u. a.* Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* **100**, 4325–4336 (2002).
 31. Ding, L. *u. a.* Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature* **48**, 506–510 (2012).
 32. Rothenberg-Thurley, M. *u. a.* Persistence of pre-leukemic clones during first remission and risk of relapse in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **32**, 1598–1608 (2018).
 33. Greif, P. A. *u. a.* Evolution of Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia During Therapy and Relapse: An Exome Sequencing Study of 50 Patients. *Clin. Cancer Res.* **24**, 1716–1727 (2018).
 34. Vosberg, S. *u. a.* Relapse of acute myeloid leukemia after allogeneic stem cell transplantation is associated with gain of WT1 alterations and high mutation load. *Haematologica* **103**, 581 (2018).
 35. Parkin, B. *u. a.* Clonal evolution and devolution after chemotherapy in adult acute myelogenous leukemia. *Blood* **121**, 369–377 (2013).
 36. Yeung, C. C. S. & Radich, J. Predicting Chemotherapy Resistance in AML. *Curr Hematol Malig Rep* **12**, 530–536 (2017).
 37. Marin, J. J. G., Briz, O., Rodríguez-Macias, G., Díez-Martín, J. L. & Macias, R. I. R. Role of drug transport and metabolism in the chemoresistance of acute myeloid leukemia. *Blood Rev.* **30**, 55–64 (2015).
 38. Pastan, I. & Gottesman, M. Multiple-Drug Resistance in Human Cancer. *N. Engl. J. Med.* **306**, 802–805 (1974).
 39. Mahadevan, D. & List, A. F. Targeting the multidrug resistance-1 transporter in AML: molecular regulation and therapeutic strategies. *Blood* **104**, 1940–1951 (2004).
 40. Pirker, R. *u. a.* MDRI Gene Expression and Treatment Outcome in Acute Myeloid Leukemia. *J Natl Cancer Inst* **83**, 708–712 (1991).
 41. Galmarini, C. M., Mackey, J. R. & Dumontet, C. Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies. *Leukemia* **15**, 875–890 (2001).

42. Abraham, A., Savitha, V., Sreeja, K. & Chepsy, P. RNA expression of genes involved in cytarabine metabolism and transport predicts cytarabine response in acute myeloid leukemia. *Pharmacogenomics* **16**, 877–890 (2015).
43. Galmarini, C. M. *u. a.* In vivo mechanisms of resistance to cytarabine in acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* **117**, 860–868 (2002).
44. Flasshove, M. *u. a.* Structural analysis of the deoxycytidine kinase gene in patients with acute myeloid leukemia and resistance to cytosine arabinoside. *Leukemia* **8**, 780–785 (1994).
45. Major, P. P., Egan, E. M., Beardsley, G. P., Minden, M. D. & Kufe, D. W. Lethality of human myeloblasts correlates with the incorporation of arabinofuranosylcytosine into DNA. *Med. Sci.* **78**, 3235–3239 (1981).
46. Kunz, B. A. Mutagenesis and deoxyribonucleotide pool imbalance. *Mutat. Res.* **200**, 133–147 (1988).
47. Chabner, B. A., Hande, K. R. & Drake, J. C. Ara-C metabolism: implications for drug resistance and drug interactions. *Bull. Cancer* **66**, 89–92 (1979).
48. Wattel, E. *u. a.* p53 Mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood* **84**, 3148–3157 (1994).
49. Becker, P. S. *u. a.* Very late antigen-4 function of myeloblasts correlates with improved overall survival for patients with acute myeloid leukemia. *Blood* **113**, 866–874 (2009).
50. Matsunaga, T. *u. a.* Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. *Nat. Med.* **9**, 1158–1165 (2003).
51. Feinberg, A. P. The key role of epigenetics in human disease prevention and mitigation. *New England Journal of Medicine* **378**, 1323–1334 (2018).
52. Dawson, M. A. & Kouzarides, T. Leading Edge Review Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy. *Cell* **150**, 12–27 (2012).
53. Liang, G. *u. a.* Cooperativity between DNA Methyltransferases in the Maintenance Methylation of Repetitive Elements. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 480–491 (2002).
54. Gujar, H., Weisenberger, D. J. & Liang, G. The roles of human DNA methyltransferases and their isoforms in shaping the epigenome. *Genes (Basel)* **10**, 172 (2019).
55. Deaton, A. M. & Bird, A. CpG islands and the regulation of transcription. *GENES Dev.* **25**, 1010–1022 (2011).

56. Williams, K., Christensen, J. & Helin, K. DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? *EMBO Rep.* **13**, 28–35 (2012).
57. Delatte, B., Deplus, R. & Fuks, F. Playing TET risk with DNA modifications. *EMBO J.* **33**, 1198–1211 (2014).
58. Ito, S. *u. a.* Tet Proteins Can Convert 5-Methylcytosine to 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine. *Science (80-.)*. **333**, 1300–1303 (2011).
59. Baylin, S. B. & Jones, P. A. A decade of exploring the cancer epigenome — biological and translational implications. *Nat. Publ. Gr.* **11**, 726–734 (2011).
60. Ko, M. *u. a.* Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature* **468**, 839–843 (2010).
61. Shlush, L. I. *u. a.* Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature* **000**, 1–6 (2014).
62. Sun, Y., Chen, B. R. & Deshpande, A. Epigenetic regulators in the development, maintenance, and therapeutic targeting of acute myeloid leukemia. *Front. Oncol.* **8**, 1–16 (2018).
63. Shivarov, V., Gueorguieva, R., Stoimenov, A. & Tiu, R. DNMT3A mutation is a poor prognosis biomarker in AML: Results of a meta-analysis of 4500 AML patients. *Leuk. Res.* **37**, 1445–1450 (2013).
64. Dinardo, C. D. *u. a.* Characteristics, clinical outcome, and prognostic significance of IDH mutations in AML. *Am J Hematol* **90**, 732–736 (2015).
65. Figueroa, M. E. *u. a.* DNA Methylation Signatures Identify Biologically Distinct Subtypes in Acute Myeloid Leukemia We hypothesized that DNA methylation distributes into specific patterns in cancer cells. *Cancer Cell* **17**, 13–27 (2010).
66. Figueroa, M. E. *u. a.* Leukemic IDH1 and IDH2 Mutations Result in a Hypermethylation Phenotype, Disrupt TET2 Function, and Impair Hematopoietic Differentiation. *Cancer Cell* **18**, 553–567 (2010).
67. Russler-Germain, D. A. *u. a.* Cancer Cell The R882H DNMT3A Mutation Associated with AML Dominantly Inhibits Wild-Type DNMT3A by Blocking Its Ability to Form Active Tetramers. *Cancer Cell* **25**, 442–454 (2014).
68. Stresemann, C. & Lyko, F. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int. J. Cancer* **123**, 8–13 (2008).
69. Yang, A. S. *u. a.* DNA Methylation Changes after 5-Aza-2-Deoxycytidine Therapy in Patients with Leukemia. *Cancer Res* **66**, 5495–503 (2006).
70. Stresemann, C., Bokelmann, I., Mahlknecht, U. & Lyko, F. Azacytidine causes complex DNA methylation responses in myeloid leukemia. *Mol. Cancer Ther.* **7**,

- 2998–3005 (2008).
71. Marcucci, G., Silverman, L., Eller, M., Lintz, L. & Beach, C. L. Bioavailability of azacitidine subcutaneous versus intravenous in patients with the myelodysplastic syndromes. *J. Clin. Pharmacol.* **45**, 597–602 (2005).
 72. Cashen, A. F., Shah, A. K., Todt, L., Fisher, N. & DiPersio, J. Pharmacokinetics of decitabine administered as a 3-h infusion to patients with acute myeloid leukemia (AML) or myelodysplastic syndrome (MDS). *Cancer Chemother. Pharmacol.* **61**, 759–766 (2008).
 73. Li, L. H., Olin, E. J., Buskirk, H. H. & Reineke, L. M. *Cytotoxicity and Mode of Action of 5-Azacytidine on LI 210 Leukemia1*. *CANCER RESEARCH* **30**, (1970).
 74. Weisenberger, D. J. *u. a.* Role of the DNA Methyltransferase Variant DNMT3b3 in DNA Methylation. *Mol. Cancer Res.* **2**, 62–72 (2004).
 75. Stresemann, C., Brueckner, B., Musch, T., Stopper, H. & Lyko, F. Functional Diversity of DNA Methyltransferase Inhibitors in Human Cancer Cell Lines. *Cancer Res* **66**, 2794–800 (2006).
 76. Duchmann, M. & Itzykson, R. Clinical update on hypomethylating agents. *Int. J. Hematol.* **110**, 161–169 (2019).
 77. Jüttermann, R., Li, E. N., Jaenisch, R. & Weinberg, A. Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation (DNA methylatlon/drug resistance/cancer treatment) Communicated by Robert. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* **91**, 11797–11801 (1994).
 78. Pali, S. S., Van Emburgh, B. O., Sankpal, U. T., Brown, K. D. & Robertson, K. D. DNA Methylation Inhibitor 5-Aza-2-Deoxycytidine Induces Reversible Genome-Wide DNA Damage That Is Distinctly Influenced by DNA Methyltransferases 1 and 3B. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 752–771 (2008).
 79. Mortusewicz, O., Schermelleh, L., Walter, J., Cristina Cardoso, M. & Leonhardt, H. Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. *CELL Biol.* **102**, 8905–8909 (2005).
 80. Chiappinelli, K. B. *u. a.* Inhibiting DNA Methylation Causes an Interferon Response in Cancer via dsRNA Including Endogenous Retroviruses. *Cell* **162**, 974–986 (2015).
 81. Lu, L.-J. W. & Randerath, K. Mechanism of 5-Azacytidine-induced Transfer RNA Cytosine-5-methyltransferase Deficiency. *CANCER Res.* **40**, 2701–2705 (1980).

82. Leer, T. T. & Karon, M. R. INHIBITION OF PROTEIN SYNTHESIS IN 5-AZACYTIDINE-TREATED HeLa CELLS*. *Biochem. Pharmacol.* **25**, 1737–1742 (1976).
83. Schaefer, M., Hagemann, S., Hanna, K. & Lyko, F. Azacytidine Inhibits RNA Methylation at DNMT2 Target Sites in Human Cancer Cell Lines. *Cancer Res* **69**, 8127–8159 (2009).
84. Qin, T., Jelinek, J., Si, J., Shu, J. & Issa, J.-P. J. MYELOID NEOPLASIA Mechanisms of resistance to 5-aza-2-deoxycytidine in human cancer cell lines. *Blood* **113**, 659–667 (2009).
85. Flotho, C. *u. a.* The DNA methyltransferase inhibitors azacitidine, decitabine and zebularine exert differential effects on cancer gene expression in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* **23**, 1019–1028 (2009).
86. Hollenbach, P. W. *u. a.* A comparison of azacitidine and decitabine activities in acute myeloid leukemia cell lines. *PLoS One* **5**, 9001 (2010).
87. Gardin, C. & Dombret, H. Hypomethylating Agents as a Therapy for AML. *Curr Hematol Malig Rep* **12**, 1–10 (2017).
88. Becker, H., Suci, S. & Rüter, B. H. Decitabine versus best supportive care in older patients with refractory anemia with excess blasts in transformation (RAEBt) - results of a subgroup analysis of the randomized phase III study 06011 of the EORTC Leukemia Cooperative Group and German MDS St. *Ann Hematol* **94**, 2003–2013 (2015).
89. Dombret, H. *u. a.* International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with >30% blasts. *Blood* **126**, 291–299 (2015).
90. Fenaux, P. *u. a.* Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* **28**, 562–569 (2010).
91. Prébet, T. *u. a.* Outcome of high-risk myelodysplastic syndrome after azacitidine Treatment failure. *J. Clin. Oncol.* **29**, 3322–3327 (2011).
92. Traina, F. *u. a.* Impact of molecular mutations on treatment response to DNMT inhibitors in myelodysplasia and related neoplasms. *Leukemia* **28**, 78–87 (2014).
93. Cedena, M. T. *u. a.* Mutations in the DNA methylation pathway and number of driver mutations predict response to azacitidine in myelodysplastic syndromes. *Oncotarget* **8**, 106948–106961 (2017).
94. Emadi, A. *u. a.* Presence of isocitrate dehydrogenase mutations may predict

- clinical response to hypomethylating agents in patients with acute myeloid leukemia. *Am. J. Hematol.* **90**, E77–E79 (2015).
95. Dinardo, C. D. *u. a.* Lack of association of IDH1 , IDH2 and DNMT3A mutations with outcome in older patients with acute myeloid leukemia treated with hypomethylating agents. *Leuk. Lymphoma* **55**, 1925–1929 (2014).
 96. Welch, J. S. *u. a.* TP53 and Decitabine in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *N. Engl. J. Med.* **375**, 2023–2036 (2016).
 97. Chang, C.-K. *u. a.* TP53 mutations predict decitabine-induced complete responses in patients with myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol.* **176**, 600–608 (2017).
 98. Desoutter, J. *u. a.* Molecular prognostic factors in acute myeloid leukemia receiving first-line therapy with azacitidine. *Leukemia* **30**, 1416–1418 (2016).
 99. Bejar, R. *u. a.* TET2 mutations predict response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome patients. *Blood* **124**, 2705–2712 (2014).
 100. Blum, W. *u. a.* Clinical response and miR-29b predictive significance in older AML patients treated with a 10-day schedule of decitabine. *PNAS* **107**, 7473–7478 (2010).
 101. Shen, L. *u. a.* DNA Methylation Predicts Survival and Response to Therapy in Patients With Myelodysplastic Syndromes. *J Clin Oncol* **28**, 605–613 (2009).
 102. Daskalakis, M. *u. a.* Demethylation of a hypermethylated P15/INK4B gene in patients with myelodysplastic syndrome by 5-Aza-2-deoxycytidine (decitabine) treatment. *Blood* **100**, 2957–2964 (2002).
 103. Shih, A. H. *u. a.* Combination Targeted Therapy to Disrupt Aberrant Oncogenic Signaling and Reverse Epigenetic Dysfunction in IDH2-and TET2-Mutant Acute Myeloid Leukemia. *CANCER Discov.* **7**, 494–505 (2017).
 104. Fandy, T. E. *u. a.* Early epigenetic changes and DNA damage do not predict clinical response in an overlapping schedule of 5-azacytidine and entinostat in patients with myeloid malignancies. *Blood* **114**, 2764–2773 (2009).
 105. Meldi, K., Santini, V. & Figueroa, M. E. Specific molecular signatures predict decitabine response in chronic myelomonocytic leukemia The Journal of Clinical Investigation. *J Clin Invest* **125**, 1857–1872 (2015).
 106. Wu, P. *u. a.* The hENT1 and DCK genes underlie the decitabine response in patients with myelodysplastic syndrome. *Leuk. Res.* **39**, 216–220 (2015).
 107. Grant, S., Bhalla, K. & Gleyzer, M. Effect of Uridine on Response of 5-Azacytidine-resistant Human Leukemic Cells to Inhibitors of de Novo

- Pyrimidine Synthesis1. *CANCER Res.* **44**, 5505–5510 (1984).
108. Valencia, A. *u. a.* Expression of nucleoside-metabolizing enzymes in myelodysplastic syndromes and modulation of response to azacitidine. *Leukemia* **28**, 621–628 (2013).
 109. Sripayap, P. *u. a.* Mechanisms of resistance to azacitidine in human leukemia cell lines. *Exp. Hematol.* **42**, 294–306 (2014).
 110. Stegmann, A. P. A. *u. a.* In vitro-induced resistance to the deoxycytidine analogues cytarabine (AraC) and 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC) in a rat model for acute myeloid leukemia is mediated by mutations in the deoxycytidine kinase (dck) gene. *Ann. Hematol.* **71**, 41–47 (1995).
 111. Qin, T., Castoro, R., Ahdab, E., Jelinek, S. & Wang, J. Mechanisms of Resistance to Decitabine in the Myelodysplastic Syndrome. *PLoS One* **6**, 23372 (2011).
 112. Chan, K. K., Giannini, D. D., Staroscik, J. A. & Sadee, W. 5-Azacytidine hydrolysis kinetics measured by high-pressure liquid chromatography and ¹³C-NMR spectroscopy. *J. Pharm. Sci.* **68**, 807–12 (1979).
 113. Schiffers, S. *u. a.* Label-Free Quantification of 5-Azacytidines Directly in the Genome. *Helv. Chim. Acta* **102**, (2019).
 114. Wildenhof, T. M., Schiffers, S., Traube, F. R., Mayer, P. & Carell, T. Influencing Epigenetic Information with a Hydrolytically Stable Carbocyclic 5-Aza-2'-deoxycytidine. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **58**, 12984–12987 (2019).
 115. Unnikrishnan, A. *u. a.* AZA-MS: a novel multiparameter mass spectrometry method to determine the intracellular dynamics of azacitidine therapy in vivo. *Nat. Publ. Gr.* **32**, 900–910 (2018).
 116. Schiffers, S. Mass spectrometric analysis of modified nucleotides in embryonic development and disease. (2019).
 117. Call, K. M. *u. a.* Isolation and Characterization of a Zinc Finger Polypeptide Gene at the Human Chromosome 11 Wilms' Tumor Locus. *Cell* **60**, 509–520 (1990).
 118. Scharnhorst, V., Van Der Eb, A. J. & Jochemsen, A. G. WT1 proteins: Functions in growth and differentiation. *Gene* **273**, 141–161 (2001).
 119. Stoll, R. *u. a.* Structure of the Wilms Tumor Suppressor Protein Zinc Finger Domain Bound to DNA. *J. Mol. Biol* **372**, 1227–1245 (2007).
 120. Yang, L., Han, Y., Saiz, F. S. & Minden, M. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia* **21**, 868–876 (2007).

121. Bruening, W., Moffett, P., Chia, S., Heinrich, G. & Pelletier, J. Identification of nuclear localization signals within the zinc fingers of the WT1 tumor suppressor gene product. *FEBS 17460 FEBS Lett.* **393**, 41–47 (1996).
122. Haber, D. A. *u. a.* Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1 (alternative splicing/genomic structure). *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* **88**, 9618–9622 (1991).
123. Luna, I. *u. a.* WT1 isoform expression pattern in acute myeloid leukemia. *Leuk. Res.* **37**, 1744–1749 (2013).
124. Toska, E. & Roberts, S. G. E. Mechanisms of transcriptional regulation by WT1 (Wilms' tumour 1). *Biochem. J* **461**, 15–32 (2014).
125. Johnstone, R. W. *u. a.* A Novel Repressor, par-4, Modulates Transcription and Growth Suppression Functions of the Wilms' Tumor Suppressor WT1. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6945–6956 (1996).
126. Richard, D. J., Rie Schumacher, V., Royer-Pokora, B. & Roberts, S. G. E. Par4 is a coactivator for a splice isoform-specific transcriptional activation domain in WT1. *GENES Dev.* *15328–339* **15**, 328–339 (2001).
127. Ye, Y., Raychaudhuri, B., Gurney, A., Campbell, C. E. & Williams, B. R. Regulation of WT1 by phosphorylation: inhibition of DNA binding, alteration of transcriptional activity and cellular translocation. *EMBO J.* **15**, 5606–5615 (1996).
128. Sakamoto, Y., Yoshida, M., Semba, K. & Hunter, T. Inhibition of the DNA-binding and transcriptional repression activity of the Wilms' tumor gene product, WT1, by cAMP-dependent protein kinase-mediated phosphorylation of Ser-365 and Ser-393 in the zinc finger domain. *Oncogene* **15**, 2001–2012 (1997).
129. Smolen, G. A., Vassileva, M. T., Wells, J., Matunis, M. J. & Haber, D. A. SUMO-1 Modification of the Wilms' Tumor Suppressor WT1. *CANCER Res.* **16**, 7846–7851 (2004).
130. Makki, M. S., Heinzl, T. & Englert, C. TSA downregulates Wilms tumor gene 1 (Wt1) expression at multiple levels. *Nucleic Acids Res.* **36**, 4067–4078 (2008).
131. Wang, Y. *u. a.* WT1 recruits TET2 to regulate its target gene expression and suppress leukemia cell proliferation. **57**, 662–673 (2016).
132. Rampal, R., Alkalin, A., Figueroa, M. E. & Levine, R. L. DNA Hydroxymethylation Profiling Reveals that WT1 Mutations Result in Loss of TET2 Function in Acute Myeloid Leukemia Correspondence. *Cell Rep.* **9**, 1841–1855 (2014).

133. Reddy, J. C., Morris, J. C. & Wang, J. WT1-mediated Transcriptional Activation Is Inhibited by Dominant Negative Mutant Proteins. *J. Biol. Chem.* **279**, 10878–10884 (1995).
134. Liu, W. *u. a.* IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences. *Bioinforma.* **31**, 3359–3361 (2015).
135. Chau, Y.-Y. & Hastie, N. D. The role of Wt1 in regulating mesenchyme in cancer, development, and tissue homeostasis. *Trends Genet.* **28**, 515–524 (2012).
136. Hastie, N. D. Wilms' tumour 1 (WT1) in development, homeostasis and disease. *Co. Biol. Ltd* **144**, 2862–2872 (2017).
137. Bandiera, R., Sacco, S., Vidal, V. P. I., Chaboissier, M.-C. & Schedl, A. Steroidogenic organ development and homeostasis: A WT1-centric view. *Mol. Cell. Endocrinol.* **408**, 145–155 (2015).
138. Algar, E. State-of-the-Art Review A Review of the Wilms' Tumor 1 Gene (WT1) and Its Role in Hematopoiesis and Leukemia. *J. Hematother. Stem Cell Res.* **11**, 589–599 (2002).
139. Scholz, H. & Kirschner, K. M. A role for the Wilms' tumor protein WT1 in organ development. *Physiology* **20**, 54–59 (2005).
140. Brownstein, Y.-Y., Mjoseng, D., Lee, H. & Buza-Vidas, W.-C. Acute Multiple Organ Failure in Adult Mice Deleted for the Developmental Regulator Wt1. *PLoS Genet* **7**, 1002404 (2011).
141. Ogawa, H. *u. a.* Very low frequencies of human normal CD34+ haematopoietic progenitor cells express the Wilms' tumour gene WT1 at levels similar to those in leukaemia cells. *Br. J. Haematol.* **116**, 409–420 (2002).
142. Patmasiriwat, P., Fraizer, G. C., Claxton, D., Kantarjian, H. & Saunders, G. F. Expression pattern of WT1 and GATA-1 in AML with chromosome 16q22 abnormalities. *Leukemia* **10**, 1127–33 (1996).
143. Cunningham, T. J., Palumbo, I., Grosso, M., Slater, N. & Miles, C. G. WT1 regulates murine hematopoiesis via maintenance of VEGF isoform ratio. *Blood* **122**, 188–192 (2013).
144. Alberta, J. A. *u. a.* Role of the WT1 tumor suppressor in murine hematopoiesis. **101**, 2570–2574 (2003).
145. Ellisen, L. W., Carlesso, N., Cheng, T., Scadden, D. T. & Haber, D. A. The Wilms tumor suppressor WT1 directs stage-specific quiescence and differentiation of human hematopoietic progenitor cells. *EMBO J.* **20**, 1897–1909 (2001).

146. Svedberg, H., Richter, J. & Gullberg, U. Forced expression of the Wilms tumor 1 (WT1) gene inhibits proliferation of human hematopoietic CD34 + progenitor cells. *Leukemia* **15**, 1914–1922 (2001).
147. Tsuboi, A. *u. a.* Constitutive expression of the Wilms' tumor gene WT1 inhibits the differentiation of myeloid progenitor cells but promotes their proliferation in response to granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF). *Leuk. Res.* **23**, 499–505 (1999).
148. Nishida, S. *u. a.* AML1-ETO rapidly induces acute myeloblastic leukemia in cooperation with the Wilms tumor gene, WT1. *Blood* **107**, 3303–3312 (2006).
149. Davies, J. A. *u. a.* Development of an siRNA-based method for repressing specific genes in renal organ culture and its use to show that the Wt1 tumour suppressor is required for nephron differentiation. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 235–246 (2004).
150. Hu, Q. *u. a.* Wt1 ablation and Igf2 upregulation in mice result in Wilms tumors with elevated ERK1/2 phosphorylation. *Grad. Progr. Hum. Mol. Genet.* **121**, 174–183 (2011).
151. Miyagi T, Ahuja H, Kubota T, Kubonishi I, Koeffler HP, M. I. Expression of the candidate Wilm's tumor gene, WT1, in human leukemia cells. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/emedien.ub.uni-muenchen.de/pubmed/8321047>. (Zugegriffen: 19. Mai 2020)
152. Tamaki, H. *u. a.* The Wilms' tumor gene WT1 is a good marker for diagnosis of disease progression of myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **13**, 393–399 (1999).
153. Brieger, J. *u. a.* The expression of the Wilms' tumor gene in acute myelocytic leukemias as a possible marker for leukemic blast cells. *Leukemia* **8**, 2138–43 (1994).
154. Menssen, H. D. *u. a.* Presence of Wilms' tumor gene (wt1) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias. *Leukemia* **9**, 1060–7 (1995).
155. Miwa, H., Beran, M. & Saunders, G. F. Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in human leukemias. *Leukemia* **6**, 405–9 (1992).
156. Keilholz, U. *u. a.* A clinical and immunologic phase 2 trial of Wilms tumor gene product 1 (WT1) peptide vaccination in patients with AML and MDS. *Blood* **113**, 6541–6548 (2009).
157. Bergmann, L. *u. a.* High levels of Wilms' tumor gene (wt1) mRNA in acute

- myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome. *Blood* **90**, 1217–25 (1997).
158. Inoue, K. *u. a.* WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* **84**, 3071–9 (1994).
 159. Gaiger, A. *u. a.* Detection of the WT1 transcript by RT-PCR in complete remission has no prognostic relevance in de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia* **12**, 1886–1894 (1998).
 160. Schmid, D. *u. a.* Prognostic significance of WT1 gene expression at diagnosis in adult de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia* **11**, (1997).
 161. Gaidzik, V. I. *u. a.* Prognostic impact of WT1 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study of the German-Austrian AML Study Group. **113**, 4505–4511 (2009).
 162. Summers, K., Stevens, J. & Kakkas, I. Wilms' tumour 1 mutations are associated with FLT3-ITD and failure of standard induction chemotherapy in patients with normal karyotype AML. *Leukemia* **21**, 550–590 (2007).
 163. Paschka, P. *u. a.* Wilms' Tumor 1 Gene Mutations Independently Predict Poor Outcome in Adults With Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol* **26**, 4595–4602 (2008).
 164. Virappane, P. *u. a.* Mutation of the Wilms' Tumor 1 Gene Is a Poor Prognostic Factor Associated With Chemotherapy Resistance in Normal Karyotype Acute Myeloid Leukemia: The United Kingdom Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. *J Clin Oncol* **26**, 5429–5435 (2008).
 165. Quek, L. *u. a.* Mutational analysis of disease relapse in patients allografted for acute myeloid leukemia. *Blood* **1**, 193–204 (2016).
 166. Das, A. B. *u. a.* Clinical remission following ascorbate treatment in a case of acute myeloid leukemia with mutations in TET2 and WT1. *Blood Cancer J.* **9**, 2–5 (2019).
 167. Blum, W. *u. a.* Phase I study of decitabine alone or in combination with valproic acid in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* **25**, 3884–3891 (2007).
 168. Early, A. P., Preisler, H. D., Slocum, H. & Rustum, Y. M. A Pilot Study of High-Dose 1-β-D-Arabinofuranosylcytosine for Acute Leukemia and Refractory Lymphoma: Clinical Response and Pharmacology. *CANCER Res.* **42**, 1587–1594 (1982).
 169. Aimiuwu, J. *u. a.* RNA-dependent inhibition of ribonucleotide reductase is a

- major pathway for 5-azacytidine activity in acute myeloid leukemia. *Blood* **119**, 5229–5238 (2012).
170. Jones, P. A. & Taylor, S. M. Cellular Differentiation, Cytidine Analogs and DNA Methylation. *Cell* **20**, 85–93 (1980).
 171. Lin, K.-T., Momparler, R. L. & Rivard, G. E. High-performance Liquid Chromatographic Analysis of Chemical Stability of 5-aza-2'-Deoxycytidine. *J. Pharm. Sci.* **70**, 1228–1232 (1981).
 172. Rogstad, D. K. *u. a.* Chemical decomposition of 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine): Kinetic analyses and identification of products by NMR, HPLC, and mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* **22**, 1194–1204 (2009).
 173. Moura, M. De & Houten, B. Van. Mechanisms of DNADamage, Repair, and Mutagenesis. *Environ. Mol. Mutagen.* **405**, 391–405 (2010).
 174. Liu, Z. *u. a.* Characterization of in vitro and in vivo hypomethylating effects of decitabine in acute myeloid leukemia by a rapid, specific and sensitive LC-MS/MS method. *Nucleic Acids Res.* **35**, 31 (2007).
 175. Unnikrishnan, A. *u. a.* Integrative Genomics Identifies the Molecular Basis of Resistance to Azacitidine Therapy in Myelodysplastic Syndromes. *Cell Rep.* **20**, 572–585 (2017).
 176. Hur, E.-H. *u. a.* Establishment and characterization of hypomethylating agent-resistant cell lines, MOLM/AZA-1 and MOLM/DEC-5. *Oncotarget* **8**, 11748–11762 (2016).
 177. Cluzeau, T., Robert, G. & Mounier, N. BCL2L10 is a predictive factor for resistance to azacytidine in MDS and AML patients. *Oncotarget* **3**, 490–501 (2012).
 178. Garcia-Manero, G. *u. a.* Pracinostat plus azacitidine in older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia: results of a phase 2 study. (2019).
doi:10.1182/bloodadvances.2018027409
 179. DiNardo, C. D. *u. a.* Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naive, elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood* **133**, 7–17 (2019).
 180. Garcia-Manero, G. *u. a.* Phase I study of oral azacitidine in myelodysplastic syndromes, chronic myelomonocytic leukemia, and acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* **29**, 2521–2527 (2011).
 181. Laille, E. *u. a.* Pharmacokinetics and Pharmacodynamics with Extended Dosing of CC-486 in Patients with Hematologic Malignancies. *PLoS One* **10**, 1–19

- (2015).
182. Garcia-Manero, G. *u. a.* Efficacy and safety of extended dosing schedules of CC-486 (oral azacitidine) in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **30**, 889–896 (2016).
 183. Roboz, G. J. *u. a.* Design of the randomized, Phase III, QUAZAR AML Maintenance trial of CC-486 (oral azacitidine) maintenance therapy in acute myeloid leukemia. *Futur. Oncol* **12**, 293–302 (2016).
 184. Wei, A. H. *u. a.* The QUAZAR AML-001 Maintenance Trial: Results of a Phase III International, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of CC-486 (Oral Formulation of Azacitidine) in Patients with Acute Myeloid Leukemia (AML) in First Remission. *Blood* **134**, LBA-3-LBA-3 (2019).
 185. Borel, F., Barilla, K. C., Hamilton, T. B. & Romaniuk, P. J. Effects of Denys-Drash Syndrome Point Mutations on the DNA Binding Activity of the Wilms' Tumor Suppressor Protein WT1 †. *Biochemistry* **35**, 12070–12076 (1996).
 186. Little, M. *u. a.* DNA binding capacity of the WT1 protein is abolished by Denys-Drash syndrome WT1 point mutations. *Hum. Mol. Genet.* **4**, 351–358 (1995).
 187. Hollink, I. H. I. M. *u. a.* Clinical relevance of Wilms tumor 1 gene mutations in childhood acute myeloid leukemia. *Blood* **113**, 5951–5960 (2009).
 188. Tosello, V. *u. a.* WT1 mutations in T-ALL. *Blood* **114**, 1038–1045 (2009).
 189. Huff, V. Wilms' tumours: about tumour suppressor genes, an oncogene and a chameleon gene. *Nat. Publ. Gr.* **11**, 111–121 (2011).
 190. Royer-Pokora, B. *u. a.* Twenty-Four New Cases of WT1 Germline Mutations and Review of the Literature: Genotype/Phenotype Correlations for Wilms Tumor Development. *Am. J. Med. Genet.* **127**, 249–257 (2004).
 191. Hiwase, D. K. *u. a.* Mutant Wilms' tumor 1 (WT1) mRNA with premature termination codons in acute myeloid leukemia (AML) is sensitive to nonsense-mediated RNA decay (NMD). *Leukemia* **24**, 660–663 (2010).
 192. Moffett, P. *u. a.* Antagonism of WTJ activity by protein self-association (dominant-negative mutations/Wilms tumor/Denys-Drash syndrome/cancer genetics). *Genetics* **92**, 11105–11109 (1995).
 193. Bansal, H. *u. a.* Heat shock protein 90 regulates the expression of Wilms tumor 1 protein in myeloid leukemias. *Blood* **116**, 4591–4599 (2010).
 194. Garg, M., Moore, H., Tobal, K. & Liu Yin, J. A. Prognostic significance of quantitative analysis of WT1 gene transcripts by competitive reverse transcription polymerase chain reaction in acute leukaemia. *Br. J. Haematol.* **123**,

- 49–59 (2003).
195. Siehl, J. M. *u. a.* Expression of Wilms' tumor gene 1 at different stages of acute myeloid leukemia and analysis of its major splice variants. *Ann. Hematol.* **83**, 745–50 (2004).
 196. Vidovic, K. *u. a.* Leukemia associated mutant Wilms' tumor gene 1 protein promotes expansion of human hematopoietic progenitor cells. *Leuk. Res.* **37**, 1341–1349 (2013).
 197. Sinha, S. *u. a.* Mutant WT1 is associated with DNA hypermethylation of PRC2 targets in AML and responds to EZH2 inhibition. *Blood* **125**, 316–326 (2015).
 198. Pronier, E. *u. a.* Genetic and epigenetic evolution as a contributor to WT1-mutant leukemogenesis. *Blood* **132**, 1265–1278 (2018).
 199. Becker, H. *u. a.* Mutations of the Wilms tumor 1 gene (WT1) in older patients with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood* **116**, 788–792 (2010).
 200. McCoy, C., McGee, S. B. & Cornwell, M. M. The Wilms' tumor suppressor, WT1, inhibits 12-O-tetradecanoylphorbol- 13-acetate activation of the multidrug resistance-1 promoter. *Cell Growth Differ.* **10**, 377–386 (1999).
 201. Little, M. & Wells, C. A Clinical Overview of WT 1 Gene Mutations. *Hum. Mutat.* **9**, 61–68 (1997).
 202. Barbaux, S. *u. a.* Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. **17**, 467–470 (1997).
 203. Lopotová, T., Polák, J., Schwarz, J., Klamová, H. & Moravcová, J. Expression of four major WT1 splicing variants in acute and chronic myeloid leukemia patients analyzed by newly developed four real-time RT PCRs. *Blood Cells, Mol. Dis.* **49**, 41–47 (2012).
 204. Laity, J. H., Dyson, H. J. & Wright, P. E. Molecular basis for modulation of biological function by alternate splicing of the Wilms' tumor suppressor protein. *PNAS* **97**, 11932–11935 (2000).
 205. Li, X. *u. a.* Exogenous expression of WT1 gene influences U937 cell biological behaviors and activates MAPK and JAK-STAT signaling pathways. *Leuk. Res.* **38**, 931–939 (2014).
 206. Ito, K. *u. a.* Antiapoptotic function of 17AA(β)WT1 (Wilms' tumor gene) isoforms on the intrinsic apoptosis pathway. *Oncogene* **25**, 4217–4229 (2006).
 207. Renshaw, J. *u. a.* Disruption of WT1 gene expression and exon 5 splicing following cytotoxic drug treatment: Antisense down-regulation of exon 5 alters

- target gene expression and inhibits cell survival. *Mol Cancer Ther* **3**, 1467–83 (2004).
208. Gu, W. *u. a.* High expression of WT1 gene in acute myeloid leukemias with more predominant WT1+17AA isoforms at relapse. *Leuk. Res.* **34**, 46–49 (2010).
209. Kramarzova, K. *u. a.* Real-time PCR quantification of major Wilms' tumor gene 1 (WT1) isoforms in acute myeloid leukemia, their characteristic expression patterns and possible functional consequences. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund UK* **1**, 1–10 (2012).
210. Shen, H. *u. a.* Down-regulation of WT1/+17AA gene expression using RNAi and modulating leukemia cell chemotherapy resistance. *Haematologica* **92**, 1270–2 (2007).

Abkürzungsverzeichnis

2HG	α -Hydroxyglutarsäure
5-caC	5-Carboxylcytosin
5-fC	5-Formylcytosin
5-hmC	5-Hydroxymethylcytosin
5-mC	5-mC
5NT	5'-Nucleotidase
α	Alpha, Anti
β	Beta
%	Prozent
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
μ	Mikro
A	Amper
Abb.	Abbildung
ad	Auffüllen auf
aKG	α -Ketoglutarsäure
AG	Arbeitsgruppe
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
Ara-C	Ara-C
ATCC	Eng. American Type Culture Collection
ATP	Adenosin triphosphat
Aza	Azacytidine
bp	Basenpaare
BSA	Eng. Bovine serum albumine
Bzw.	Beziehungsweise
Ca.	Circa
CDA	Cytidin Deaminase
cDNA	Eng. Complementary DNA
CDP	Cytidindiphosphat
CEBPA	CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha
CML	Chronische myeloische Leukämie
CMML	Chronische myelomonozytäre Leukämie
CMP	Cytidinmonophosphat

CN	Zytogenetisch normal
CR	Komplette Remission
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat
CTP	Cytidintriphosphat
dCK	Deoxycytidin Kinase
DDS	Denys-Drash-Syndrom
Dec	Decitabin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
dN	desoxy-Nukleotid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNMT	DNA methyltransferase
dNTP	deoxynucleotide triphosphate
DSMZ	Eng. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures
ECL	Enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENT1	Eng. Equilibrative nucleoside transporter 1
Eng.	Englisch
FAB	Eng. French-American-British
FACS	Eng. Fluorescence activated cell sorter
FBS	Fetales bovines Serum
FLT3	Eng. Fms-like tyrosine kinase 3
FOR	Eng. Forward
g	Gram
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunden
HBS	Eng. Hepes-buffered saline
HMA	Hypomethylierende Agenzien
HWZ	Halbwertszeit
IDH	Isocitratdehydrogenase
ITD	Eng. Internal tandem duplication
i.v.	intravenös
IC	Intensive Chemotherapie
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration

IL-3	Interleukin 3
kDa	Kilodalton
Kg	Kilogram
KTS	Lysin, Threonin, und Serin
L	Liter
LDH	L-Lactatdehydrogenase
m	Milli
m ²	Quadratmeter
MDR	Eng. Multidrug-resistance
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
min	Minute
miRNA	Mikro RNA
MIG	pMSCV-IHRES-eGFP
MRD	Eng. Minimal residual disease
mRNA	Messenger RNA
MRP	Eng. Multidrug-resistance protein
n	Menge
N	Nukleotid
NaBH ₄	Natriumborhydrid
NCBI	Eng. National Center for Biotechnology Information
NPM1	Nucleophosmin
n.s.	nicht signifikant
NTP	Nucleotide triphosphate
PAGE	Eng. Polyacrylamide gel electrophoresis
Par-4	Eng. Prostate apoptosis response 4
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Eng. Roswell Park Memorial Institute
RNA	Ribonukleinsäure
RNR	Ribonukleotid Reduktase
RUNX1	Eng. Runt-related transcription factor 1
SDS	Sodium dodecyl sulfat
Std.	Stunde

SZT	Stammzelltransplantation
Tab.	Tabelle
TBS	Eng. Tris-buffered saline
Tet	Eng. Ten-eleven translocase 5-mC Decarboxylase
TPA	Tetradecanoylphorbol-acetat
U	Unit
UCK	Uridin-Cytidin-Kinase
V	Volt
VAF	Eng. Variant allele frequency
vs.	Versus
WHO	Eng. World Health Organization
Wt1	Wilms' Tumor Gen 1
ZF	Zinkfinger

7.1 Tabellen

Tabelle 1: Klassifikation der AML.	1
Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien.....	18
Tabelle 3: Puffer und Lösungen.....	20
Tabelle 4: Zytokine, Chemotherapeutika und Inhibitoren	21
Tabelle 5: Antikörper	22
Tabelle 6: Plasmide	22
Tabelle 7: Sequenzierprimer	23
Tabelle 8: Mutageneseprimer.....	23
Tabelle 9: Kits	24
Tabelle 10: Geräte	24
Tabelle 11: Verbrauchsmaterialien	26
Tabelle 12: Programme	27
Tabelle 13: Zelllinien	28
Tabelle 14: Wt1 Transkriptvarianten.	53
Tabelle 15: Mutationen in leukämischen Zelllinien (Auswahl).....	54

7.2 Abbildungen

Abbildung 1: Mutationen in der AML.	3
Abbildung 2: Transport, intrazellulärer Metabolismus und Wirkungsweisen von HMA. 9	
Abbildung 3: Graphische Darstellung der Wt1-Isoformen.	13
Abbildung 4: Die Auswirkungen von Mutationen im IDH1/2-Tet-2-Wt1-Signalweg. ..	16
Abbildung 5: MEM-Medium führt zur Resistenz gegen HMA.	40
Abbildung 6: Zusatz von Nukleotiden führt zur Resistenz gegen HMA.	42
Abbildung 7: Leukämische Zelllinien zeigen unterschiedliche Sensitivität für HMA. ..	44
Abbildung 8: Resistenz leukämischer Zelllinien gegen HMA.....	45
Abbildung 9: Keine Korrelation der IC ₅₀ -Werte für Aza und Dec.	45
Abbildung 10: Die Wirkung von HMA auf die DNA leukämischer Zellen.	47

Abbildung 11: Die Wirkung von HMA auf die RNA leukämischer Zellen.	48
Abbildung 12: Die Wirkung von HMA auf die DNA leukämischer Zellen unterschiedlicher Sensitivität für HMA.	50
Abbildung 13: Die Wirkung von Aza auf die RNA leukämischer Zellen unterschiedlicher Sensitivität für HMA.	51
Abbildung 14: Wt1-Mutationen im AML Rezidiv.	53
Abbildung 15: Wt1-Mutationen in leukämischen Zelllinien.	55
Abbildung 16: Endogene Wt1-Expression in leukämischen Zelllinien.	57
Abbildung 17: Zusammenhang der endogenen Wt1-Expression bzw. der Wt1- Mutationen mit der Sensitivität für HMA.	59
Abbildung 18: Wt1-Konstrukte.	60
Abbildung 19: Wt1-Proteinexpression in verschiedenen zellulären Systemen.	62
Abbildung 20: Kein Effekt des MG-132 Proteasomeninhibitors.	63
Abbildung 21: Keine proliferative Wirkung der Wt1-Konstrukte.	64
Abbildung 22: Kein Effekt der Konstrukte auf die epigenetische Markierung.	65
Abbildung 23: Expression der Wt1-Isoform A führt zur geringerer Sensitivität für Ara- C.	67
Abbildung 24: Expression der Mutation-R430x sowie der Wt1-Isoform A führt zur geringeren Sensitivität für Dec.	69

7.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Karsten Spiekermann unter dessen herausragender Betreuung sowie stetiger Unterstützung ich promovieren durfte.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Carell und seiner Arbeitsgruppe die durch ihre analytische Methode diese Arbeit ermöglichten. Insbesondere möchte ich dabei meiner Kooperationspartnerin Sarah Schiffers für die kollegiale Zusammenarbeit danken.

Ich bedanke mich zudem bei Dr. Harald Polzer für die geduldige Unterweisung in zahlreichen Methoden sowie für das Heranführen an gutes wissenschaftliches Arbeiten.

Darüber hinaus möchte ich mich bei dem Graduiertenprogramm der Integrated Research Training Group (IRTG) der LMU und insbesondere bei Dr. Elizabeth Schroeder-Reiter für die Unterstützung bei meinem Promotionsvorhaben und die tollen Fortbildungen bedanken.

Ferner möchte ich meinen Laborkollegen Sophie Stief, Julia Kempf, Belay Tizazu, Raphael Mattes, Sven Cuntz, Anna Vetter und Sabrina Weser für die Unterstützung und die freundschaftliche Zusammenarbeit danken.

Weiter bin ich meinen Eltern Gudrun und Luigi Bocci sowie meinem Bruder Maurizio Bocci, dankbar, dass sie mich mit Liebe und Zuversicht in jeder Lebenslage unterstützen und mir mein Studium ermöglicht haben.

Ein großes Dankeschön geht außerdem an Karl Wörle, Jonas Gmeiner und Jana von Trott zu Solz für das Korrekturlesen der Arbeit.