

**Aus der**  
**Medizinischen Klinik und Poliklinik III**  
**Klinik der Universität München**

Direktor: Prof. Dr. Dr. Michael von Bergwelt

**Die Rolle des Wilms Tumor 1 Gens in der akuten  
myeloischen Leukämie**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Irmengard Maria Rodler

aus

München

Jahr

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Karsten Spiekermann  
Mitberichterstatter: PD Dr. Hanna-Mari Baldauf  
Prof. Dr. Michael Albert  
Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. univ. Leo Edlinger  
Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann  
Tag der mündlichen Prüfung: 07.12.2023

Die vorliegende Arbeit wurde von März 2018 bis April 2019 in der Abteilung für Experimentelle Leukämie- und Lymphomforschung (ELLF) in der Medizinischen Klinik und Poliklinik III der Ludwig-Maximilians-Universität durchgeführt.

(Direktor: Herr Prof. Dr. Dr. Michael von Bergwelt)

Die Arbeit wurde betreut durch Herrn Prof. Dr. Karsten Spiekermann und mitbetreut von Herrn Dr. med. univ. Leo Edlinger.

Förderung:

Die vorliegende Arbeit wurde durch die Integrated Research Training Group (IRTG); SFB 1243: Genetic und Epigenetic Evolution of Hematopoietic Neoplasms gefördert.

meinem lieben Bruder  
voll Dankbarkeit und Bewunderung

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>5</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>7</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>8</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>9</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>10</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>12</b>
1.1 Die akute myeloische Leukämie (AML) .....	12
1.2 Aktueller Stand der Forschung: Mutationen in der AML .....	16
1.3 Die Rolle von WT1 in der AML .....	18
1.3.1 WT1 Struktur und Funktion .....	18
1.3.2 Die Funktion von WT1 in der Tumorgenese .....	19
1.3.3 WT1 Gen Mutationen in der AML .....	20
1.3.4 WT1 Interaktionspartner .....	24
1.3.5 Fragestellung .....	27
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>28</b>
2.1 Material .....	28
2.1.1 Plasmide .....	28
2.1.2 Oligonukleotide, Primer .....	28
2.1.3 Zelllinien .....	30
2.1.4 Bakterien .....	30
2.1.5 Antikörper .....	31
2.1.6 Medien, Puffer und Lösungen .....	31
2.1.7 Chemikalien, Enzyme, Inhibitoren und Zytokine .....	33
2.1.8 Enzyme, Inhibitoren, Zytokine und Antibiotika .....	35
2.1.9 Kitsysteme .....	36
2.1.10 Laborgeräte und Verbrauchsmaterial .....	36
2.2 Methoden .....	38
2.2.1 Molekularbiologische Methoden .....	38
2.2.1.1 chemische Transformation .....	38
2.2.1.2 Präparation von Plasmid-Desoxyribonukleinsäure (DNA) .....	38
2.2.1.3 Restriktionsverdau von DNA zur Validierung .....	39
2.2.1.4 Elektrophoretische DNA-Auftrennung .....	39
2.2.1.5 Sequenzierung der Template-DNA .....	40
2.2.1.6 Ortsspezifische Mutagenese .....	40
2.2.1.7 In-Fusion Klonierung von WT1 in PiggyBac Vektor .....	42
2.2.1.8 Herstellung von WT1 <sup>-/-</sup> Klonen durch Clustered Regularly-Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR associated protein 9 (CRISPR/Cas9) .....	45
2.2.1.9 Genom DNA-Isolation aus K562 und Hek293T Zellen .....	49
2.2.1.10 PCR-Screening von gDNA .....	49
2.2.2 Zellbiologische Methoden .....	51
2.2.2.1 Zellkulturbedingungen .....	51
2.2.2.2 Kultur von adhärennten Zellen .....	51
2.2.2.3 Kultur von Suspensionszellen .....	51
2.2.2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	51
2.2.2.5 Zell-Test auf Mykoplasmen und Behandlung .....	52
2.2.2.6 Bestimmung der Lebendzellzahl .....	52
2.2.2.7 Transfektion von Zellen .....	53
2.2.2.8 Facs Single Cell Sorting .....	54
2.2.2.9 Zell-Viabilitäts-Assays unter Chemotherapeutika Behandlung .....	55
2.2.3 Proteinchemische Methoden .....	55
2.2.3.1 Herstellung von Zell-Lysat .....	55
2.2.3.2 Messung der Proteinkonzentration nach Bradford .....	56
2.2.3.3 Immunpräzipitation .....	56
2.2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	57
2.2.3.5 Westernblot .....	58
2.2.4 Statistische Auswertung .....	60
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>61</b>

# Inhaltsverzeichnis

---

3.1	Funktionelle Charakterisierung von WT1 im Zellmodell .....	61
3.1.1	Etablierung von K562 WT1 Knockout Zellen.....	63
3.1.2	Die Viabilität von K562 WT1 <sup>wt</sup> Zellen versus K562 WT1 <sup>-/-</sup> Zellen .....	64
3.1.2.1	Viabilität von K562 WT1 <sup>wt</sup> versus K562 WT1 <sup>-/-</sup> Zellen unter Behandlung mit Cytarabin ..	65
3.1.2.2	Viabilität von K562 WT1 <sup>wt</sup> versus K562 WT1 <sup>-/-</sup> Zellen unter Behandlung mit Daunorubicin	66
3.1.2.3	Viabilität von K562 WT1 <sup>wt</sup> versus K562 WT1 <sup>-/-</sup> Zellen unter Behandlung mit Decitabin ..	67
3.1.3	Einfluss von WT1 Mutationen auf die Viabilität von K562 Zellen im Doxycyclin induzierbaren System	69
3.1.3.1	Einfluss von Doxycyclin auf die Expression von WT1 und die Viabilität von K562 Zellen	70
3.1.3.2	Viabilität von K562 Zellen (PB/WT1 <sup>wt</sup> , PB/WT1 <sup>mut</sup> , WT1 <sup>-/-</sup> ) unter Behandlung mit Cytarabin (Ara-C)	72
3.1.3.3	Viabilität der K562 Zellen (PB/WT1 <sup>wt</sup> , PB/WT1 <sup>mut</sup> , WT1 <sup>-/-</sup> ) unter Decitabin Behandlung.	74
3.2	Charakterisierung von WT1-Proteininteraktionen .....	78
3.2.1	Grundlagen der Interaktion von WT1 Wildtyp und WT1 Mutationen mit Interaktionspartnern ...	78
3.2.2	Immunpräzipitation von WT1 Wildtyp und WT1 Mutationen mit Interaktionspartnern.....	79
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>83</b>
4.1	Sensitivität gegenüber Standardchemotherapie im K562 WT1 Knockout Modell .....	84
4.1.1	Vergleich der Behandlungsschemata im Zellmodell und am Patienten .....	85
4.1.2	Einfluss von Genetic Engineering auf Versuchsbedingungen und Outcome im Zellmodell .....	87
4.1.3	Limitationen des Zellmodells .....	87
4.2	Bedeutung von WT1 Wildtyp und WT1 Mutationen unter Standardchemotherapie im Re-expressionsmodell.....	89
4.2.1	Kontroverse Studienlage im Hinblick auf WT1 Mutationen und Therapieansprechen .....	89
4.2.2	Induktion von Chemotherapie-Resistenz durch WT1 Mutationen R430X und D464G im Zellmodell	91
4.2.3	Limitationen des induzierbaren Re-expressionsmodells in K562 Zellen.....	92
4.3	Einfluss von WT1 Mutationen auf Proteininteraktionen .....	94
4.3.1	Interaktion von TP53 und WT1 führt zu Inhibition von Apoptose .....	94
4.3.1	Interaktion von STAT3 und WT1 reguliert Apoptose.....	96
4.3.2	Regulation der DNA-Methylierung durch Interaktion zwischen WT1 und TET2.....	96
4.4	Personalisierte Therapie der AML in Zukunft .....	98
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>100</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>105</b>
	<b>Affidavit.....</b>	<b>106</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>107</b>

# Zusammenfassung

---

Die akut myeloische Leukämie (AML) ist die häufigste Form akuter Leukämien im Erwachsenenalter und wird durch genetische Aberrationen verursacht. Im Rezidiv kann bei 10% der Patienten eine Akquirierung von Wilms Tumor 1 Gen (WT1) Mutationen festgestellt werden. WT1 ist beim Nephroblastom als Tumorsuppressor bekannt. Loss-of-Function-Mutationen im Sinne eines Tumorsuppressorgens können zur Resistenzbildung in der AML beitragen. WT1 Mutationen bei AML-Patienten zeigen eine ungünstigere Prognose in Form eines schlechteren klinischen Outcomes bedingt durch ein vermehrtes Auftreten von Rezidiven. Eine Zunahme von WT1 Mutationen im Rezidiv weist daraufhin, dass WT1 eine Rolle bei der Induktion von Resistenzen in der AML spielt. Wir wollen in der vorliegenden Arbeit den Einfluss von WT1 auf Therapieresistenzen in der AML in Modellsystemen untersuchen.

Zur Untersuchung der Rolle von WT1 in der AML haben wir zum einen ein WT1 Knockout Zell-Modell und zum anderen ein Re-expressions-Zell-Modell entwickelt. Mit Hilfe von CRISPR/Cas9 konnte zunächst ein Gen-Knockout von WT1 in K562 Zellen eingeführt werden. Anschließend wurde mittels PiggyBac (PB) Vektorsystems WT1 Wildtyp oder WT1 Mutanten (R430X, D464G) in K562 WT1 Knockout-Zellen re-exprimiert. Anhand von Viabilitäts-Assays wurden Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt. Die Interaktionsfähigkeit von WT1 und WT1 Mutanten mit wichtigen Proteinpartnern (TP53, TET2 und STAT3) wurde in einer Immunpräzipitation (IP) untersucht.

Im Knockout-Modell konnte kein Unterschied in der Viabilität von WT1 Wildtyp versus WT1 Knockout unter Behandlung mit den Chemotherapeutika Cytarabin (Ara-C), Daunorubicin und Decitabin gezeigt werden. Ebenso führte die Re-expression von WT1 Wildtyp im Vergleich zu WT1 Knockout zu keinem signifikanten Unterschied der Dosis-Wirkungs-Kurven. Bei der Re-expression von WT1 Mutanten versus WT1 Knockout wurde ein signifikanter Unterschied in der Viabilität unter Ara-C und Decitabin Behandlung festgestellt. Eine Interaktion von WT1 Wildtyp und den WT1 Mutationen mit den Interaktionspartnern TP53, TET2 und STAT3 konnte in der IP nachgewiesen werden.

Im Zellmodell konnten wir unter bestimmten Dosierungen von Ara-C und Decitabin ein besseres Überleben von Zellen mit WT1 Mutationen im Vergleich zum Knockout von WT1 zeigen. Diese Daten weisen darauf hin, dass WT1 ein Resistenzfaktor in der klonalen Evolution der AML darstellt und als therapeutische Zielstruktur bei Patienten mit resistenter Erkrankung geeignet sein könnte.

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 1 WT1 und die Isoformen A, B, C, D .....	18
Abbildung 2 Mutationen von WT1 in Patienten Kohorte. ....	21
Abbildung 3 WT1 Struktur und WT1 Mutationen. ....	22
Abbildung 4 TET2 und WT1 Interaktion. ....	26
Abbildung 5 RNA-Seq Daten: Leukämie Zelllinien und WT1 Expression (AG Spiekermann, LMU). ....	62
Abbildung 6 Sequenzierung der K562 WT1 <sup>wt</sup> und WT1 <sup>-/-</sup> Klone. ....	63
Abbildung 7 Westernblot WT1 Expression in K562 Zellen nach CRISPR/Cas9 (AG Spiekermann, LMU). ....	63
Abbildung 8 Viabilität von K562 WT1 <sup>wt</sup> und WT1 <sup>-/-</sup> Klonen (n=3). ....	64
Abbildung 9 IC50 Werte von K562 WT1 <sup>wt</sup> und WT1 <sup>-/-</sup> Klonen unter Ara-C Behandlung (n=3). ....	66
Abbildung 10 Wachstum von K562 WT1 <sup>wt</sup> und WT1 <sup>-/-</sup> Klonen unter Daunorubicin Behandlung (n=2). ....	67
Abbildung 11 Viabilität von K562 WT1 <sup>wt</sup> und WT1 <sup>-/-</sup> Klonen unter Decitabin Behandlung nach 72 h (n =3). ....	68
Abbildung 12 pMIG-WT1-wt (Iso D) full length (1 <sup>st</sup> ATG) und pMIG-WT1-wt (2 <sup>nd</sup> ATG). ....	70
Abbildung 13 Westernblot von PB/WT1 <sup>mut</sup> in K562 WT1 <sup>-/-</sup> Zellen. ....	71
Abbildung 14 Viabilität der K562 PB/WT1 <sup>wt</sup> , PB/WT1 <sup>mut</sup> und WT1 <sup>-/-</sup> (n=6). ....	72
Abbildung 15 Viabilität von K562 PB/WT1 <sup>wt</sup> , PB/WT1 <sup>-/-</sup> und PB/WT1 <sup>mut</sup> unter Ara-C Behandlung (n=3). ....	73
Abbildung 16 IC50 Werte der K562 PB/WT1 <sup>wt</sup> , PB/WT1 <sup>mut</sup> und WT1 <sup>-/-</sup> Zellen unter Cytarabin Behandlung (n=3). ....	74
Abbildung 17 Viabilität von K562 PB/WT1 <sup>wt</sup> , K562 PB/WT1 <sup>mut</sup> und WT1 <sup>-/-</sup> unter Decitabin Behandlung (n=3). ....	76
Abbildung 18 IC50 Werte von K562 PB/WT1 <sup>wt</sup> , K562 PB/WT1 <sup>mut</sup> und WT1 <sup>-/-</sup> unter Decitabin Behandlung (n=3). ....	77
Abbildung 19 WT1 Struktur und Interaktion mit Proteinen. ....	78
Abbildung 20 Immunpräzipitation von FLAG-WT1, Westernblotting gegen TP53. ....	80
Abbildung 21 Immunpräzipitation von FLAG-WT1, Westernblotting gegen Stat3. ....	80
Abbildung 22 Immunpräzipitation von FLAG-WT1, Westernblotting gegen TET2. ....	81
Abbildung 23 IP mit FLAG-WT1, Westernblotting gegen WT1. ....	82
Abbildung 24 TP53 und WT1 Interaktion. ....	95
Abbildung 25 STAT3 und WT1 Interaktion. ....	96



# Tabellensverzeichnis

---

Tabelle 1 AML-Klassifikation nach WHO-Kriterien 2017 (2) .....	12
Tabelle 2 AML-Klassifikation in Risikogruppen gemäß European LeukemiaNet 2017 (ELN) (3) .....	12
Tabelle 3 Zytostatika .....	14
Tabelle 4 Übersicht über mutierte Tumorsuppressorgene in AML.....	16
Tabelle 5 Größe der WT1 Mutanten.....	22
Tabelle 6 Plasmide .....	28
Tabelle 7 Verwendete Oligonukleotide.....	28
Tabelle 8 Verwendete Zelllinien .....	30
Tabelle 9 Verwendete Bakterien .....	30
Tabelle 10 Verwendete Antikörper .....	31
Tabelle 11 Medien, Puffer und Lösungen .....	31
Tabelle 12 Verwendete Chemikalien .....	33
Tabelle 13 Verwendete Enzyme.....	35
Tabelle 14 Inhibitoren/ Medikamente .....	35
Tabelle 15 Verwendete Antibiotika.....	35
Tabelle 16 Verwendete Kitsysteme.....	36
Tabelle 17 Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	36
Tabelle 18 Größe der Isoform D und der WT1 Mutanten.....	78

## Abkürzungsverzeichnis

---

5caC	5-Carboxylcytosin
5fC	5-Formylcytosin
5hmC	5-Hydroxymethylcytosin
5mC	5-Methylcytosin
AA	Aminosäure
ADP	Adenosindiphosphat
AML	Akut myeloische Leukämie
Ara-C	Cytarabin
ATP	Adenosintriphosphate
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
BM	Bone marrow
bp	Basenpaar
C	Celsius
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cDNA	Complementary DNA
CEBPA	CCAAT/enhancer-binding protein alpha
CIR	Cumulative incidence of relapse
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CN-AML	Cytogenetically normal-AML
CR	Complete remission
CR-Rate	Complete remission-Rate
CRISPR/Cas9	Clustered Regularly-Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR associated protein 9
D	Deutschland
Dec	Decitabin
DFS	Disease free survival
DGHO	Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V.
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT3	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3
Dox	Doxycyclin
DSB	Doppelstrangbruch
dsDNA	Doppelsträngige-DNA
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
Dx	Diagnose
Eppi	Eppendorf Tube
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FKS	Fötales Kälberserum
FLT3-ITD	Fms-like tyrosine kinase 3-interne Tandemduplikation
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA	Genomische DNA
GFP	Green fluorescent protein
GOF	Gain-of-Function-Mutation
GOI	Given gen of interest
gRNA	Guide RNA
h	Stunde
IDH2	Isocitrate dehydrogenase
IP	Immunpräzipitation

## Abkürzungsverzeichnis

---

IsoD	Isoform D
JAKs	Januskinasen
kbp	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
KTS	Leucin, Threonin, Serin
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
mA	Milliampere
MDS	Myelodysplastisches syndrome
MEG3	Maternally expressed 3
MIN	Multifunctional integrase
ml	Milliliter
MRD	Minimal residual disease
mRNA	Messenger-RNA
mV	Millivolt
ng	Nanogramm
NGS	Next Generation Sequenzing
NHEJ	Non-homologous end-joining
nM	Nanomol
OS	Overall survival
PB	Piggybac
PB/WT1 <sup>-Dox</sup>	PB/WT1 ohne Zugabe von Doxycyclin
PB/WT1 <sup>+Dox</sup>	PB/WT1 mit Zugabe von Doxycyclin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI	Propidium iodide
RD	Refractory disease
Rel-CT	Relapse after Chemotherapy
Rel-SCT	Relapse after Stammzelltransplantation
RNA	Ribonukleinsäure
RNA-Seq	RNA-Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung
rpm	Runde pro Minute
SDS	Sodium dodecyl sulfate
ssDNA	Single-stranded DNA
Stat3	Signal transducer and activator of transcripton 3
Tet2	Ten-eleven translocation 2
TC	Tissue culture-treated
UV-Licht	Ultraviolett-Licht
VAF	Variant allele frequency
WHO	World Health Organization
WT1	Wilms Tumor 1 Gen
WT1 <sup>-/-</sup>	WT1 Knockout
WT1 <sup>mut</sup>	WT1 Mutation
WT1 <sup>wt</sup>	WT1 Wildtyp
Zn	Zinkfinger
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol

# 1 Einleitung

---

## 1.1 Akute myeloische Leukämie (AML)

Bei der akuten myeloischen Leukämie handelt es sich um eine Neoplasie der Myelopoese. Die Inzidenz der Erkrankung steigt mit dem Alter. Es kommt dabei zu einer pathologischen klonalen Proliferation von unreifen myeloischen Zellen. Im Verlauf der Erkrankung wird durch Proliferation von myeloischen Zellen, die zumeist dem hochproliferativen Progenitorpool (CD34+/CD38+) bzw. dem Stammzellpool (CD34+/CD38-) entstammen, die normale Hämatopoese verdrängt. Dadurch wird eine Zytopenie in allen hämatopoetischen Zelllinien verursacht. Diese führt wiederum zur Ausbildung der typischen Symptome. Hierunter fallen Symptome verursacht durch Granulozytopenie (Infektionen und Sepsis), Thrombozytopenie (Blutungen) und Anämie (Dyspnoe und Leistungsminderung) (1).

Die AML wird durch die Klassifikation der World Health Organization (WHO) aufgrund von klinischen, zytomorphologischen, zytogenetischen und molekulargenetischen Charakteristika eingeteilt (2) und durch die Klassifikation der European LeukemiaNet (ELN) in molekularzytogenetische Risikogruppen aufgegliedert (3).

**Tabelle 1 AML-Klassifikation nach WHO-Kriterien 2017 (2)**

WHO-Klassifikation von AML Subtypen
AML mit rekurrenten genetischen Veränderungen
AML mit myelodysplasie-assoziierten Veränderungen (AML-MRC)
Therapie-assoziiertemyeloische Neoplasie
AML, nicht näher spezifiziert (AML-NOS)
Myelosarkom
Down-Syndrom assoziierte AML
Blastische plasmazytoische dendritische Zellneoplasien

**Tabelle 2 AML-Klassifikation in Risikogruppen gemäß European LeukemiaNet 2017 (ELN) (3)**

ELN-Risikogruppe	Aberrationen
Günstig	t(8;21) (q22;q22); RUNX1-RUNX1T1 inv (16)(p13.1;q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11 Mutiertes NPM1 ohne FLT3-ITD oder mit FLT3-ITD <sup>niedrig</sup> Biallelisch mutiertes CEBPA
Intermediär	Mutiertes NPM1 mit FLT3-ITD <sup>hoch</sup>

## Einleitung

	Wildtyp-NPM1 ohne FLT3-ITD oder mit FLT3-ITD <sup>niedrig</sup> (ohne ungünstige genetische Aberrationen) t(9;11) (p22;q23); MLLT3-KMT2A Zytogenetische Aberrationen, die nicht als günstig oder ungünstig eingestuft wurden
Ungünstig	t(6;9) (p23;q34); DEK-NUP214 t(v;11) (v;q23); KMT2A-Genumlagerung t(9;22) (q34.1;q11.2); BCR-ABL1 inv (3)(q21q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); GATA2, MECOM (EVII) -5 oder del(5q); -7; -17/abnl(17p) komplexer Karyotyp ( $\geq 3$ Aberrationen) monosomaler Karyotyp (eine Monosomie, assoziiert mit mindestens einer weiteren Monosomie oder einer anderen strukturellen, chromosomalen Aberration (außer CBF-AML)) Wildtyp-NPM1 mit FLT3-ITD <sup>hoch</sup> Mutiertes RUNX1* Mutiertes ASXL1* Mutiertes TP53

### Legende

\* nur als ungünstig einzustufen, wenn keine als günstig eingestuften Aberrationen vorliegen

Infolge der Blasteninfiltration im Knochenmark wird das Krankheitsbild durch die zunehmende Insuffizienz des Knochenmarks geprägt. Eine AML wird bei einem Blastenanteil von >20% im peripheren Blut oder Knochenmark diagnostiziert bzw. beim Nachweis der AML-definierenden genetischen Aberrationen gemäß AML-Klassifikation nach WHO-Kriterien. Zusätzlich können noch weitere diagnostische Schritte eingeleitet werden wie beispielsweise eine Immunphänotypisierung, Zytogenetik und Molekulargenetik (2). Das Therapieziel ist immer auf eine komplette Remission ausgerichtet, wobei das Erreichen der kompletten Remission nach Induktionstherapie neben dem Alter der Patienten vor allem vom genetischen Risikoprofil der AML abhängig ist. Dabei kann die Remissionsrate zwischen >80-90% und <30% schwanken (1). Hieraus resultiert die Bedeutung der genetischen Untersuchung der Patientenproben. Die 5-Jahres Überlebensrate von AML-Patienten wird im National Cancer Institute Surveillance, Epidemiologie, and End Results Program (SEER) in Daten von 2000-2018 erfasst. Patienten im Alter von <20 Jahren zeigen eine 5-Jahres Überlebensrate von 64.5%, während sie mit zunehmendem Alter sinkt. Zwischen 40 und 64 Jahren beträgt die overall survival (OS)-Rate bereits nur 35.8% und zwischen 65 und 74 Jahren nur noch 13% (4). Das Überleben wird heute zunehmend anhand von genetisch definierten Untergruppen erfasst, wobei weiterhin prognostisch ungünstige Untergruppen mit höherem Alter assoziiert werden

## Einleitung

(5). Des Weiteren steigt mit zunehmendem Alter das Rezidivrisiko, wobei es zu einem Anstieg der Blasten im Knochenmark auf  $\geq 5\%$  kommt oder Blasten im peripheren Blut gefunden werden, die nicht mit der reaktiven Blutbildung beantwortbar sind. Die Therapie der AML in Deutschland folgt den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V. (DGHO). Zunächst wird mit einer Induktionstherapie gestartet mit dem Ziel der kompletten Remission und anschließend wird eine Konsolidierungstherapie durchgeführt zur Erhaltung der kompletten Remission. Die Standard-Induktionstherapie (3+7 Schema) der AML beinhaltet die Kombination aus der dreitägigen Gabe eines Anthrazyklins/Anthrachinons (z. B. Daunorubicin 60 mg/m<sup>2</sup>, Idarubicin 10-12 mg/m<sup>2</sup>, oder Mitoxantron 10-12 mg/m<sup>2</sup>) und einer siebentägigen Gabe von Cytarabin (100-200 mg/m<sup>2</sup> kontinuierlich) (1). Für die Konsolidierungstherapie werden hochdosiertes Cytarabin und eine allogene Blutstammzelltransplantation verwendet. Die Therapie wird heute bei definierten WHO-Subgruppen durch zielgerichtete Therapien ergänzt bzw. ersetzt wie beispielsweise durch die Gabe von Midostaurin oder CPX-351 (liposomale Formulierung von Cytarabin und Daunorubicin), wodurch das Rezidivrisiko gesenkt werden soll (1). Die Therapieselektion ist dabei abhängig von der ELN-Klassifikation. Weitere Faktoren, die eine Rolle bei der Therapiegestaltung spielen, sind unter anderem das Alter, Komorbiditäten, Zyto- und Molekulargenetik.

**Tabelle 3 Zytostatika**

Zytostatikum	Funktion		Literatur
Cytarabin (Ara-C)	Antimetabolit, Pyrimidinantagonist	Störung der DNA-Replikation →Beeinträchtigung von Struktur und Funktion der DNA	(6)
Daunorubicin	zytotoxisches Anthrazyklin	Interkalation in den DNA-Strang, durch Hemmung der Topoisomerase II und dadurch Störung der DNA-Synthese, Proteinsynthese und Zellteilung	(7)
Decitabin	Einsatz bei erwachsenen Patienten mit neu diagnostizierter de novo/ sekundärer AML, bei nicht in Frage kommen einer Standard-Induktionstherapie, hochrisiko MDS	Selektive Hemmung von DNA-Methyltransferasen → Gen-Promoter-Hypomethylierung → zuletzt Reaktivierung von Tumorsuppressor-genen und Apoptose Induktion der Leukämiezelle	(8)

Es gibt unterschiedliche prognostische Faktoren, die den Krankheitsverlauf beeinflussen. Je besser man prognostische Faktoren und ihren Einfluss auf AML kennt, desto besser können

## **Einleitung**

---

Therapien adjustiert und personalisiert werden sowie neue Therapiemethoden entwickelt werden. In der Forschung wird hier auf vielen Gebieten gearbeitet. Besonders durch das Next Generation Sequencing (NGS) wurden neue Möglichkeiten für die Erforschung von Einflussfaktoren gefunden. Indem man die häufigsten Mutationen in der AML erfasst, kann man so neue therapy targets finden und neue Strategien entwickeln.

### 1.2 Aktueller Stand der Forschung: Mutationen in der AML

Die Pathogenese der AML wird stark durch die Komplexität und Dynamik der genomischen Instabilität beeinflusst. Mit Hilfe des Next Generation Sequencing (NGS) wurden die Möglichkeiten in der diagnostischen Forschung der AML revolutioniert. Man ist nun in der Lage komplette Mutationsprofile im Rahmen der Initialdiagnostik aus Patientendaten zu erstellen. Diese neuen Erkenntnisse ermöglichen es, neue Angriffspunkte für Therapien zu finden und neue prädiktive Biomarker zu bestimmen. Sie dienen heute schon im Rahmen der Erkennung von minimal residual disease (MRD) zum Einsatz von zielgerichteten Therapien. In vielen Arbeiten wurden die häufigsten Mutationen von Tumorsuppressoren in der AML erforscht und diese werden hier in der Tabelle 4 als Übersicht dargestellt. Diese Mutationen beeinflussen die epigenetische Modifikation von Genen, die DNA-Reparaturdysregulation, die Zell-Zyklus Inhibition und die Differenzierung. Als Konsequenz kann es zu einer Resistenzentwicklung gegen Chemotherapeutika kommen. Zudem stellte sich heraus, dass viele Mutationen in Kombination auftreten und dadurch generell die Rezidivrate und das Gesamtüberleben verschlechtern (9).

**Tabelle 4 Übersicht über mutierte Tumorsuppressorgene in AML**

mutiertes Gen	Häufigkeit in AML [%]	Funktion
IDH1	6-10	Assoziiert mit klonaler Hematopoesis in gesunden älteren Personen
IDH2 <sup>R140</sup>	5-15	Assoziiert mit klonaler Hematopoesis in gesunden älteren Personen
IDH2 <sup>R172</sup>	1-4	Assoziiert mit klonaler Hematopoesis in gesunden älteren Personen
DNMT3A	15-30	Prognostischer Impakt ist nicht konsistent und Kontext- abhängig
TET2	12-34	Assoziiert mit klonaler Hematopoesis in gesunden älteren Personen
WT1	6-15	Überexprimiert in AML, Überexpression korreliert mit Chemotherapie Resistenz, Reduktion des Gesamtüberlebens und höheren Rezidivraten.
ASXL1	5-18	Assoziiert mit ungünstiger Prognose, kürzerem Gesamtüberleben und höherem Regressionsrisiko
NPM1	25-30	Gute Reaktion auf konventionelle Chemotherapie; klassifiziert als günstiges Risiko; hohe komplette Remissionsrate, event-free survival (EFS) und Gesamtüberleben



## Einleitung

---

CEBPA	5-20	Assoziiert mit einer günstigeren Prognose
TP53	5-20	Mutationen assoziiert mit Fehlen von klinischer Remission, schlechtem Gesamtüberleben und disease free survival (DFS)

Tabelle 4: Modifiziert nach (9).

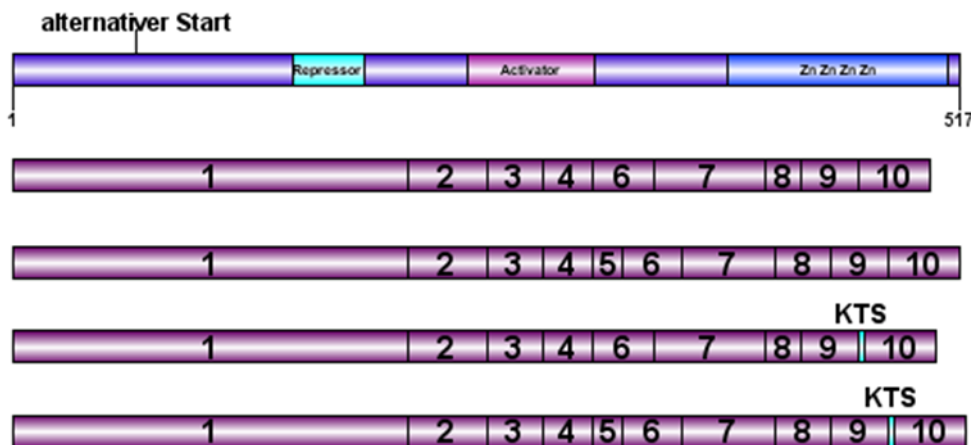
Um den Mechanismus von Therapieresistenzen und Krankheitsprogression zu verstehen, wurde eine Analyse von 50 Patienten mit cytogenetically normal-AML (CN-AML) aus den Daten der AMLCG-99 Studie (NCT00266136) und der AMLCG-2008 Studie (NCT01382147) der Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) (10) untersucht. AML mit normalem Karyotyp beschreibt eine Form der AML, bei der es nicht zu chromosomalen Anomalien kommt (11). Die Patientendaten stammen aus der Abteilung der Medizinischen Klinik III des Universitätsklinikums der LMU. Es wurden aus den Patientendaten Mutationsprofile zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und zum Zeitpunkt von Remission und Rezidiv erstellt. Die Mehrheit der AML-Patienten im Rezidiv zeigten im Vergleich zur Erstdiagnose ein verändertes Mutationsprofil. Insgesamt gingen 67 Mutationen, die bei Erstdiagnose erfasst wurden, im Rezidiv verloren, während 104 Mutationen im Krankheitsverlauf bis zum Rezidiv hinzu kamen (10). Darunter fällt auch das Wilms-Tumor 1 Gen (WT1), welches in 10% der Patienten im Rezidiv neu mutiert auftrat. Ediriwickrema et al. sprechen von einer Heterogenität im AML Rezidiv. Sie berichten von verschiedenartigen Mustern der klonalen Evolution, welche das Rezidiv zurückführen auf einen bereits bei Diagnose existenten predominantem Klon, einen bei Diagnose vorhanden Subklon oder weitere klonale Evolution. So fanden Sie unter anderem einen Klon, welcher sich von NPM1/PTPN1 1 bei Diagnose zu einem Klon mit NPM1 und WT1 entwickelte. Ein komplexes Mutationsprofil bei Diagnose wurde mit einer schlechten Prognose verbunden (12).

## 1.3 Die Rolle von WT1 in der AML

WT1 ist ein Gen, welches zuletzt in der AML (siehe Kapitel 1.2) die Aufmerksamkeit auf sich gezogen hat, da WT1 hier eine kontroverse Rolle spielt. WT1 wird zum einen in 75-100% der AML-Patienten überexprimiert, zum anderen ist WT1 aber auch in 10% der Fälle mutiert (13).

### 1.3.1 WT1 Struktur und Funktion

WT1 befindet sich auf dem Chromosom 11p13 und ist circa 50 Kilobasenpaare (kb) groß. Dabei setzt sich WT1 aus einer Aktivator- und Repressor-Domäne, einer Domäne mit vier Zinkfingern (Zn) und einer RNA-Bindungs-Domäne zusammen. Die Zinkfinger-Domäne ist entscheidend für die DNA-Bindungsfähigkeit, ebenfalls enthält die Zinkfinger-Domäne eine Kernlokalisierungs-Sequenz und Bindungsdomänen für Proteininteraktionen, welche die WT1-Funktion regulieren. WT1 kann in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor zur Aktivierung oder Repression von verschiedenen Zielgenen führen (siehe Kapitel 1.3.2). WT1 codiert für Proteine aus 10 Exonen und kann durch alternatives Splicing, mRNA editing und alternative Translations Initiation in etwa 36 Isoformen unterteilt werden. Dabei variieren die vier am besten beschriebenen und am häufigsten vorgefundenen Isoformen durch das Vorhandensein oder die Abwesenheit des sogenannten 17AA Inserts (17 Aminosäuren im Exon 5 gelegen) und des KTS-Inserts (Vorkommen von 3 Aminosäuren im Exon 9: Leucin, Threonin, Serin) wie in Abbildung 1 dargestellt. Die Isoformen werden als Isoform A (502aa = 55.72 kDa), B (519aa = 75.6 kDa), C (505aa = 56.06 kDa), und D (522aa = 57.94 kDa) benannt.



**Abbildung 1 WT1 und die Isoformen A, B, C, D**

Die Translation ab dem alternativen Start Codon ergibt ein Protein, das 68 Aminosäuren kürzer ist. Isoform D (NM\_024426.4 (NCBI, Origen)) wird mit den wichtigsten Domänen abgebildet (alternativer Start, Repressor-, Aktivator-Domäne, Zinkfinger, Exone 1-10) und ist 5 ASS kürzer am N-terminalen Ende als bei NCBI Origen. Darunter sind Isoform A (-17AA/-KTS); Isoform B (+17AA/-KTS); Isoform C (-17AA/+KTS); Isoform D (+17AA/+KTS) mit ihren Exon Varianten dargestellt. Modifiziert nach Kramarzova et al (14).

Das KTS-Insert liegt zwischen den Zinkfingern und vermindert die Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Bindungsfähigkeit. Das 17AA Insert könnte als Transaktivations-Domäne dienen (14). Die Isoformen weisen dadurch unterschiedliche Funktionen auf, daher ist die Ratio der Isoformen in verschiedenen Tumorerkrankungen vermutlich entscheidend für die Funktion des Gens und den Tumorprogress. Als prognostischer Faktor kann die Isoform Ratio im Moment allerdings noch nicht bei AML im Erwachsenenalter und myelodysplastischen Syndrom (MDS) dienen. Ratio der Isoformen: A : B : C : D = 0.13 : 0.31 : 0.13 : 0.45 (14)). Die Expression der Isoform D ist in AML-Proben im Vergleich zu den anderen Isoformen am stärksten ausgeprägt. Des Weiteren wurde untersucht, dass jene Isoformen, welche das Exon 5 enthalten (Isoform B, D), im Rezidiv häufiger auftreten als bei Erstdiagnose (15). Dies deutet auf einen möglichen Einfluss dieser Isoformen auf den Pathomechanismus, der zum Rezidiv führt, hin.

Die Isoform D des WT1 Gens interessiert uns aufgrund ihres vermehrten Auftretens bei Leukämie Patienten und ihrer strukturellen Besonderheiten mit dem KTS-Insert und der 17 AA im Exon 5. Daher wird in dieser Arbeit die Isoform D (60.39 kDa siehe Tabelle 5) im Zellmodell untersucht.

### 1.3.2 Die Funktion von WT1 in der Tumorgenese

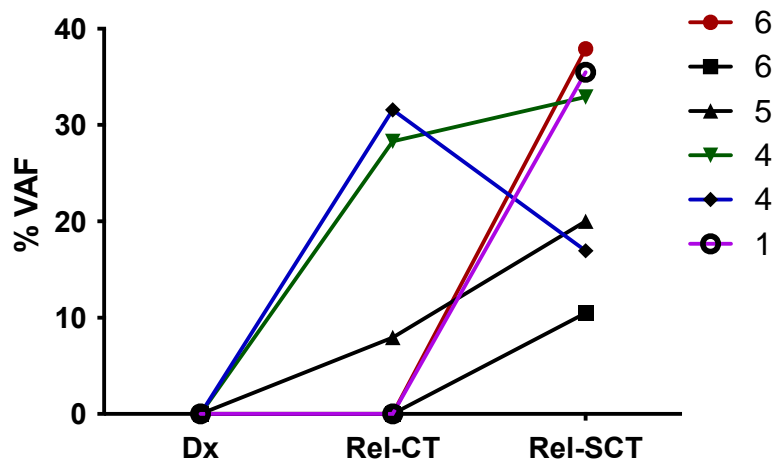
Das WT1 Gen wurde zum ersten Mal im Zusammenhang mit der Erforschung des Wilms Tumors, dem häufigsten bösartigen Nierentumor des Kindesalters, isoliert. Hier wurde bei 10% der Patienten mit Wilms Tumor eine Mutation des Gens festgestellt und WT1 wurde als Tumorsuppressorgen beschrieben. WT1 ist entscheidend für die Entwicklung der Niere, wird aber während der Embryogenese auch in anderen Geweben mit mesodermalem Ursprung exprimiert. Im erwachsenen Gewebe wird WT1 allein in den Podozyten der Niere und in niedrigerer Ausprägung in der Milz, dem Knochenmark, Testis und Ovarien exprimiert (16). In der normalen Hämatopoese wird WT1 in CD34<sup>+</sup> BM-Zellen und CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> Zellen geringfügig exprimiert. In CD34<sup>-</sup> Zellen und Progenitor-Zellen kann WT1 nicht nachgewiesen werden. Anders wird WT1 in geringer Ausprägung in multipotenten Progenitor-Zellen und in 40.5% der murinen leukämischen Zellen exprimiert (17). Um die genaue Bedeutung von WT1 in der Hämatopoese zu ermitteln, hat man WT1 im Zellmodell überexprimiert. Dies führte in CD34<sup>+</sup> Zellen zu einer besseren Differenzierung, während CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> Zellen vermehrt in ein Ruhestadium übertraten. WT1-Knockout Mäuse sind nicht überlebensfähig aufgrund einer vollständigen Agnesie der Niere, der Gonaden, des Herzens und des Zwerchfells. In seiner Funktion als Transkriptionsfaktor kann WT1 verschiedene Zielgene aktivieren oder reprimieren. Dies ist abhängig vom Vorkommen der unterschiedlichen WT1 Isoformen,

posttranskriptionellen Modifikationen und den verschiedenen Bindungspartnern (18). Die Zielgene sind involviert in Organentwicklung, Zellwachstum, Differenzierung, Apoptosis, posttranskriptioneller mRNA und Gen Regulation durch Interaktion mit Spliceosomen. Die Rolle von WT1 in der AML wird weiterhin kontrovers diskutiert. Zum einen wird WT1 überexprimiert, damit wird auf eine Rolle als Onkogen hingewiesen. Zum anderen liegt WT1 gehäuft mutiert vor, was für eine Rolle als Tumorsuppressor spricht. Dabei wird vermutet, dass die Mutation zu einem Funktionsverlust führt. Bisher konnte man nachweisen, dass ein WT1 Verlust in K562 Zellen zur Inhibition des Zellwachstums führt. In diesem Fall würde WT1 als Onkogen wirken. Im AML-Mausmodell konnte eine hohe Expression von WT1 nachgewiesen werden. Aber zugleich muss erwähnt werden, dass eine vermehrte Expression von WT1 in hämatopoetischen Stammzellen nicht zu erhöhter Proliferation und Expansion der Zellen führte (19).

### 1.3.3 WT1 Gen Mutationen in der AML

WT1 ist in 10% der AML-Fälle mutiert und nimmt vermutlich eine wichtige Rolle in der Tumorgenese, im Krankheitsverlauf und im Ansprechen auf Therapien ein. WT1 Mutationen werden desweiteren mit einer schlechteren Prognose und einer Resistenzbildung gegen Chemotherapie (20) assoziiert. Die Mutationen liegen vorwiegend in Exon 1, 7 und 9.

WT1 Mutationen wurden signifikant mit jüngerem Alter assoziiert (21). Virappane et al. haben zudem einen signifikanten Unterschied im Gesamtüberleben von Patienten mit WT1 Mutation und ohne Mutation (26% versus 47%;  $p=0.007$ ) gesehen (20). Außerdem konnte Vosberg et al. bei deiner Auswertung von Patientendaten eine Zunahme von WT1 Mutationen im Rezidiv der AML feststellen (vgl. Abb. 2) (22). Bei Diagnose lag die variant allele frequency (VAF) bei allen vier Patienten bei 0, somit außerhalb des messbaren Bereichs. Zwei aus vier Patienten zeigen bereits eine Zunahme an Mutationen im Vergleich Diagnose und Relapse after Chemotherapy. Alle vier Patienten zeigen eine erhöhte VAF bei Relapse after Stammzelltransplantation, also eine Zunahme der Mutationen im WT1 Gen. Sowohl im Rezidiv nach Chemotherapie als auch nach Stammzelltransplantation liegen mehr Mutationen von WT1 vor. Daraus resultiert ein möglicher Einfluss von WT1 Mutationen auf die Therapie-Resistenz in AML.

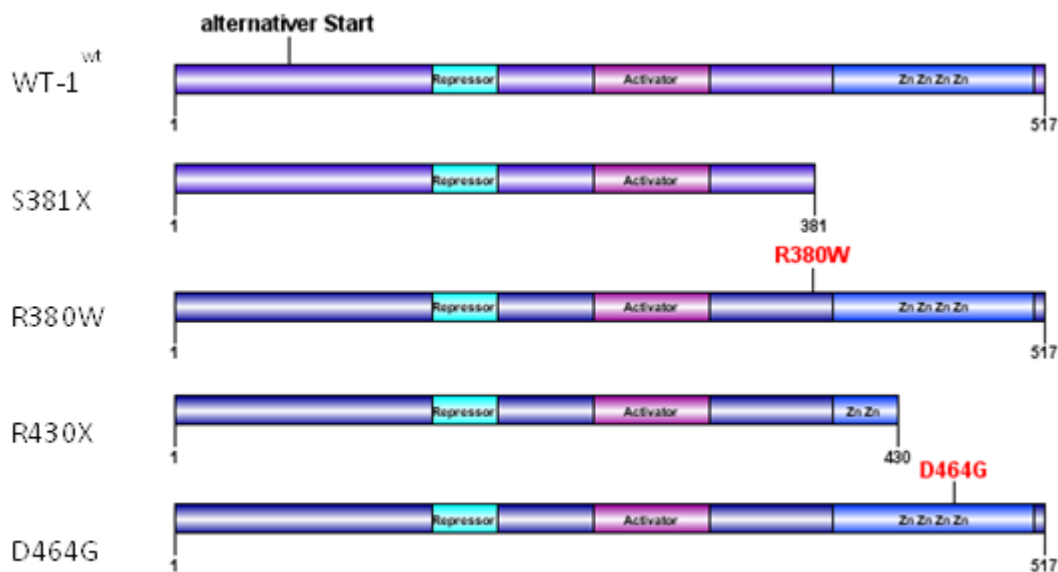


**Abbildung 2 Mutationen von WT1 in Patienten Kohorte.**

Die variant allele frequency (VAF) im WT1 Gen nach Relapse after Chemotherapy (Rel-CT) und nach Relapse after Stammzelltransplantation (Rel-SCT) werden im Vergleich zum Zeitpunkt der Dx dargestellt. Dabei steht jede Zahl für einen Patienten. Die Graphen wurden anhand der Daten aus der Patienten Kohorte der Klinik der LMU erstellt. Modifiziert nach Vosberg et al. (22).

In der CN-AML Patienten Kohorte (AMLCG99 und DTKK Relapse kohorte) wurden insgesamt 14% WT1 Mutationen gefunden (10). Für die vorliegende Arbeit wurden aus der CN-AML Kohorte zwei rezidivspezifische Mutationen (S381X, D464G) und zwei Mutationen, die bei Diagnose und im Rezidiv auftreten (R380W, R430X), ausgewählt. Dabei handelt es sich um zwei trunkierte Mutationen (S381X, R430X) und zwei Frameshift-Mutationen (D464G, R380W), welche in Exon 7-9 liegen. Die Bezeichnung der Mutationen bezieht sich auf die Isoform D NM\_024426.4 (NCBI, Origen). Die Translation unseres WT1 Proteins beginnt an einem non-AUG Startcodon, inframe und upstream des AUG-Starts ab einem CUG Codon. Lee et al. stellten eine Überexpression des cugWT1 Proteins fest, wobei die Überexpression von cugWT1 mit der Induktion von Tumorwachstum assoziiert wird (23).

## Einleitung



**Abbildung 3 WT1 Struktur und WT1 Mutationen.**

Das WT1 Protein setzt sich zusammen aus den Transkriptions-Domänen (Repressor, Aktivator) und den vier Zn am C-Terminus. Hier werden auch die in der Arbeit verwendeten WT1 Mutationen (S381X, R380W, R430X, D464G) abgebildet.

**Tabelle 5 Größe der WT1 Mutanten**

Protein	Größe	Funktion des Gen-Bereichs
WT1 Isoform D = wt	1647bp = 549aa = 60,39kDa	
WT1 S381X	1143bp = 381aa = 41,91kDa	Verlust der Transkriptionsregulation Verlust des Zellkern Lokalisations Signals und der Bindungsdomäne für Interaktionsproteine
WT1 R430X	1290bp = 430aa = 47,3kDa	Störung der DNA-Bindungsfähigkeit
WT1 R380W	1647bp = 549aa = 60,39kDa	Verlust der Transkriptionsregulation Verlust des Zellkern Lokalisations Signals und der Bindungsdomäne für Interaktionsproteine
WT1 D464G	1647bp = 549aa = 60,39kDa	Störung der DNA-Bindungsfähigkeit

Hier wird die Funktion der Mutanten nach der bekannten Literatur beschrieben (15).

Es wird vermutet, dass Framshift-Mutationen im Exon 7 (siehe S381X) zu einem Abbruch des WT1 Proteins führen. Dies kann zu einem Verlust der Zinkfinger-Domäne führen und damit zu einer Störung der DNA-Bindungsfähigkeit. Dadurch kommt es zu einem Verlust der Transkriptions-Regulations-Funktion des Proteins. Zudem wird vermutet, dass trunkierte Proteine ihr Zellkern Lokalisations Signal und die Bindungs-Domäne für Interaktionspartner wie beispielsweise p53 verlieren. In der bisherigen Forschung wurde der alleinige Einfluss von Mutationen in Exon 9 auf die Leukämogenese als niedrig eingestuft. Der Verlust der Zn 3 und 4 führt vermutlich zu einer Destabilisierung der Helix und zu einer verminderten DNA-

## Einleitung

---

Bindungsfähigkeit (15). Wir vermuten, dass die WT1 Mutationen einen Einfluss auf Signalwege ausüben und so auch eine Therapieresistenz verstärken können. Dies wollen wir im Zellmodell näher untersuchen.

WT1 Mutationen in CN-AML werden in der Literatur überwiegend mit einer niedrigeren CR Rate und einer höheren Chemoresistenz, sowie einer höheren Rezidivrate und einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert (15).

### 1.3.4 WT1 Interaktionspartner

Mutationen im WT1 Gen stören wichtige Signalwege. Es kommt zur Unterbrechung von Interaktionen mit Zielgenen und zur Dysregulation von Zellprozessen. Kennt man die Zusammenhänge der gestörten Interaktionen kann man diese in Therapiestrategien einbinden (18). Die Interaktionspartner können nach Funktionsbereichen unterteilt werden. Es gibt DNA-bindende Transkriptionsfaktoren, Transkriptions Co-Regulatoren, Ribonukleinsäure (RNA) Metabolismus- und Verarbeitungs-Faktoren und epigenetische Faktoren (18).

Besonders interessant sind dabei TP53, TET2 und STAT3, welche jeweils eine wichtige Rolle in der Pathogenese der AML spielen. Daher soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob die Interaktion dieser Proteine mit WT1 durch Mutationen des Gens beeinflusst werden und dadurch Mechanismen der Resistenzbildung erklärt werden können.

TP53 kann als Transkriptionsfaktor an spezifische Zielgene binden und die Genexpression regulieren. Das Protein zählt zu den wichtigsten Tumorsuppressoren, indem es Zellarrest, DNA-Reparatur und Apoptose kontrolliert (24). TP53 wird als Antwort auf Stress Signale durch post-translationale Modifikation aktiviert. Dies leitet entweder einen Zellzyklus Arrest oder die Apoptose ein. Durch DNA-Schäden in der Zelle aktiviert, produziert der TP53 Regulationsweg-Proteine zur DNA-Reparatur (25). TP53 liegt bei 50% aller Tumore mutiert vor und ist eine wichtige Treibermutation in der AML. Eine Korrelation der WT1 und TP53 Expressionslevel konnte bei Patienten in AML festgestellt werden. Zudem konnte man zeigen, dass WT1 TP53 stabilisiert. Dadurch wird die pro-apoptotischen Funktion von TP53 inhibiert und somit verhindert, dass die Zellen in Apoptose gehen. Forschungsgruppen arbeiten daran, die Bedeutung der Interaktion von TP53 und WT1 für die Prognostik und Diagnostik genauer zu erklären (26). In der vorliegenden Arbeit soll die Interaktion von TP53 mit WT1 Wildtyp bestätigt und mit WT1 Mutationen überprüft werden (27).

Bei Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) handelt es sich ebenfalls um einen Transkriptionsfaktor. Dem Protein STAT3 werden verschiedene Aufgaben zugeordnet. So kann es Zellproliferation, Zellmigration, Gewebeinflammation und Apoptose regulieren. Die Aktivierung von STAT3 erfolgt, sobald spezifische Wachstumsfaktoren oder Zytokine an ihre Rezeptoren an der Zelloberfläche binden. Es kommt zur Autophosphorylierung der Januskinasen (JAKs). Stat3 bindet dann an die JAKs. Anschließend wird Stat3 phosphoryliert und gelangt als Dimer in den Nukleus. Dort bindet Stat3 an Zielgene, um eine Transkriptions-Antwort zu starten. Gene, welche mit Stat3 interagieren, sind meist anti-apoptotische Gene, Zellzyklus-Regulatoren und Angiogenese Proteine. Überexpression von Stat3 in der Leukämie wird mit einem erhöhten Risiko für Rezidiv und vermindertem Gesamtüberleben assoziiert.

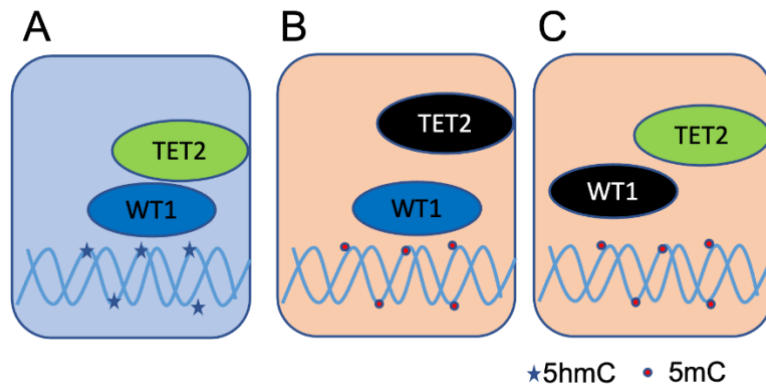


## Einleitung

---

Daher wird Stat3 als potenzielles Target für die Tumorthherapie erforscht (28). Auch eine Interaktion mit WT1 wird beschrieben. Dabei wirken Stat3 und WT1 synergistisch und fördern die Zell-Proliferation (27).

TET2 gehört zur Familie der ten-eleven translocation Proteine und ist ein Tumorsuppressor. Diese Proteine katalysieren verschiedene Reaktionen, welche die Methylierung von DNA und Expression von Genen regulieren und dadurch ihre epigenetische Regulator Rolle ausüben können. Dabei katalysieren die TET-Enzyme folgende drei Oxidations Reaktionen: Zunächst wird 5-Methylcytosin (5mC) in 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC), dann in 5-Formylcytosin (5fC) und zuletzt in 5-Carboxylcytosin (5caC) konvertiert. Eine weitere Decarboxylierung von 5caC kann zur DNA-Demethylierung führen (29). Wird dieser Hydroxymethylierungs-Weg unterbrochen kann keine normale hämatopoetische Differenzierung stattfinden. Es wird vermutet, dass WT1 und TET2 durch einen gemeinsamen Signalweg zur Inhibition der Zell-Proliferation und der Kolonie-Formation in AML führen. Dafür spricht erstens die physikalische Interaktion von TET2 und WT1. Zweitens bindet TET2 an Promotoren von Genen, welche als WT1 Zielgene bekannt sind. Drittens kommt es durch die Bindung von TET2 an WT1 zur Erhöhung des intrazellulären 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) levels (Abb. 4\_A). Sowohl eine Loss of function Mutation von TET2 als auch von WT1 führen zu einer Störung der Regulation der WT1 Zielgene (29). Liegt WT1 oder TET2 mutiert vor, kommt es zu einer Verminderung der 5hmC Level, da 5mC nicht zu 5hmC konvertiert werden kann (Abb. 4\_B und C). 5hmC beeinflusst die Genregulation durch seine Rolle in der DNA-Demethylierung. Die beiden Mutationen korrelieren invers (30). WT1 dient vermutlich als Co-Faktor zur Rekrutierung und Stimulierung der TET-Enzym-Aktivität an spezifischen Stellen im Genom. Inwiefern WT1 TET2 zur Aktivierung der Signalkaskade benötigt, ist noch nicht genau bekannt. Wir wollen untersuchen ob TET2 WT1 Wildtyp zur Interaktion benötigt oder auch mit bestimmten Mutanten von WT1 interagieren kann (30).



**Abbildung 4 TET2 und WT1 Interaktion.**

Modifiziert nach Wang (29). In schwarz werden mutierte Proteine dargestellt. A An der DNA-Helix liegt 5hmC vor in Anwesenheit von WT1 und TET2. B und C DNA-Helix mit 5mC. TET2 bzw. WT1 ist mutiert.

Die Interaktionspartner binden jeweils an spezifische Motive des WT1 Proteins. Nachdem TP53 und TET2 den Zinkfinger (Zn) von WT1 zur Interaktion benötigen, vermuten wir, dass TP53 und TET2 nicht mit den Mutanten R380W und S381X interagieren können und ebenfalls mit den Mutanten R430X und D464G nur eingeschränkt interagieren, während eine Interaktion der WT1 Mutanten mit STAT3 nicht gestört sein sollte. Dies wollen wir mit Hilfe von Immunpräzipitations-Assays untersuchen.

### 1.3.5 Fragestellung

Die AML ist die häufigste akute Leukämie bei Erwachsenen und geht trotz intensiver Chemotherapie, allogener Stammzelltransplantation und zielgerichteter Therapien noch immer mit einer schlechten Prognose einher. Mutationsanalysen von Patientenmaterial weisen auf die Bedeutung von einzelnen Genen im Pathomechanismus der Rezidiventwicklung hin. Zu diesen zählt auch das Wilms-Tumor 1 Gen (WT1), in welchem 10% der AML-Patienten Mutationen akquirieren (10). Daher vermuten wir, dass WT1 Mutationen zur Resistenzbildung in der AML beitragen. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es durch Knockout bzw. Re-expression von WT1 ein zelluläres Modellsystem zu generieren und nachfolgend die Resistenzmechanismen zu charakterisieren. Weiterhin sollen die Interaktionen von WT1 und wichtigen Proteinpartnern in einer Immunpräzipitation untersucht werden. Eine Störung der Interaktion durch WT1 Mutation könnte Aufschluss für die Resistenzbildung geben.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Plasmide

Tabelle 6 Plasmide

Bezeichnung	Größe	Eigenschaften	Resistenz	Herkunft
pcDNA6a_STAT3cFlag-Not-Apa7	7,7kbp	Expressionsvektor	Ampicillin	AG Spiekermann
pCAG-GFP-TEV_humanTET2	13,02kbp	Expressionsvektor	Ampicillin	AG Leonhardt
pcDNA3_p53-HA*3	6,741kbp	Expressionsvektor	Ampicillin	Hermeking
pCDNA3-STAT3	7,7kbp	Expressionsvektor	Ampicillin	Addgene
pcDNA6	5,4 kbp	Expressionsvektor	Ampicillin	AG Spiekermann
pcDNA6_IsoD WT1	5,4 kbp	Expressionsvektor	Ampicillin	AG Spiekermann
pcDNA6_D464G	5,4 kbp	Expressionsvektor	Ampicillin	AG Spiekermann
pcDNA6_R380W	5,4 kbp	Expressionsvektor	Ampicillin	AG Spiekermann
pcDNA6_R430X	5,4 kbp	Expressionsvektor	Ampicillin	AG Spiekermann
pcDNA6_S381X	5,4 kbp	Expressionsvektor	Ampicillin	AG Spiekermann
pcDNA6_IsoA WT1	5,4 kbp	Expressionsvektor	Ampicillin	AG Spiekermann
138-dCas9-Dnmt3a (#84570)	7,783kbp	Expressionsvektor	Ampicillin	Addgene
PB_IsoD WT1	10,562kbp	Expressionsvektor	Ampicillin	Diese Arbeit
PB_D464G	10,562kbp	Expressionsvektor	Ampicillin	Diese Arbeit
PB_R380W	10,562kbp	Expressionsvektor	Ampicillin	Diese Arbeit
PB_R430X	10,562kbp	Expressionsvektor	Ampicillin	Diese Arbeit
PB_S381X	10,562kbp	Expressionsvektor	Ampicillin	Diese Arbeit

#### 2.1.2 Oligonukleotide, Primer

Tabelle 7 Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Annealing-Temperatur [°C]	Verwendung
-------------	-----------------	---------------------------	------------

WT1ScreeningneuFOR_JK	CAGGCTCAGGATCTCGTGTCTC	66.0	Sequenzierung gDNA
WT1ScreeningneuREV_JK	TCAGAGACCAGGGAGATCAGC T	64.0	Sequenzierung gDNA
InFu_WT1DnFlag_Rev	AGGCTTACCGCGGCCGCCCTCT AGAAGCGCCAGCTGGAGTTT	62.0	Amplifikation
InFu_WT1DnFlag_For	ACGATGACAAGGGCGATCGCT ACCTGCAGGACCCGGCTTCCA	62.0	Amplifikation
ins_3nt_after_1551-antisense	GCCGCCCTCTAGTCAAAGCGCC AGCTG	78.25	Mutagenese Stopcodon
ins_3nt_after_1551	CAGCTGGCGCTTTGACTAGAGG GCGGC	78.25	Mutagenese Stopcodon
For_1 643	CAGGGTTACAGCACGGTCA	60.73	Sequenzierung
For_2 1353	CCAGTGTAAAACTTGTCAGCGA	60.34	Sequenzierung
Rev_1 748	TGGGATCCTCATGCTTGAAT	60.43	Sequenzierung
WT1 S381X fw	CTCAGATGCCTACCGTACAAGA GTCGGGGC	80.27	Mutagenese S381X
WT1 S381X rv	GCCCCGACTCTTGTACGGTAGG CATCTGAG	80.27	Mutagenese S381X
WT1 R430X fw	CTGAACGAGAAAACCTTCATTC ACAGTCCTTGAAGTC	78.28	Mutagenese R430X
WT1 R430X rv	GACTTCAAGGACTGTGAATGAA GGTTTTCTCGTTCAG	78.28	Mutagenese R430X
WT1 R380W fw	CAGATGCCGACCATAACAAGAGT CGGGGCTAC	80.31	Mutagenese R380W
WT1 R380W rv	GTAGCCCCGACTCTTGTATGGT CGGCATCTG	80.31	Mutagenese R380W
WT1 D464G fw	GGTCTTCAGGTGGCCGGACCGG GAGAA	78.61	Mutagenese D464G
WT1 D464G rv	TTCTCCCGGTCCGGCCACCTGA AGACC	78.61	Mutagenese D464G
SequenzierP_MutantenFor1	CGGAGCCCAATACAGAATACA C	57.0	Sequenzierung WT1 Mutanten
SequenzierP_MutantenFor2	CTTACAGATGCACAGCAGGAA GCA	59.0	Sequenzierung WT1 Mutanten
WT1-Cas9-guide For	CACCGTGTGGCAGCCATAGACC GG	69.6	CrisperCas9
WT1-Cas9-guide REV	AAACCCGGTCTATGGCTGCCAC AC	66.1	CrisperCas9

### 2.1.3 Zelllinien

**Tabelle 8 Verwendete Zelllinien**

Zelllinie	Bemerkungen	Herkunft
K562	Humane chronische myeloische Leukämie-Zelllinie aus einer Pleural Effusion einer 53-jährigen Frau etabliert, nicht adhärent	Lozzio, 1973[97] DSMZ
293T HEK	Humane embryonale Nierenepithel-Zelllinie, adhärent	Graham, 1977[91] DSMZ
K562 WT1 <sup>wt</sup> #1	CrisperCas9	AG Spiekermann
K562 WT1 <sup>wt</sup> #3	CrisperCas9	AG Spiekermann
K562 WT1 <sup>wt</sup> #7	CrisperCas9	AG Spiekermann
K562 WT1 <sup>-/-</sup> #3	CrisperCas9	AG Spiekermann
K562 WT1 <sup>-/-</sup> #4	CrisperCas9	AG Spiekermann
K562 WT1 <sup>-/-</sup> #9	CrisperCas9	AG Spiekermann
K562 PB/ WT1 <sup>wt</sup> #2	Nukleofektion	Diese Arbeit
K562 PB/ WT1 <sup>wt</sup> #5	Nukleofektion	Diese Arbeit
K562 PB/ WT1 <sup>wt</sup> #20	Nukleofektion	Diese Arbeit
K562 PB/ WT1 <sup>D464G</sup> #2	Nukleofektion	Diese Arbeit
K562 PB/ WT1 <sup>D464G</sup> #6	Nukleofektion	Diese Arbeit
K562 PB/ WT1 <sup>D464G</sup> #8	Nukleofektion	Diese Arbeit
K562 PB/ WT1 <sup>R380W</sup>	Nukleofektion	Diese Arbeit
K562 PB/ WT1 <sup>R430X</sup> #2	Nukleofektion	Diese Arbeit
K562 PB/ WT1 <sup>R430X</sup> #6	Nukleofektion	Diese Arbeit
K562 PB/ WT1 <sup>R430X</sup> #9	Nukleofektion	Diese Arbeit
K562 PB/ WT1 <sup>S381X</sup>	Nukleofektion	Diese Arbeit

### 2.1.4 Bakterien

**Tabelle 9 Verwendete Bakterien**

Bakterien	Bemerkungen	Herkunft
Stellar TM Competent Cells	Klonierung	TaKaRa Bio Europe, Frankreich
Quick Change, XL10-Gold Ultracompetent cells #2005 17-4	Klonierung	Agilent Technologies, USA
Subcloning Efficiency DH5 $\alpha$ Chemically Competent Cells	Maxipräparation	Invitrogen, Deutschland (D)

## 2.1.5 Antikörper

**Tabelle 10 Verwendete Antikörper**

Antikörper	Bemerkungen/ Ursprung	Herkunft
Monoclonal Anti-Flag (F3165-1MG)	Maus, monoklonal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
anti-β-Actin (AC-15) (A1978)	Maus, monoklonal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Anti-α-Tubulin (T9026)	Maus, monoklonal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
GAPDH (6C5) (sc-32233)	Maus, monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
HSP90 (C45G5) Rabbit mAb (#4877)	Kaninchen, monoklonal	Cell Signaling, NEB; Frankfurt, D
p53 D0-7 (#48818)	Maus, monoklonal	Cell Signaling, NEB; Frankfurt, D
Anti-Stat3 (18F7.1) (05-1078)	Maus, monoklonal	Millipore, Darmstadt, D
WT1 (D6M6S) Rabbit mAb (#13580)	Kaninchen, monoklonal Erkennt Isoformen A, B, C und D	Cell Signaling, NEB; Frankfurt, D
WT1 Antibody (6F-H2) (#05-1078)	Maus, monoklonal Erkennt Isoformen A, B, C und D	Novusbio, Centennial; CO; USA
Anti-Rabbit IgG-HRP, goat (A0545)	Kaninchen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
m-IgGk BP-HRP (sc-516102)	Maus	Santa Cruz Biotechnology, CA; USA
Goat-anti-rat IgG-HRP (sc-2006)	Ratte	Santa Cruz Biotechnology, CA; USA
donkey α-Rabbit IgG-HRP (ac-2313)	Kaninchen	Cell Signaling, NEB; Frankfurt, D
Anti-Tet2 (ab245287)	Kaninchen, polyklonal	Abcam, Cambridge, England

## 2.1.6 Medien, Puffer und Lösungen

**Tabelle 11 Medien, Puffer und Lösungen**

Bezeichnung	Zusammensetzung/ Herkunft	Verwendung
Agarosegel	1% Agarose, 100ml TAE, SYBR Safe DNA gel stain	DNA-Gel-Elektrophorese
Calciumchlorid	2 M $\text{CaCl}_2$	Transfektion
DMEM 1x (Dulbeccos Modified Eagle Medium)	+ 10% FKS, 3ml Penicillin-Streptomycin Lös. / gibco	Zellkultur
Lysispuffer (RIPA)	50 ml Glycerol 100%, 5ml Triton x 100, 1,14 g EGTA 50mM, 4,5 g NaCl 1M, 6,4 g Hepes 1	Zelllysis

	M, 2,1 g NaF, 2,23 g Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> x 10H <sub>2</sub> O, 335ml H <sub>2</sub> O (vor Gebrauch für 5ml Lysispuffer: 25µl Aprotinin, 50µl PMSF, 50µl Orthovanadat)	
PCR Lysis Buffer	10x Proteinase K Buffer 3100µl; Proteinase K (20mg/ml) 77,5µl; SDS (1.7mM/0,05%) 31µl; d <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O 27791,5µl; Total 31 ml	CRISPR/Cas9 Screening
Elektrophorese-Puffer (10x) 5L	Tris 152.4g; Glycin 720.7g; Natriumdodecylsulfat 50g; Wasser gereinigt zu 5000ml/ Apotheke Klinikum der Universität München	SDS-Gel-Elektrophorese
KCM 5x	13 mL: 5 mL 3M KCl, 4,5 ml 1M CaCl <sub>2</sub> , 7.5 ml 1M MgCl <sub>2</sub> , ad Aqua destiliert	Maxipräparation
Lämmli-Puffer (2x/4x)	4% SDS; 20% Glycerol, 10% 2-Mercaptoethanol; 0.004% Bromphenol blue; 0.125 M Tris HCl (pH ca. 6.8) / Santa Cruz, CA; USA	SDS-Gel-Elektrophorese
LB-Agar (Lennox) X965.1	35g in 1L Aqua dest., autoklavieren/ ROTH, Karlsruhe	Bakterienkultur
LB-Medium (Lennox) X964.1	20g in 1L Aqua dest., autoklavieren/ ROTH, Karlsruhe	Bakterienkultur
RPMI Medium 1640 (1x)+ Gluta Max <sup>TM</sup> -I	+ 20% FKS, 3ml Penicillin-Streptomycin Lös./ gibco	Zellkultur
Washing Buffer I	50mM TrisHCl pH 7.5, 150mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.5% Na-deoxycholat, 1 tablet complete protein inhibitor cocktail/50 ml, 0.7 µg/ml pepstaitin, Roche	Immunpräzipitation
Washing Buffer II	50mM TrisHCl pH 7.5, 500mM NaCl, 0.1% Nonidet P40, 0.05% Na- deoxycholat, Roche	Immunpräzipitation
Washing Buffer III	50mM TrisHCl pH 7.5, 0.1% Nonidet P40, 0.05% Na-deoxycholat, Roche	Immunpräzipitation
Lysis Buffer für Flag M2 beads	50nM TrisHCL pH 7.4, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, xml d <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	Immunpräzipitation
Milchpulver	5% Milchpulver in MQ auflösen/ Roth, Karlsruhe	Westernblot
Gel-Transfer-Puffer Tris 250 mmol/L 5L	Tris 15,0g; Glycerin 71,0g; Methanol 790,0g; Wasser gereinigt zu 5000ml/ Apotheke Klinikum der Universität München	Gel-Transfer
SOC-Medium	TaKaRa, Frankreich	Bakterienkultur



TAE-Puffer pH 8,0 (10x) 5L	Tris 242,3g; Titriplex III (Natriumdefat) 18,61g; Essigsäure 100% 59,85g; Wasser gereinigt zu 5000ml/ Apotheke Klinikum der Universität München	DNA-Gel-Elektrophorese
TAE-Puffer pH 8,0 (1x) 1L	100ml TAE-Puffer pH 8,0 (10x) 5L; 900ml MQ; 100µl SYBR Safe DNA gel stain	DNA-Gel-Elektrophorese
Tris-HCl-Puffer 1,5mol/L pH 6,8	Tris 908,55g; Wasser gereinigt zu 5000ml; pH mit Salzsäure hergestellt/ Apotheke Klinikum der Universität München	SDS-Gel-Elektrophorese
Tris-HCl-Puffer 1,5mol/L pH 8,8	Tris 908,55g; Wasser gereinigt zu 5000ml; pH mit Salzsäure hergestellt / Apotheke Klinikum der Universität München	SDS-Gel-Elektrophorese
TBS-Puffer pH 8,0 (10x) 5 L	Tris 60,57g; Natriumchlorid 483,3g; Wasser gereinigt zu 5000ml/ Apotheke Klinikum der Universität München	Westernblotting
TBS-T-Puffer	100ml TBS-Puffer pH 8,0 (10x) 5 L; 900ml MQ, 1ml Tween	Westernblotting
PI Facs Buffer	49 ml PBS; 1 ml FBS; 1µg/ml Propiumjodid	Facs Sorting
Lysis Buffer Flag M2 Beads 200ml	50mM TrisHCl pH 7,4; 150mM NaCl; 1mM EDTA; 1% Triton X-100; x d <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	Immunpräzipitation
10x Proteinase K Buffer	500mM ; 100mM CaCl <sub>2</sub> ; pH 7.5)	CrisperCas9

## 2.1.7 Chemikalien, Enzyme, Inhibitoren und Zytokine

**Tabelle 12** Verwendete Chemikalien

Standards	Verwendungszweck	Bezugsquelle
Agarose NEEO Ultra-Qualität	DNA-Gel-Elektrophorese	ROTH, Karlsruhe; D
Aprotinin	Lysisbuffer	Sigma Aldrich, Taufkirchen; D
1 kb-DNA-Leiter	DNA-Gel-Elektrophorese	Promega, Madison, WI; USA
Fötales Kälberserum (FKS)	In vitro Zellkultivierung	Thermo Fisher Scientific, MA; USA
HEPES buffered saline	Transfektion	Sigma Aldrich, Taufkirchen; D
Penicillin-Streptomycin Lösung	Zellkultur	Pan Biotech, Aidenbach: D
Trypsin-EDTA (1x) 0,25%/ 0,05%	Adhärente Zellen	ThermoFisher, MA; USA
DPBS w/o Calcium, w/o Magnesium	Zellkultur	Pan Biotech, Aidenbach; D
Dimethyl Sulfoxide for cell culture	Zellkultur	Pan Reac Applichem, Darmstadt; D
Flag Beads	Immunpräzipitation	Sigma-Aldrich
GeneRuler 50bp DNA Ladder	DNA-Gel-Elektrophorese	Thermo Scientific, MA; USA

o'Gene Ruler 1 kb Plus DNA ladder	DNA-Gel-Elektrophorese	Fermentas, St. Leon-Rot; D
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (#26634)	SDS-Gel-Elektrophorese	Thermo Scientific, MA; USA
Ammonium Persulfate 98+%	SDS-Gel-Elektrophorese	SIGMA, Steinheim; D
Tween <sup>R</sup> 20	Westernblotting	SIGMA, Taufkirchen; D
Rotiphorese <sup>R</sup> Gel30 (37,5:1) 30% Acrylamidstamm Lösung mit 0,8% Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1	SDS-Gel-Elektrophorese	ROTH, Karlsruhe; D
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (Orthovanadat) (S 6508)	184 mg auf 10 ml Wasser destilliert, 2x pH Wert auf 10 mit HCl einstellen und 30 s in der Mikrowelle aufkochen lassen; für Lysisbuffer	Sigma, Taufkirchen; D
Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate: Pierce™ ECL Plus Solution A, 100ml Pierce™ ECL Plus Solution B, 2,5ml	Westernblotting: Verwendung 40:1(A:B)	Thermo Scientific, MA; USA
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Proteinkonzentration	BIO-RAD, München; D
TEMED	SDS-Gel-Elektrophorese	ROTH, Karlsruhe; D
SYBR Safe DNA gel stain 10,000 x concentrate in DMSO	DNA-Gel-Elektrophorese	Thermo Fisher Scientific, MA; USA
Protein G-Agarose	Immunpräzipitation	Roche, Mannheim; D
G190A Blue/ Orange 6x Loading Dye	SDS-Gel-Elektrophorese	Promega, Madison; WI; USA
Page Ruler Prestained Protein Ladder	SDS-Gel-Elektrophorese	Thermo Fisher Scientific, MA; USA
Sodium Dodecyl Sulfate	SDS-Gel-Elektrophorese	Sigma, Taufkirchen; D
MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit (10 Tests)	Mycoplasma Test	Lonza, Rockland, ME; USA
2-Propanol for molecular biology A3928,0500GL	Maxipräparation	Pan Reac AppliChem, Darmstadt; D
pmax GFP™ 0,5µg/µl	Transfektion	Lonza, Rockland, ME; USA
Anti-Flag M2 affinity gel	Immunpräzipitation	Sigma Aldrich, Taufkirchen; D

Smart Ladder; Small Fragment 5µl/lane	DNA-Gel-Elektrophoresis bei Knockout Screen	Eurogentec, Genève, Schweiz
bovine serum albumin (BSA)	BSA in Lysispuffer für Eichkonzentrationen lösen; Bradford Test	Sigma Aldrich, Taufkirchen; D

## 2.1.8 Enzyme, Inhibitoren, Zytokine und Antibiotika

**Tabelle 13 Verwendete Enzyme**

Standards	Bemerkungen	Bezugsquellen
My Taq™ DNA-Polymerase	Klonierung	Bioline, Luckenwalde; D
T4-DNA-Ligase Ligation	Cas9	Sigma Aldrich, Taufkirchen; D
Fast Digest EcoR1	Restriktionsenzyme	Thermo Scientific, MA; USA
Fast Digest Xho1	Restriktionsenzyme	Thermo Scientific, MA; USA
Fast Digest FD	Restriktionsverdau	Thermo Scientific, MA; USA
AsiS1	Restriktionsenzyme	BioLabs, Frankfurt; D
NotI HF	Restriktionsenzyme	BioLabs, Frankfurt; D
CutSmart Buffer	Restriktionsverdau	BioLabs, Frankfurt; D
Proteinase K	Restriktionsverdau	BioLabs, Frankfurt; D
Fast Digest Bpil	Restriktionsenzyme	Thermo Scientific, MA; USA

**Tabelle 14 Inhibitoren/ Medikamente**

Standards	Bemerkungen	Bezugsquellen
Puromycin	0,2µg/ml Selektion	gibco, Carlsbad, CA; USA
Doxycyclin	0,2-1µg/ml Induktion	Sigma Aldrich, Taufkirchen; D
Daunorubicin HCl	3.2mM in sterilem deionisiertem Wasser	Apotheke Klinikum der Universität München; D
Cytarabin	20mM	Selleck Chemicals, Houston; TX; USA
Decitabin (S1200)	50mM	Selleck Chemicals, Houston; TX; USA

**Tabelle 15 Verwendete Antibiotika**

Standards	Bemerkungen	Bezugsquellen
Ampicillin sodium salt Konzentration	Bakterienkultur	SIGMA, Taufkirchen; D
Plasmocin prophylactic	Prophylaxe für Selektion von Klonen	InvivoGen, Toulouse; Frankreich

## 2.1.9 Kitsysteme

**Tabelle 16** Verwendete Kitsysteme

Bezeichnung	Verwendungszweck	Herkunft
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Plasmid-Extraktion	Qiagen, Hilden, D
QIA.amp DNA Blood Mini Kit	gDNA Isolierung	Qiagen, Hilden, D
QIAquick PCR Purification Kit	DNA Aufreinigung	Qiagen, Hilden, D
QIAprep Spin Miniprep Kit	DNA-Isolierung	Qiagen, Hilden, D
QIAquick Gel Extraction Kit	DNA-Isolierung aus Agarosegelen	Qiagen, Hilden, D
Rneasy Mini Kit	RNA Isolierung	Qiagen, Hilden, D
Amaxa™ Cell Line Nucleofector™ Kit V	Nukleofektion	Lonza, Hilden, D
In-Fusion HD Cloning Plus	Klonierung	TaKaRa, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
Quick Change II XC Site-Directed Mutagenesis Kit	Mutagenese	Agilent Technologies, USA
CloneAmp HIFI PCR Premix	Klonierung	TaKaRa, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich

## 2.1.10 Laborgeräte und Verbrauchsmaterial

**Tabelle 17** Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät	Hersteller
Zentrifuge 5424R	Eppendorf, Hamburg; D
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York; USA
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg; D
Gen Amp. Peqstar 2x	peqlab, Erlangen; D
Fusion SL Viber Lourmant	peqlab, Erlangen; D
GloMax Discover	Promega, Madison; WI; USA
Waage	Kern& Sohn PCB, Balingen; D
Kühlschrank	Tritec Hannover; Bosch; Liebherr; D
Zell-Inkubator	Binder, Tuttlingen; D
Bakterien-Brutschrank	Heraeus, Osterode; D
Wasserbad	GFL, Hamburg; D
Mikroskop	Motic, Wetzlar; D
ViCell	Beckman Coulter, Krefeld; D
Safe-Lock Tubes 2.0 ml	Eppendorf, Hamburg; D
TC-Platte 6 Well Suspension	Sarstedt, Nümbrecht; D
NanoDrop 1000	peqLab, Erlangen; D
Mikrobiologische Sicherheitsbank	Berner Flour Safe,

Fluoreszenz Mikroskop	Leica, Wetzlar; D
Nukleofector™ 2b	Lonza, Rockland; ME; USA
Safe Seal micro Tube	Sarstedt, Nümbrecht; D
Nunc Cryo Tube vials	Thermo Fisher Scientific, Waltham; MA; USA
Röhre 15 ml 120x17mm, PP	Sarstedt, Nümbrecht; D
Falcon	A Corning Brand
96 Well Culture Plate sterile V-bottom with lid	Cellstar, Krensmünster; Österreich
TC-Flasche T25 und T75, Suspen., Bel. K.	Sarstedt, Nümbrecht; D
TC-Flasche T25 und T75, Stand. Bel. Ka	Sarstedt, Nümbrecht; D
TC-Schale 100 Standard	Sarstedt, Nümbrecht; D
TC-Platte 6, 24 und 96 Well. Suspens. F	Sarstedt, Nümbrecht; D
Entwicklermaschine	Kodak, Stuttgart; D
Gelelektrophoresekammer	BioRad, München; D
Photometer	Eppendorf, Hamburg; D
Pipetten	Gilson, Limburg; D
Vortexer	Cenco, Breda; NL
Thermo Scientific™ Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Thermo Scientific, Schwerte; D
Nitrozellulose Membran	Fisher Scientific, Waltham; MA; USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 chemische Transformation

Bei einer chemischen Transformation wird ein DNA-Plasmid in ein Bakterium eingeführt. Dazu wird die Zellwand durch Zugabe von Chemikalien kurzfristig für DNA-Plasmide durchlässig, wodurch diese in das Bakterium gelangen. Für die chemische Transformation wurde folgender Ansatz für 20 Minuten (min) auf Eis inkubiert:

Plasmid Probe	0.5 µl
5x KCM	10 µl
d2H2O	14.5 µl
DH5α kompetente Zellen	2 µl

Anschließend lässt man die Reaktion bei Raumtemperatur für 10 min stehen. 250 Mikroliter (µl) LB-Medium wurden zur Reaktion dazugegeben und 1 Stunde (h) bei 37° Celsius (C) im Bakterien-Brutschrank (Heraeus, Osterode) inkubiert. 115 µl des Samples wurden auf einem Selektionsmedium mit Antibiotikum (siehe Vektorhersteller Angaben bzw. passendes Resistenzgen) ausplattiert und über Nacht bei 37° C in den Bakterien-Brutschrank (Heraeus, Osterode) gestellt.

#### 2.2.1.2 Präparation von Plasmid-Desoxyribonukleinsäure (DNA)

Plasmide können als Vektoren für die Expression von DNA genutzt werden. Hierbei wird die gewünschte DNA-Sequenz in das Plasmid kloniert. Anschließend werden kompetente Bakterien mit den Plasmiden transformiert (siehe Kapitel 2.2.1.1). Aus den Bakterien kann dann Plasmid-DNA durch das Prinzip der alkalischen Lyse präpariert werden. Durch die Zugabe von NaOH wird der pH-Wert im Zellextrakt in den alkalischen Bereich verschoben. Dies führt zur Überwindung der Wasserstoff-Brückenbindungen und zur Isolation von Plasmid DNA.

#### **2.2.1.2.1 Plasmid-Minipräparation**

Um kleine Mengen Plasmid-DNA zu isolieren, wurde eine einzelne Kolonie aus dem vorbereiteten Selektionsmedium der transformierten Bakterien gepickt und in 2 Milliliter (ml) LB-Medium mit dem Antibiotikaresistenzgen entsprechenden Antibiotikum (Ampicillin) über Nacht bei 37° C und 270 Runden pro Minute (rpm) im Bakterien-Brutschrank (Heraeus, Osterode) inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Bakterien zentrifugiert und nach den Herstellerangaben des QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) die Plasmid-DNA gewonnen. Die DNA wurde in 50 µl Puffer EB eluiert und der DNA-Gehalt mit dem NanoDrop 1000 (peqlab, Erlangen) bestimmt.

#### **2.2.1.2.2 Plasmid-Maxipräparation**

Für die Gewinnung größerer Mengen DNA wurde zunächst eine Retransformation (siehe Kapitel 2.2.1.1) durchgeführt. Alternativ können auch Kolonien vom Selektivmedium, welches für die Minipräparation verwendet wurde, gepickt werden.

Es wurde eine Einzelkolonie vom Selektionsmedium gepickt und in 2 ml LB- Medium mit entsprechendem Antibiotikum für circa 6 h über Tag im Bakterien-Brutschrank (Heraeus, Osterode) geschüttelt. Die Vorkultur wurde nun über Nacht in 100 ml LB-Medium mit Antibiotikum gegeben und im Bakterien-Brutschrank (Heraeus, Osterode) wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurde die Plasmid-DNA nach Herstellerangaben des EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) isoliert. Die DNA wurde in entsprechendem Volumen in Endotoxin freiem Puffer TE aufgenommen und die DNA-Konzentration mit Hilfe des NanoDrop 1000 (peqlab, Erlangen) gemessen.

#### **2.2.1.3 Restriktionsverdau von DNA zur Validierung**

Die DNA-Konstrukte wurden auf ihre Sequenz überprüft. Hierfür mussten sie zunächst einem Enzymverdau unterzogen werden. Dazu wurden 5 Mikrogramm (µg) des DNA-Templates mit je 5 µl Restriktionsenzym (verwendet wurden Enzyme der Firma BioLabs) und 10 µl des passenden Puffers versetzt. Die Reaktion wurde zu 60 µl Gesamtvolumen durch d2H2O ergänzt und dann für 1-1.5 h bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde die Probe auf einem 1%tigen Agarosegel aufgetrennt und mit Hilfe von Syber-Safe unter Ultraviolett-Licht (UV-Licht) sichtbar gemacht.

#### **2.2.1.4 Elektrophoretische DNA-Auftrennung**

Zur genaueren Evaluation der DNA-Konstrukte wurden diese anhand ihrer Fragmentgröße über ein Agarosegel aufgetrennt. Kleine Fragmente laufen im elektrischen Feld aufgrund Ihrer geringeren Größe schneller als große Fragmente (31). Zu den DNA-Proben wurde zuvor 6x

Loading Dye dazugegeben und der Ansatz anschließend in 1x TAE Puffer bei 70 Volt (V) laufen gelassen. Ein Größenmarker wurde ebenfalls auf das Gel geladen. Anschließend wurde mithilfe von SYBR-Safe die DNA-Bande unter UV-Licht sichtbar gemacht.

#### **2.2.1.5 Sequenzierung der Template-DNA**

Die DNA-Sequenz, welche in das Plasmid kloniert wurde (siehe Kapitel 2.2.1.7), wird auf ihre Richtigkeit mittels DNA-Sequenzierung überprüft. Für die Sequenzierung der DNA-Fragmente wurden die Proben entweder bei GATC [5 µl Template-DNA (80-100 ng/µl), 5µl Primer (5 µM) in einem 1.5 ml Eppendorf Tube] oder zur Sequenzierung des gesamten DNA-Inserts bei der Firma Sequiserve [in je einem 1.5 ml Eppendorf Tube: 2 µl forward und reverse Primer (10 µM), 5 µl Template-DNA] eingeschickt.

#### **2.2.1.6 Ortsspezifische Mutagenese**

Bei der ortsgerechten Mutagenese können an einer bestimmten Stelle Punktmutationen durch Basen Substitution, Insertion bzw. Deletion eingebracht werden. In einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird der DNA-Doppelstrang (dsDNA) zunächst denaturiert und anschließend mit Hilfe von Mutagenese Primern die gewünschte Mutation eingeführt. Danach wird das DNA-Template durch PCR vervielfältigt, mit Restriktionsenzymen verdaut und in kompetente Zellen transformiert.

Im Folgenden wurde für die Re-expression von WT1 in Knockout Zellen die Isoform D verwendet. Das Konstrukt bezieht sich dabei auf die Transkriptionsvariante NM\_024426.4 (NCBI, Origen). Die Translation beginnt hier bei einem non AUG Startcodon. Der Start der Translation ab einem CUG Codon ist ungewöhnlich, aber bereits bei Lee et al. beschrieben (23). Die Mutationen, die hier verwendet werden, beziehen sich bei Ihrer Bezeichnung ebenfalls auf die Isoform D (siehe Kapitel 1.3.2).

#### **2.2.1.6.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR-Reaktion)**

Für eine PCR-Reaktion werden Primer, ein DNA-Template, Polymerase und freie Nukleotide benötigt. In einem Thermocycler wird zunächst bei hohen Temperaturen der dsDNA denaturiert. Anschließend können bei einer niedrigeren Temperatur die Primer an den DNA-Einzelstrang binden und im Weiteren wird mit Hilfe der Polymerase der Einzelstrang amplifiziert (32).

Für die Mutagenese des WT1 Gens wurden spezifische Primer entworfen. Für die erfolgreiche Mutagenese speziell von großen Konstrukten wurde das QuickChange II XL Site-Directed



Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, USA) verwendet. Folgender Ansatz wurde dabei vorbereitet:

10x Reaktions Buffer	5 $\mu$ l
(10 ng) ds DNA-Sample (PB/ WT1 Isoform D oder pCDNA6 Isoform D)	1 $\mu$ l
(125 ng, 10 $\mu$ M) Mutagenese Primer FOR	x $\mu$ l
(125 ng, 10 $\mu$ M) Mutagenese Primer REV	x $\mu$ l
dNTP mix	1 $\mu$ l
Quick Solution	3 $\mu$ l
d <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	x $\mu$ l
<hr/>	
Gesamt	50 $\mu$ l

Zuletzt wurde noch 1  $\mu$ l PfuUltra HF DNA Polymerase (2.5 U/ $\mu$ l) hinzugegeben. Diese Polymerase ermöglicht durch ihre proofreading Funktion eine effiziente Amplifikation des dsDNA Samples und verringert unspezifische Mutationen während des PCR- Zyklus.

Zunächst wurde der PCR-Ansatz für 1 min bei 95° C denaturiert und dann für 18 Zyklen unter folgenden Bedingungen im Gen Amp. Pegstar 2x (peqlab, Erlangen) inkubiert:

Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
95	60	1x
95	50	} 18x
60	50	
68	10 min 36 s (1 min/kb) (PB Vector+insert 10.6 kb)	
68	7 min	1x

Final wurde die Annealing Zeit des PCR-Ansatzes um weitere 7 min bei 68° C verlängert. Anschließend kann das PCR-Produkt bei -20° C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt werden.

#### **2.2.1.6.2 Verdau mit DpnI Restriktionsenzym**

Nach der Amplifizierung wurden 1 µl DpnI (10U/µl) Restriktionsenzyme zu jeder Reaktion hinzugegeben, für 1 min zentrifugiert und für 1 h bei 37° C inkubiert. Die DpnI Endonuklease (Zielsequenz 5'-Gm6ATC-3') erkennt spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA und kann die parentalen DNA-Stücke verdauen und so die DNA-Stücke, welche die Mutation enthalten, selektionieren.

#### **2.2.1.6.3 Transformation mit XL10-Gold Ultrakompetenten Zellen**

Transformation (33) beschreibt den Vorgang, bei dem kompetente Bakterien freie Plasmide mit einer Ziel-DNA aufnehmen. Diese Plasmide werden im kompetenten Bakterium vervielfältigt und anschließend wieder isoliert, um später damit Zellen zu transfizieren.

Ein Aliquot von 45 µl ultrakompetenten Zellen wurde mit 2 µl beta-Mercaptoethanol in ein 14 ml BD Falcon-Tube gegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Nun wurden 1-6 µl von dem DpnI behandelten DNA-Plasmiden zu den Zellen hinzugegeben und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zell-Suspension für 30 s in ein 42° C Wasserbad gesenkt, um durch den Hitzeschock das Eindringen der DNA-Plasmide in die Bakterien zu gewährleisten. Dann wurde das Falcon samt Inhalt nochmals für 2 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden nun in 500 µl SOC-Medium aufgenommen und im Bakterien-Brutschrank (Heraeus, Osterode) für 1 h bei 225-250 rpm geschüttelt. Danach wurden 240 µl und 120 µl Bakterien-Suspension auf je einem vorbereiteten Selektionsnährboden (versetzt mit Ampicillin) ausplattiert und über Nacht (>16 h) bei 37° C im Bakterien-Brutschrank (Heraeus, Osterode) inkubiert.

Anschließend folgt eine Plasmid-Minipräparation (siehe Kapitel 2.2.1.1.1).

#### **2.2.1.7 In-Fusion Klonierung von WT1 in PiggyBac Vektor**

Mit Hilfe des In-Fusion HD Cloning Kits (TaKaRa, Saint-Germain-en-Laye) ist es möglich ein DNA-Fragment in einen beliebigen Vektor zu klonieren. Dazu wurden Primer entworfen, die 15 Basenpaare (bp) mit dem Vektor an einer gewünschten Stelle überlappen, um das DNA-Templat hinter dieser Zielsequenz in den Vektor einzufügen. Als Backbone wurde der PiggyBac (PB) Vektor verwendet. Der PiggyBac Vektor, auch genannt the sleeping beauty, dient als backbone für das Gen und ermöglicht eine stabile Transfektion der Ziel-DNA in das

Genom der Zellen. Die Transkription der DNA-Sequenz wird erst nach Induktion durch ein Tetrazyklin wie beispielsweise Doxycyclin gestartet (siehe Kapitel 2.2.2.7.2) (34).

#### 2.2.1.7.1 Polymerasekettenreaktion (PCR) und DNA-Extraktion aus Agarosegel

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten für die In-Fusion Klonierung wurde folgender PCR-Ansatz acht Mal vorbereitet. Es wird eine relative große Menge an DNA für den In-Fusion Ansatz benötigt:

HIFI PCR PREMIX	12.5 µl
InFu_WT1DnFlag_For (10 µM)	0.75 µl
InFu_WT1DnFlag_Rev (10 µM)	0.75 µl
DNA-Template 20 ng (pCDNA6/ WT1 IsoformD)	x µl
H <sub>2</sub> O	x µl
<hr/>	
Gesamt	25 µl

Zunächst wurde der PCR-Ansatz bei 110° C im Gen Amp. Pegstar 2x (peqlab, Erlangen) denaturiert, anschließend wurden 35 Zyklen in folgendem Programm durchlaufen:

Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
98	10	} 35x
56,4	5	
72	21	

Die Reaktion kann auf 4° C angehalten werden.

Das PCR-Produkt wurde zusammen mit 6x Loading Dye auf ein 1%tiges Agarosegel geladen und für 40 min bei 70 Volt aufgetrennt. Zur Einschätzung der Fragmentgröße wurde ein Marker mitlaufen gelassen. Durch Zugabe von SYBR-Safe wurde das DNA-Fragment unter dem UV-Licht sichtbar gemacht.

Das DNA-Fragment wird aus dem Agarosegel extrahiert, um unspezifische Hintergrundbanden auszuschließen. Nach Ausschneiden der gewünschten DNA-Bande unter UV-Licht wurde die

DNA mit Hilfe des QIAquick-Gel-Extraction-Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt und mit 15  $\mu$ l H<sub>2</sub>O eluiert. Anschließend wurde die DNA-Konzentration im NanoDrop 1000 (peqLab, Erlangen) gemessen.

#### **2.2.1.7.2 Linearisierung des PiggyBac Vektors durch Restriktionsverdau**

Der PiggyBac Vektor (PB) wurde mit Hilfe von Restriktionsenzymen linearisiert. Dazu wurden 5  $\mu$ g des Vektors (PB-DNMT3a) mit je 5  $\mu$ l der Restriktion-Enzyme AsiSI und NotI-HF in ein Reaktionsgefäß überführt und 10  $\mu$ l CutSmart-Buffer hinzugegeben. Der Ansatz wurde mit H<sub>2</sub>O zu einem Gesamtvolumen von 100  $\mu$ l verdünnt. Die Reaktion wurde für 1 h bei 37° C im Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg) inkubiert.

#### **2.2.1.7.3 Ligation der In-Fusion Reaktion**

Für die Reaktion wurden 2  $\mu$ l 5x In-Fusion HD Enzyme Premix, 50 ng linearisierter Vektor (PB-DNMT3a) und 95 ng purifiziertes PCR-Fragment (WT1 Isoform D) zu einem totalen Volumen von 10  $\mu$ l mit d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O verdünnt. Die Reaktion wurde für 15 min bei 50° C inkubiert und anschließend auf Eis gegeben. Dadurch entstehen Phosphodiesterase Bindungen zwischen dem Fragment und dem Vektor. Nun kann das Produkt bei -20° C aufbewahrt werden beziehungsweise mit der Transformation fortgefahren werden (siehe Kapitel 2.2.1.7.4).

#### **2.2.1.7.4 Hitzeschock Transformation der In-Fusion Reaktion**

Zur Herstellung ausreichender Mengen an DNA wurde anschließend an die Ligation das Produkt in kompetente Zellen transformiert. Dazu wurde ein Aliquot von 50  $\mu$ l kompetenten Stellar Zellen auf Eis aufgetaut und 2.5  $\mu$ l des Ligations Produkts (ca 5 ng) dazu gegeben und auf Eis für 30 min inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen einem Hitzeschock für 45 s bei 42° C ausgesetzt, so dass das Plasmid durch die nun durchlässige Membran in das Bakterium eindringen kann. Die Zell-Suspension wurde nochmals für 2 min auf Eis inkubiert bevor 500  $\mu$ l S.O.C-Medium dazugegeben wurde und die Eppendorf Tubes für 1 h bei 37° C und 225 rpm im Bakterien-Brutschrank (Heraeus, Osterode) inkubiert wurden. Nach der Inkubation wurden die Bakterien bei 6000 rpm zentrifugiert, um die Bakterien von den Resten der Ligationslösung zu trennen und eine weitere Ligationsreaktion zu verhindern. Anschließend wurden sie in 100  $\mu$ l neuem SOC-Medium resuspendiert. Die Bakterien wurden auf dem vorbereiteten Selektionsnährboden versetzt mit 50 mg/ml Ampicillin ausplattiert. Die Platten kamen über Nacht bei 37° C in den Bakterien-Brutschrank.

Anschließend kann eine DNA-Minipräparation vorgenommen (siehe Kapitel 2.2.1.2.1) werden.

Um die DNA-Sequenz zu verifizieren haben wir einen Restriktionsverdau (siehe Kapitel 2.2.1.3) durchgeführt und das DNA-Plasmid sequenziert (siehe Kapitel 2.2.1.5).

### 2.2.1.8 Herstellung von WT1<sup>-/-</sup> Klonen durch Clustered Regularly-Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR associated protein 9 (CRISPR/Cas9)

Zur Herstellung von WT1 Knockout Klonen (WT1<sup>-/-</sup> Klonen) in K562 Zellen beziehungsweise T293 Zellen wurde durch die Methode des CRISPR/Cas9 (35) ein Knockout des WT1 Gens erzielt. CRISPR/Cas9 dient als genom editing tool unter anderem der Herstellung von Zellmodellen, der Entdeckung von Krankheitsmechanismen und der Identifikation von Krankheits targets. Bei diesem Verfahren kann eine guide RNA (gRNA) sequenzspezifisch mit Hilfe des Cas9 Proteins einen Doppelstrangbruch (DSB) in das given gen of interest (GOI) einführen. Anschließend wird der DSB durch non-homologous end-joining (NHEJ) repariert (36). Im Folgenden wurde eine gRNA erstellt, die an einer bestimmten Zielsequenz im Exon 3 des WT1 Gens bindet, in dem der Knockout eingeführt werden soll. Dabei wurde nach dem ``Protocol for rapid and versatile genome engineering using the MIN (Multifunctional Integrase) strategy`` (37) vorgegangen. Der eingeführte Knockout kann zum Funktionsverlust des Gens führen.

#### 2.2.1.8.1 CRISPR/Cas9

Zunächst wird das online erhältliche MINtool (38) verwendet um die MIN-tagging strategy zu erstellen. Die MIN-tagging strategy umfasst das Einfügen des Knockouts im GOI durch CRISPR/Cas9. Dabei ist die MIN-tagging strategy von der Position eines MIN tag nahe dem Start- oder Stop-Codon des GOI abhängig. Für die Insertion des MIN tag wird Cas9, ein given gene of interest (GOI), specific MIN tag donor und eine GOI-specific gRNA benötigt. Diese Oligonukleotide können nach Erstellen im MINtool, erworben werden.

Zunächst wird die Oligonukleotidsequenz der gRNA annealed, um ein dsDNA Fragment zu bilden. Dazu wird folgender Ansatz benötigt:

Reagenz	Stock Konzentration	Volumen (μl)
gRNA F	100 μM	20
gRNA R	100 μM	20
NEB 4 Buffer	10x	5
H <sub>2</sub> O	1x	5
Gesamt		50

Der Ansatz wird für 5 min bei 95°C im Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg) inkubiert und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

Im nächsten Schritt wird die gRNA in das pSPCas9 Backbone kloniert. Bei dieser Reaktion finden zeitgleich eine Verdauung und eine Ligation statt. Bei der Ligation kommt es zur Ausbildung von Phosphodiesterase Brücken zwischen zwei DNA-Fragmenten. Zu diesem Zweck wird folgender Ansatz gestartet:

Reagenz	Volumen
pSpCas9 (BB)	40 fmol
Annealed gRNA Fragment	120 fmol
Fast Digest BpII (Thermo Fisher)	1 µl
T4 Ligase (30 U)	1 µl
T4 Ligase Buffer	2µl
H <sub>2</sub> O	X µl
Gesamt	20µl

Die Reaktion wird unter folgenden Bedingungen im Gen Amp. Peqstar 2x (peqlab, Erlangen) inkubiert:

Temperatur [° C]	Zeit [min]	Zyklen
37	5	55x
20	5	
37	60	1x
65	10	1x

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden nochmals 1 µl Fast Digest Bpil für den Enzymverdau hinzugegeben und für 1 weitere Stunde bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden E. coli Bakterien mit 5 µl der Reagenz transformiert.

Als abschließender Schritt wurden die Ziel-Zellen (K562, T293) mit der single-stranded DNA (ssDNA), der MIN tag donor oligo Suspension transfiziert. Dazu wurde die Suspension zunächst auf eine Konzentration von 2 µg/µl verdünnt. Die Zellen wurden mit 2 µg MIN-tag

Donor ssDNA oligo und 0.5 µg pSpCas9-gDNA Konstrukt transfiziert (siehe Kapitel 2.2.2.7). Vor dem FACS Sorting wurden die Zellen für 48 h im Zell-Inkubator (Binder, Tuttlingen) inkubiert.

#### **2.2.1.8.2 fluorescence-activated cell sorting (FACS Sorting)**

Im nächsten Schritt wurden  $5 \times 10^5$  green fluorescent protein (GFP)-positive Zellen in eine 10 cm Kulturschale per FACS sortiert (siehe Kapitel 2.2.2.8) und nach 5-7 Tagen wurden Einzelkolonien unter einem Mikroskop mit Hilfe einer 10 µl Pipette von der Schale gepickt und in eine 96 Well-Platte überführt. Dabei wurden zur Kontrolle auch native K562 Zellen in eine 10 cm Kulturschale sortiert und parallel zu den K562 WT1<sup>-/-</sup> Zellen kultiviert, dadurch entstanden die als K562 WT1<sup>wt</sup> bezeichneten Zellen. In jedem Well waren je 150 µl DMEM Medium (DMEM mit 10% FCS, 3 ml Penicillin-Streptomycin, Plasmozym) vorbereitet. Die Einzelkolonien wurden im Zellinkubator expandiert und einmal in eine weitere 96 Well-Platte dupliziert.

#### **2.2.1.8.3 Überprüfung des eingeführten Gen Knockouts**

Die Klone wurden nun auf die Einführung eines Knockouts untersucht. Dazu wurden die Zellen zunächst lysiert und anschließend die DNA-Fragmente durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Zuletzt wurde die DNA auf ein Gel geladen und die Banden ausgewertet.

##### **2.2.1.8.3.1 Zell-Lyse**

Für die Lyse der Zellen wurde das Medium der 96 Well-Platte verworfen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 50 µl PCR Lysis Puffer (Volumen pro Well 50 µl: 5µl 10x Proteinase K Puffer; 0.125 µl Proteinase K; 0.05 µl SDS; 44.825 µl H<sub>2</sub>O) auf jedes Well gegeben. Nun wurden die 96 Well-Platten mit Aluminium versiegelt und für 30 min auf 80° C inkubiert. Im Anschluss wurden die Platten für 3 h auf 55° C gegeben. Dadurch wird die Proteinase K aktiviert, welche Proteine wie DNasen und RNasen inaktiviert, die sonst DNA und RNA abbauen können. Nach 1.5 h bei 55° C wurden die Platten für 2 min auf einen Schüttler gestellt und dann weiter auf 55° C inkubiert. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurden die Platten zuletzt für 30 min bei 85° C inkubiert.

##### **2.2.1.8.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Überprüfung des eingebrachten Knockouts im WT1 Gen**

Durch die PCR (39) kann eine kleine Menge an DNA vervielfältigt werden (siehe Kapitel 2.2.1.7.2). Mit Hilfe einer Multipipette wurden 22.5 µl vom PCR Master Mix auf jedes Well einer 96 Well-Platte gegeben und 2.5 µl Lysat hinzu pipettiert. Die Primer wurden dabei so

gewählt, dass sie ein DNA-Fragment des WT1 Gens von einer Länge über circa 300-400 bp amplifizieren und dabei vor dem Start des potenziellen Knockouts mit der Transkription starten. Im Folgenden wurde der Knockout im Exon 3 des WT1 Gens überprüft. Der Master Mix setzt sich wie folgt zusammen:

WT1ScreeningneuFOR_JK 10 $\mu$ M	630 $\mu$ l
WT1ScreeningneuREV_JK 10 $\mu$ M	630 $\mu$ l
5xMy Taq Buffer	3150 $\mu$ l
My Taq Polymerase	63 $\mu$ l
d <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	9702 $\mu$ l
<hr/> Gesamt	<hr/> 14175 $\mu$ l

Unter folgenden Zyklus Konditionen wurde das DNA-Template im Gen Amp. Peqstar 2x (peqlab, Erlangen) amplifiziert:

Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
95	5	1x
95	0:30	} 45x
58	0:30	
72	0:30	
72	0:40	1x

Anschließend wurden 15  $\mu$ l von jeder PCR-Reaktion zu 3  $\mu$ l Färbelösung auf ein 1.5%tiges Agarose Gel geladen und für 35 min bei 180 V ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Ein Proteingrößenstandard wurde dabei mitgeführt. Das Gel wurde bei 302 nm in der Entwicklerrmaschine (Kodak, Stuttgart) ausgewertet. Potenzielle WT1<sup>-/-</sup> Klone wurden anhand der fehlenden Gen-Expression ausgewählt und anschließend zur genaueren Evaluierung sequenziert (siehe Kapitel 2.2.1.5 und 2.2.1.9).



### 2.2.1.9 Genom DNA-Isolation aus K562 und Hek293T Zellen

Genomische DNA (gDNA) wird zur Sequenzierung des WT1 Gens benutzt, um den Genstatus Wildtyp versus Knockout zu erheben.

Hierzu wurde das QIA.amp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) verwendet. Im Folgenden wurden alle Zentrifugations-Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt. Für die Isolierung von gDNA wurden  $5 \cdot 10^6$  Zellen für 5 min bei  $300 \cdot g$  in der Zentrifuge 5424 R (Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 200  $\mu$ l PBS resuspendiert. Anschließend wurden 20  $\mu$ l Proteinase K zur Zell-Suspension hinzugefügt. Durch Zugabe von 200  $\mu$ l Buffer AL wurden die Zellen lysiert und für 10 min bei  $56^\circ \text{C}$  in einem Thermocycler inkubiert. Dies ermöglicht eine maximale Anreicherung an DNA durch Lysis. Die Probe wurde danach kurz zentrifugiert. Nun wurden 200  $\mu$ l 100% Ethanol hinzugefügt und nochmals kurz zentrifugiert. Die Probe wurde auf eine QIAamp Mini Spin Säule gegeben und in der Zentrifuge 5424 R (Eppendorf, Hamburg) bei 8000 rpm zentrifugiert. Die DNA bleibt dabei in der Säule haften. Die Säule wurde nach und nach mit 500  $\mu$ l Buffer AW1 und AW2 gewaschen. Danach wurde die Säule für 5 min mit 200  $\mu$ l Buffer AE benetzt und im darauffolgenden Zentrifugen-Schritt wurde die DNA durch den Buffer AE eluiert. Bis zur Weiterverwertung kann gDNA bei  $-20^\circ \text{C}$  in einem Gefrierschrank aufbewahrt werden.

### 2.2.1.10 PCR-Screening von gDNA

Für die Amplifikation (siehe Kapitel 2.2.1.6.1) von gDNA wurde folgender Ansatz vorbereitet:

WT1ScreeningneuFOR_JK 10 $\mu$ M	1 $\mu$ l
WT1ScreeningneuREV_JK 10 $\mu$ M	1 $\mu$ l
5x MyTaq Buffer	5 $\mu$ l
My Taq Polymerase	0.1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	15.4 $\mu$ l
<hr/>	
Gesamt	22.5 $\mu$ l

22.5  $\mu$ l des Ansatzes wurden in ein PCR-Gefäß überführt und anschließend 2.5  $\mu$ l gDNA dazu pipettiert.

Der PCR-Zyklus wurde am Gen Amp. Peqstar 2x (peqlab, Erlangen) wie folgt eingestellt:

Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
95	5	1x
95	0:30	} 36x
57	0:30	
72	0:30	
72	0:40	1x

Das Produkt der PCR-Reaktion wurde über ein 1.5%tiges Agarosegel aufgetrennt und durch Zugabe von SYBR-Safe unter dem UV-Licht sichtbar gemacht. Zusätzlich wurde ein 50 bp Marker zur Größen-Bestimmung mitlaufen gelassen.

## **2.2.2 Zellbiologische Methoden**

### **2.2.2.1 Zellkulturbedingungen**

Alle hier aufgeführten Zelllinien wurden in einem Zell-Inkubator (Binder, Tuttlingen) bei 37° C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen stammen von der DSMZ (Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Deutschland).

### **2.2.2.2 Kultur von adhärennten Zellen**

Adhärennte Hek 293T Zellen wurden in DMEM-Medium („Dulbecco’s Modified Eagle Medium) versetzt mit 20% fötalem Kälberserum (FKS) und 3 ml Penicillin-Streptomycin kultiviert. Zum Expandieren der Zellen wurde zunächst das Medium alle 2 Tage abgenommen, dann wurden die abgestorbenen Zellen mit PBS gewaschen und anschließend wurden die Zellen unter Zugabe von Trypsin für 5 min im Zell-Inkubator inkubiert. Trypsin löst durch Abbau von Proteinen, welche den Zellverband aufrechterhalten, die Zellen von der Oberfläche (40). Der Trypsin-Zellsuspension wird nun frisches DMEM-Medium zugesetzt, um Trypsin zu verdünnen. Anschließend werden die Zellen wieder im Zell-Inkubator verwahrt beziehungsweise können die Zellen für Assay-Ansätze verwendet werden.

### **2.2.2.3 Kultur von Suspensionszellen**

K562 Zellen wurden in RPMI-Medium mit 20% FKS und 3 ml Penicillin-Streptomycin gehalten. Die Zellen wurden alle 2 Tage auf 0.5 Zellen/ml Medium gesplittet und alle zwei Wochen vollständig bei 1100 rpm abzentrifugiert und in neuem Medium resuspendiert.

### **2.2.2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zum längerfristigen Aufbewahren der Zellen konnten diese bei -80° C im Gefrierschrank beziehungsweise im Stickstofftank eingefroren werden. Dazu wurden die Zellen bei 1100 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen beziehungsweise für einen Mycoplasmen Test (siehe Kapitel 2.2.2.9) aufgehoben. Dann wurde das Zellpellet von ca.  $6 \cdot 10^6$  Zellen in 1 ml Einfriermedium, bestehend aus 10% DMSO und 90% FKS, resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein Nunc-Cryotube™ gegeben und in einem Gefrierbehälter bei -80° C in den Gefrierschrank gestellt. Dieser spezielle Einfrierbehälter ermöglicht ein langsames und gleichmäßiges eingefrieren, dank des enthaltenen Isopropanol. Nach zwei Tagen können die Zellen auf die Endtemperatur überführt werden.

Zum Auftauen der Zellen wurde das entsprechende Medium im Wasserbad auf 37° C vorgewärmt. Die Zellen wurden kurz im Wasserbad für 1 min aufgetaut und sofort mit etwas vorgewärmten Medium verdünnt und bei 1100 rpm zentrifugiert, um die Zellen vom Einfriermedium zu befreien und abgestorbene Zellen zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in neuem Medium resuspendiert und in Kultur überführt. Die Zellen wurden erst nach 3-4 Tagen für Experimente verwendet.

#### **2.2.2.5 Zell-Test auf Mykoplasmen und Behandlung**

Um zu gewährleisten, dass die Zellkulturen kontaminationsfrei sind, wurde alle 2 Wochen ein Mykoplasmentest durchgeführt. Durch das MycoAlert®-Assay (Lonza, Rockland) können die häufigsten Enzyme der Mykoplasmen detektiert werden. Falls Mykoplasmen vorhanden sind, werden diese zunächst lysiert. Anschließend reagieren die Enzyme mit der Substrate Lösung, dabei wird ADP zu ATP umgewandelt. Das ATP-Level wird im Illuminator (GloMax Discover, Promega, USA) gemessen und eine Ratio aus den Werten vor und nach Zugabe von Substrate Lösung gebildet.

Für den Versuchsansatz wurde 1 ml Überstand der Zell-Suspension für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert, um die restlichen Zellen abzuzentrifugieren. Dann wurde von dem Überstand 25 µl in ein 96 Well überführt und 25 µl Reagent Lösung dazugegeben. Dieser Ansatz wurde für 5 min bei Raumtemperatur im GloMax Discover inkubiert. Es wurde eine erste Messung vorgenommen (Wert A). Anschließend wurden 25 µl Substrate Lösung dazugegeben und für 10 min im GloMax Discover inkubiert. Eine zweite Messung fand statt (Wert B). Ist nun der Quotient aus  $B/A < 1$  sind die Zellen als Mykoplasmen frei zu bewerten.

#### **2.2.2.6 Bestimmung der Lebendzellzahl**

Die Zellzahl spielt in vielen Experimenten eine wichtige Rolle. Oft wurden die Zellen vor einem Versuch in einer bestimmten Dichte ausgesät. Um diese zu bestimmen wurden 600 µl Zell-Suspension im ViCell-Zellzähler (Beckman Coulter, Krefeld) gezählt. Bei der Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe des ViCell wird sich zu Nutze gemacht, dass tote Zellen den Farbstoff Trypanblau aufnehmen, während lebende Zellen farblos bleiben. So kann die Zellzahl bestimmt werden.

### 2.2.2.7 Transfektion von Zellen

Die Transfektion beschreibt allgemein die Aufnahme von Plasmiden in eine Zelle. Dabei kann abhängig vom Backbone des Plasmids dieses in das Genom der Zelle integriert werden, dies wird dann stabile Transfektion genannt (34). Dadurch wird während des Zellzyklus die integrierte Plasmid DNA zusammen mit der Genom DNA dupliziert. Wird das Plasmid nicht in das Genom integriert geht die Expression des Plasmids mit der Zeit verloren, da es nicht in den Zellzyklus eingebunden ist und nicht dupliziert wird. Das Plasmid ist also nur transient in die Zelle transfiziert (41).

Im Folgenden werden die jeweils verwendeten Protokolle für die transiente und die stabile Transfektion beschrieben.

#### 2.2.2.7.1 Transiente Transfektion von Zellen

Bei einer transienten Transfektion (42) wird DNA temporär in eine Zelle eingeführt, aber nicht in das Genom integriert (41). Für die Transfektion wurde das Ziel-Gen in einen Expressionsvektor (z.B. pCDNA6, piggyBac) kloniert. Die Transfektion der Ziel-Zellen wurde hier mittels Calciumphosphat-Präzipitationsmethode durchgeführt. Hierbei bindet die zu transfizierende DNA an ausfallendes Calciumphosphat, welches wiederum von den Ziel-Zellen endozytotisch aufgenommen wird.

Einen Tag vor Transfektion wurden  $0.8 \cdot 10^6$  Hek 293T Zellen in 2 ml Medium in einer 6 Well-Platte ausgesät, um eine Konfluenz von 80 % des Gefäßbodens zu erreichen. Am nächsten Tag wurde 3-4 h vor der Transfektion das Medium gewechselt. 2 µg DNA (bzw. green fluorescent protein (GFP)), 145 µl d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O und 15 µl CaCl<sub>2</sub> wurden in ein Eppendorf Tube 1 (Eppi1) pipettiert. In einem weiteren Eppendorf Tube 2 (Eppi2) wurden 150 µl HBS 2x vorgelegt. Dann wurde die Lösung aus Eppi1 vorsichtig auf Eppi2 pipettiert, sodass sich ein Präzipitat bildet. Die Reaktion sollte 3-4 min bei Raumtemperatur stehen und anschließend auf die Zellen tröpfchenweise gegeben werden. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt, um die Calciumkristalle zu entfernen. Nach 24 h wurde GFP bzw. ein Fluoreszenz Vektor (PiggyBac dsred) unter einem Fluoreszenz Mikroskop betrachtet, um die Transfektionseffizienz zu kontrollieren. Nach 48 h wurden Zell-Lysate angefertigt. Wurde ein PiggyBac Vektor-Konstrukt zur Transfektion verwendet, muss das Gen zunächst induziert werden. Dazu liegt auf dem Vektor ein Tetrazyklin reguliertes Expressions-System, welches mit Doxycyclin 24 h vor der Lyse induziert werden muss (34). Die mit PiggyBac transfizierten Zellen können mit 2 µg/ml Puromycin selektioniert werden, da auf dem Vektor ein Puromycin Resistenzgen liegt.

#### **2.2.2.7.2 Stabile Transfektion von K562 Zellen**

Die stabile Transfektion beschreibt die Einführung eines DNA-Fragments in eine Zelle und die Integration des DNA-Fragments in das Genom. Durch Nukleofektion nach dem Amaxa Cell Line Nucleofector KitV wurde das DNA-Fragment im Folgenden eingebracht. Dabei wird durch Elektroporation die Zellmembran für normalerweise nicht-permeable Substanzen durchlässig gemacht. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes, erzeugt durch einen starken Stromimpuls, kann das Plasmid die Membran überwinden (43).

Zwei Tage vor Nukleofektion wurden die Zellen (K562 WT1<sup>-/-</sup> #9) in einer Zelldichte von  $2 \cdot 10^5$  Zellen pro ml Medium gesplittet. Je  $1 \cdot 10^6$  Zellen wurden bei 200 g abzentrifugiert und in 100  $\mu$ l Nucleofector Solution (Verhältnis 4.5:1: 82  $\mu$ l Nucleofector Solution, 18  $\mu$ l Supplement) resuspendiert. 1  $\mu$ g DNA-Plasmid (exprimiert in PB Vektor) wurde zu der Zellsuspension pipettiert und 1  $\mu$ g PiggyBac Transposase zugesetzt. Die Transposase dient zur Koordination des Copy Past Mechanismus, um das DNA-Fragment aus dem Vektor in das Genom der Ziel-Zelle zu überführen. Die Zell/DNA-Suspension wurde nun in eine Küvette transferiert, diese wurde in den Nucleofector<sup>TM</sup> 2b überführt und mit dem Programm T-016 die Nukleofektion durchgeführt. Anschließend wurden 500  $\mu$ l vorgewärmtes Medium in die Küvette hinzugegeben und die Zellen mit einer Pipette in die vorbereitete 12 Well-Platte (1,5 ml Medium vorgelegt) überführt. 1  $\mu$ g Doxycyclin pro ml Medium wurde auf die Nukleofektierten Zellen gegeben, um das WT1 Gen zu induzieren (siehe Kapitel 2.2.2.7.1) und so die Effizienz der Nukleofektion nach 24 h unter einem Fluoreszenz Mikroskop zu überprüfen. Nach 48 h wurden die Zellen unter 0.2  $\mu$ g/ml Puromycin Behandlung auf positive Zellen selektioniert (siehe Kapitel 2.2.2.7.1). Anschließend wurden die positiven Klone durch FACS single cell sorting isoliert.

#### **2.2.2.8 Facs Single Cell Sorting**

Die Zellen wurden ein Mal für 5 min bei 1100 rpm zentrifugiert und das Zell-Pellet mit 3 ml PBS gewaschen und wiederum für 5 min zentrifugiert. Nun wurde das Pellet in 300  $\mu$ l Propidium Iodide (PI) Facs Puffer resuspendiert und in ein Facs Tube überführt. Der PI Facs Puffer kann mit ds DNA interkalieren, wobei der Puffer nicht die intakte Zellwand überwinden kann. Daraus resultiert, dass mit PI FACS Puffer tote und absterbende Zellen differenziert werden können. Es wurden 96 Well-Platten mit 150  $\mu$ l Medium und 0.2  $\mu$ g/ml Puromycin vorbereitet. Die lebenden single cells wurden in die 96 Well-Platten gesortet und die einzelnen Zellen als Klone unter Puromycin Behandlung selektioniert und zum weiteren Screening hochgezogen (44). Die Klone wurden K562/PB WT1 benannt und durchnummeriert.

### 2.2.2.9 Zell-Viabilitäts-Assays unter Chemotherapeutika Behandlung

Um den Einfluss von Chemotherapeutika auf das Proliferationsverhalten von K562 Zellen, K562 WT1<sup>-/-</sup> Zellen und K562 WT1<sup>mut</sup> Zellen zu testen, wurden die Zellen verschiedenen Konzentrationen von Chemotherapeutika ausgesetzt. Als Kontrolle wurden mit DMSO behandelte Zellen mitgeführt.

Für den Ansatz eines jeden Assays wurden  $0.15 \cdot 10^6$  Zellen pro ml Medium in 24 Well-Platten ausgesät. Die Zellen wurden zuvor zentrifugiert, das alte Medium verworfen und das Zell Pellet in frischem Medium resuspendiert. Die Zellen wurde in dem entsprechenden Chemotherapeutikum (verwendete Konzentrationen: Cytarabin (Ara-C) nanoMole (nM): 12.5 nM; 25 nM; 50 nM; 100 nM; 200 nM; 400 nM; 800 nM; 1600 nM, Decitabine mircoMole ( $\mu$ M): 0.01  $\mu$ M; 0.05  $\mu$ M; 0.1  $\mu$ M; 0.5  $\mu$ M; 1  $\mu$ M; 2.5  $\mu$ M; 5  $\mu$ M; 10  $\mu$ M) für 72 h im Zell-Inkubator (Binder, Tuttlingen) inkubiert. Anschließend wurde die Anzahl der viablen Zellen mittels ViCell (Beckman Coulter, Krefeld) gemessen. Daunorubicin wird laut Leitlinien über drei Tage gegeben (1), daher wurde für Daunorubicin (Konzentration 5nM) ein Langzeit Assay über 12 Tage angesetzt. In unserem Labor zeigte Daunorubicin eine deutlichere Wirkung bei Langzeitversuchen (45), bei Versuchen mit Ara-C und Decitabine sieht man dagegen bereits in einem kürzeren Zeitraum eine Wirkung eintreten. Hierzu wurden  $0.15 \cdot 10^6$  Zellen pro ml Medium in einer T25 tissue culture-treated (TC)-Flasche ausgesät und mit der entsprechenden Konzentration Daunorubicin behandelt. Nun wurde jeden zweiten Tag die Zell Viabilität gemessen und an Tag 4 und 8 wurden die Zellen gesplittet (Zellen mit Drug 1:5, DMSO Kontrolle 1:5) und mit neuem Medium und Daunorubicin vermischt. Mit Hilfe des Softwareprogramms GraphPad Prism 8 (La Jolla, CA, USA) wurden aus den gewonnenen Daten Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt und die IC50 Werte berechnet (siehe Kapitel 2.2.4).

Bei den Viabilitäts-Assays mit re-exprimierten WT1-Konstrukten (PB/WT1) wurden die Zellen 48 h vor Ansatz des Assays, zum Zeitpunkt 0 und 24 h nach Ansatz mit Doxycyclin induziert (siehe Kapitel 2.2.2.7.2).

## 2.2.3 Proteinchemische Methoden

### 2.2.3.1 Herstellung von Zell-Lysat

Lysate werden hergestellt, um die Expression oder Interaktionen von Proteinen durch Westernblotting und Immunpräzipitation (siehe Kapitel 2.2.3.5; 2.2.3.3) zu bestimmen. Dazu wurden  $6 \cdot 10^6$  Zellen zentrifugiert und der Überstand verworfen. Adhärente Zellen wurden mit Trypsin von der Gefäßwand gelöst und mit PBS gewaschen. Dann wurde das Zell-Pellet

zweimal mit PBS gewaschen und bei 1100 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zell-Pellet wurde mit entsprechender Menge RIPA Lysis Buffer (50-120µl) resuspendiert und auf Eis gekühlt. Die Lysate wurden für 30 min auf ein Drehrad bei 4° C zur maximalen Lysierung gegeben und danach für 10 min auf 13000 rpm bei 4° C zentrifugiert, um Zellreste vom Lysat zu trennen. Das Lysat kann als Aliquot bei -20° C bis zum Gebrauch gelagert werden.

### **2.2.3.2 Messung der Proteinkonzentration nach Bradford**

Die Proteinkonzentration (46) der Lysate wird im Photometer (Eppendorf, Hamburg) bei 595 nm mittels Bradford-Methode gemessen. Dabei bilden Aminosäuren mit der Bradford Lösung einen Komplex, der in einem Farbwechsel von braun zu blau resultiert und im Photometer bestimmt werden kann. Dazu wurde ein Ansatz aus 2 µl Lysat, 18 µl ddH<sub>2</sub>O und 980 µl Bradford Lösung (1:5 mit Wasser verdünnt) hergestellt und in eine Küvette gegeben. Zu Beginn der Messung wurde eine Blank Probe (H<sub>2</sub>O verdünnt mit Bradford 1:5) gemessen und zur Kalibrierung des Photometers wurde BSA als Standard verwendet (200 µg/ml; 400 µg/ml; 600 µg/ml; 800 µg/ml; 1000 µg/ml). Das Messergebnis muss noch durch den Verdünnungsfaktor 100 geteilt werden um die Proteinkonzentration [µg/µl] zu erhalten.

### **2.2.3.3 Immunpräzipitation**

Bei der Immunpräzipitation (47) wird mit Hilfe eines Antikörpers ein gesuchtes Antigen, z.B. ein Protein und seine Interaktionspartner, aus einem Lysat präzipitiert. Dies ist also eine Methode zum Nachweis von Protein-Protein Interaktionen. Im Anschluss an die Immunpräzipitation können die im Präzipitat vorhandenen Proteine im Westernblot nachgewiesen werden.

Es wurden entweder Protein G-Agarose Beads (Roche, Mannheim) oder Anti-Flag M2 Affinity Gel Beads (Sigma Aldrich, Taufkirchen) für die Immunpräzipitation verwendet. Da sich die Protokolle in Details unterscheiden, werden hier beide Varianten erklärt.

Variante 1: Um Hintergrund Banden zu vermeiden, wurden 50 µl Protein G-Agarose Suspension zu 300–500 ng eines Zell-Lysats in ein Eppendorf Tube gegeben und für 3 h oder über Nacht bei 4° C auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 20 s bei 120000xg zentrifugiert und der Überstand vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nun wurde ein entsprechendes Volumen an spezifischen Antikörpern zur Probe hinzugefügt und für 1 h auf 4° C auf dem Drehrad inkubiert. Dadurch kann das Protein an den spezifischen Antikörper binden. Dann wurde 50 µl Protein G-Agarose Suspension und 1 ml Lysis Buffer zur



Probe beigefügt und über Nacht bei 4° C auf einem Drehrad inkubiert. Die Antikörper-Antigen Komplexe werden durch die Bindung an die Beads immobilisiert. Der Agarose-Antikörper-Antigen Komplex wurde für 20 s bei 12000xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Beads wurden dann in 1 ml Wasch-Puffer I resuspendiert und für 20 min bei 4° C auf das Drehrad gegeben. In diesem Schritt werden die Proteine, die nicht am Antikörper haften und damit kein Präzipitat mit den Beads bilden ausgewaschen. Wiederum wurde die Probe zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Schritt wurde mit Wasch-Puffer II und III wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugieren wurden die letzten Reste des Überstandes vorsichtig entfernt und der Agarose-Antikörper-Antigen Komplex in 50 µl 2x Lämmli Buffer aufgenommen. Die Probe wurde für 5 min bei 95° C denaturiert. Im Anschluss kann die Probe für die sodium dodecyl sulfate (SDS)-Gel-Elektrophorese (siehe Kapitel 2.2.3.4) verwendet werden.

Variante 2: Die Flag Beads (Sigma-Aldrich) wurden für 30 s bei 7000 g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Dann wurden die Beads 2x mit 1 ml TBS gewaschen, um den Wasch- Puffer vollständig zu entfernen. In beschrifteten Eppendorf Tubes wurden die Lysate vorbereitet. Die Beads wurden mit 500 µl Binding Buffer (RIPA-Lysisbuffer) verdünnt. Je 50 µl Beads wurden zu den Lysaten gegeben und nochmals 300 µl Binding Buffer hinzugefügt. Die Eppendorf Tubes kamen über Nacht bei 4° C auf ein Drehrad, sodass die Beads an das Antigen binden können. Am folgenden Tag wurden die Tubes 1x für 30 s bei 7000 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und anschließend 3x mit 1 ml TBS gewaschen. 50 µl 2x Lämmli Buffer wurden zum Immunpräzipitat dazu gegeben und für 5 min auf 95° C wurde die Suspension denaturiert, um dann auf ein SDS-Gel für die Elektrophorese (siehe Kapitel 2.2.3.4) geladen zu werden.

#### **2.2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet. SDS bindet dabei an die Proteine und überdeckt die Eigenladung der Proteine, zudem überwindet SDS die Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine, sodass die Wanderungsgeschwindigkeit nur von der Molekülgröße abhängig ist. Je größer das Protein desto langsamer wandert dieses durch das elektrische Feld, das im Gel angelegt wird (48). Hierzu wurde ein Trenngel hergestellt und in eine Gelkassette gegossen. Dabei ist die Wahl der Gelzusammensetzung abhängig von der untersuchten Proteingröße. Es gilt je kleiner das Protein, desto höher prozentig muss das Trenngel sein.

Beispiel für eine Gelzusammensetzung:

Trenngel 8% für 2 Gele:

H <sub>2</sub> O	6,9 ml
30% Rotiphorese <sup>R</sup> Gel30 (37,5:1)	4.0 ml
1.5 M TrisHCl (pH 8.8)	3.8 ml
10 % Sodium Dodecyl Sulfate	0.15 ml
10% Ammonium Persulfate 98+%	0.15 ml
TEMED	0.009 ml

Sammelgel für 2 Gele:

H <sub>2</sub> O	3.4 ml
30% Rotiphorese <sup>R</sup> Gel30 (37,5:1)	0.83 ml
1.5 M TrisHCl (pH 6.8)	0.63 ml
10 % Sodium Dodecyl Sulfate	0.05 ml
10% Ammonium Persulfate 98+%	0.05 ml
TEMED	0.005 ml

Die Lysate wurden der Proteinkonzentration entsprechend mit d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O und 4\*Lämmli Lösung vermischt. Das Gemisch wurde für fünf min bei 95° C denaturiert. Anschließend wurde das Lysat nochmals für zwei Minuten auf Eis gegeben und dann mit einem Proteingrößenstandard in die Geltaschen pipettiert.

Die Elektrophorese wurde bei 70 Millivolt (mV) gestartet. Sobald die Proben ins Trenngel übergangen, wurde die Spannung auf 110-120 mV gestellt.

#### 2.2.3.5 Westernblot

Im Anschluss an die SDS-Gel-Elektrophorese wurden die Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Dazu wurde das Gel auf die Membran gelegt, mit Papier isoliert und in einer Transferkammer über Nacht bei 100 Milliampere (mA) auf 4° C geblottet. Am folgenden Tag erfolgt die Inkubation der Membran mit den jeweiligen Antikörpern gegen die gesuchten Proteine.

Hierzu wurde die Membran zunächst für 1 h in 5%tiger Milch inkubiert. Anschließend wurde der Antikörper nach dem jeweiligen Mischverhältnis (siehe Herstellerangaben) dazu gegeben. Dann wurden überflüssige Antikörper von der Membran für 3x10 min mit TBS-T Buffer gewaschen und darauffolgend mit dem zugehörigen sekundären Antikörper geblottet. Zum Abschluss wurde nochmals die Membran 3x10 min mit TBS-T gewaschen, um die restlichen nicht gebundenen Antikörper wegzuwaschen. Die Membran wurde nun mit 2 ml Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate für 2 min benetzt und im Fusion SL Viber Lourmant (peqlab, Erlangen) die Banden ausgewertet. Unter Benetzung der Membran mit Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate kommt es zwischen der Lösung und dem Antikörper-Antigen Komplex zu einer chemischen Reaktion, deren Lichtemission im Fusion SL Viber Lourmant (peqlab, Erlangen) aufgenommen werden kann. Die Dauer der Licht Exposition ist dabei abhängig von der vorhandenen Menge des Proteins, dabei nimmt mit der Proteinmenge die Belichtungszeit ab (49).

Zur Kontrolle der Proteinexpression wurde die Membran ebenfalls mit einem Antikörper gegen ein Housekeeping Protein (zum Beispiel GAPDH) geblottet.

## 2.2.4 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde das Softwareprogramm GraphPad Prism 8 (La Jolla, CA, USA) verwendet. Die Überlebenskurve wurde mit der Kaplan-Meier-Methode dargestellt und der Unterschied der Kurven durch einen log-Rank test analysiert (siehe Kapitel 1.3.3).

Mit den gesammelten Daten aus den Zell-Viabilitäts-Assays wurden Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt, um die Abhängigkeit der Zell-Viabilität von der Konzentration des Wirkstoffes darzustellen. Dazu wurde der Mittelwert der technischen Replikate genommen und die biologischen Replikate anschließend im Graphen dargestellt. Es wurden für alle Versuche zu den 3 biologischen Replikaten jeweils 2 technische Replikate hergestellt. Zum Vergleich von K562 WT1<sup>wt</sup>, K562 WT1<sup>mut</sup> und K562 WT1<sup>-/-</sup>, wurden aus den Dosis-Wirkungs-Kurven die IC50 Werte berechnet. Diese geben die Konzentration des Wirkstoffes an, unter welcher es zur halbmaximalen Inhibition des Wachstums kommt.

Die IC50 Werte wurden berechnet, indem zunächst die x-Werte logarithmisch transformiert wurden. Anschließend wurden die y-Werte durch non linear regression und (log) inhibitor vs response – variable slope berechnet. Als Ergebnis erhält man den IC50 Wert.

Die IC50 Werte können durch den unpaired t-Test auf Signifikanz getestet werden. Sollen einzelne Viabilitäten zu korrespondierenden Wirkstoffkonzentrationen verglichen werden, kann der grouped t-Test ausgewählt werden. Die Signifikanz der Dosis-Wirkungs-Kurven wird mit dem 2way Anova Test bestimmt. Dabei wird einerseits der column factor der grouped analysis betrachtet andererseits wird der Mittelwert der Viabilitäten unterschiedlicher Klone bei gleicher Wirkstoff-Konzentration verglichen. Die p-Werte wurden wie folgt als signifikant bewertet:  $p < 0.05$ (\*);  $p < 0.01$ (\*\*);  $p < 0.001$ (\*\*\*). Für die Darstellung der Graphen wurde ebenfalls das Programm GraphPad Prism 8 (La Jolla, CA, USA) verwendet.

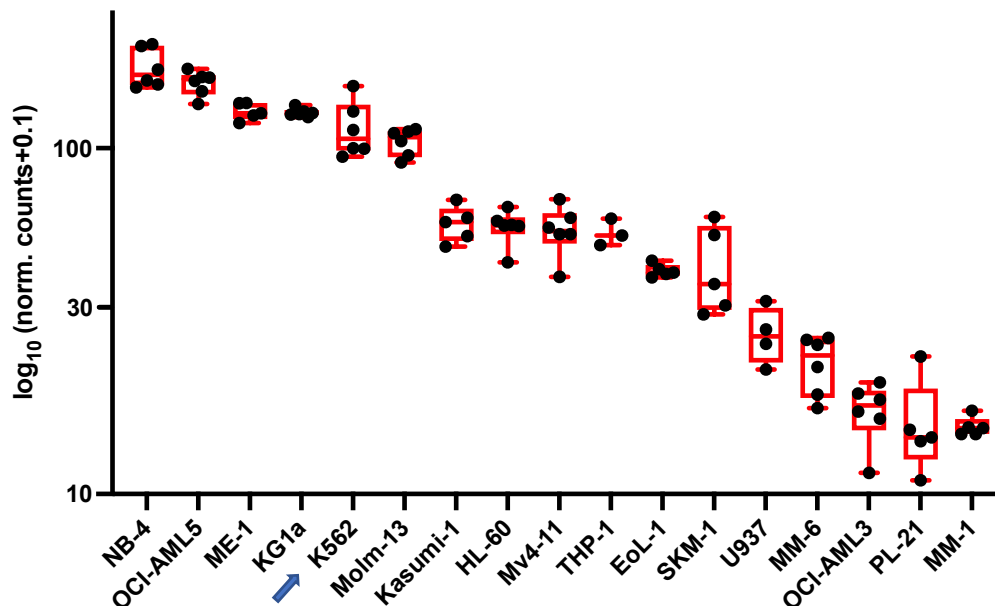
### 3 Ergebnisse

---

#### 3.1 Funktionelle Charakterisierung von WT1 im Zellmodell

Bei Patienten mit AML wurden vermehrt WT1 Mutationen (WT1<sup>mut</sup>) bei Diagnose und im Rezidiv nach Chemotherapie vorgefunden (siehe Kapitel 1.3.3). Daher gehen wir davon aus, dass WT1 einen Einfluss auf die Entstehung von AML und die Wirksamkeit von Chemotherapeutika hat. Das Ziel dieser Arbeit ist die funktionelle Charakterisierung von WT1 im Zellmodell. Um im Zellmodell die Funktion eines Gens beziehungsweise seines Proteins zu untersuchen, werden Funktionsverlust (loss-of-function) und Funktionsgewinn (gain-of-function) des Gens analysiert.

Dazu wurde zunächst ein Zellmodell ausgewählt, in dem WT1 untersucht werden kann. Als Modell dient im Folgenden K562, eine humane chronisch myeloische Leukämie-Zelllinie. K562 ist ein etabliertes Zellmodell für Leukämie (45) und wurde aus einer Pleuraeffusion einer 53-jährigen Frau mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) während einer Blastenkrise gewonnen (50). Eine Zelllinie, die aus einer CML in der Blastenkrise gewonnen wurde, kann eine AML-Zelllinie modellieren, da in dieser Phase die CML einer AML ähnelt. K562 Zellen exprimieren WT1 im Vergleich zu anderen leukämischen Zelllinien stark (siehe RNA-Seq-Daten (Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung), Abbildung 5). Daher wurde die Zelllinie als Zellmodell zur Untersuchung der funktionellen Eigenschaften des WT1 Gens ausgewählt. K562 Zellen haben eine Verdopplungszeit von 30 bis 40 Stunden (51). In unseren Zellkultur Experimenten haben wir K562 Zellen über 72 h mit Zytostatika behandelt. In dieser Zeit können die Zellen zweimal den Zellzyklus durchlaufen und so kann ein Effekt sichtbar werden. Daher wurden die Zellen unter einmaliger Gabe von Ara-C bzw. Decitabin über 72 h inkubiert. Daunorubicin wurde dagegen über mehrere Tage zu den Zellen gegeben (siehe Kapitel 2.2.2.9).



**Abbildung 5 RNA-Seq Daten: Leukämie Zelllinien und WT1 Expression (AG Spiekermann, LMU).**

Auf der y-Achse wird die Expression von WT1 in verschiedenen Leukämie Zelllinien abgebildet. Die Box zeigt jeweils den Interquartilrange mit Median an. Die Whisker zeigen das jeweilige Maximum und Minimum an. K562 ist mit blauem Pfeil markiert.

Zunächst wollten wir untersuchen, ob Gain-of-Function oder Loss-of-Function von WT1 einen Einfluss auf die IC50 Werte der Dosis-Wirkungs-Kurven der Tumorzellen unter Behandlung mit Chemotherapeutika hat. Anschließend wurde untersucht, ob Zellen mit einer WT1 Mutation die Dosis-Wirkungs-Kurve verändern.

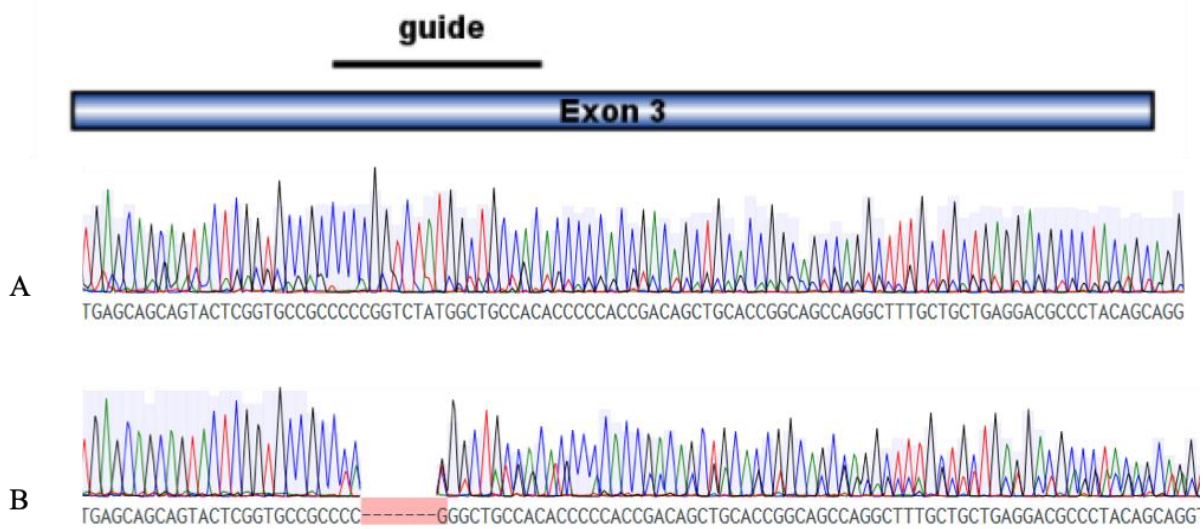
Im Folgenden wurden die Zytostatika Cytarabin, Decitabin und Daunorubicin verwendet. Die Standard-Induktionstherapie (7+3 Schema) der AML beinhaltet die Kombination aus der dreitägigen Gabe eines Anthrazyklins/Antrachinons (z. B. Daunorubicin 60 mg/m<sup>2</sup>, Idarubicin 10-12 mg/m<sup>2</sup>, oder Mitoxantron 10-12 mg/m<sup>2</sup>) und einer siebentägigen Gabe von Cytarabin (100-200 mg/m<sup>2</sup> kontinuierlich) (1). Die Gabe von Decitabin (20 mg/m<sup>2</sup>) über 5 Tage zeigt in Kombination mit Venetoclax gute Ergebnisse beim Einsatz bei älteren Patienten, die schlecht auf die Standard-Chemotherapie ansprechen (52).

Es soll im Folgenden gezeigt werden, ob WT1 bzw. Mutationen von WT1 die Sensitivität von K562-Zellen gegenüber Zytostatika beeinflusst.

Um eine mögliche Ursache für Änderungen in der Dosis-Wirkungs-Kurve zu erklären, haben wir im weiteren Verlauf auch Interaktionen von WT1 mit bekannten Protein-Interaktionspartnern (TP53, TET2, STAT3) untersucht. Es sollte herausgefunden werden, ob diese Interaktionen auch mit ausgewählten WT1 Mutationen aufrechterhalten bleiben. Der Verlust von Interaktionen mit wichtigen Proteinen, die für die Apoptose entscheidend sind, kann eine Ursache für Veränderungen in der Dosis-Wirkungs-Kurve sein.

## 3.1.1 Etablierung von K562 WT1 Knockout Zellen

Um den Einfluss von WT1 auf die Dosis-Wirkungs-Kurve unter Zytostatika-Behandlung zu untersuchen, wurde zunächst WT1 in der K562-Zelllinie deletiert. Dies erfolgte mittels CRISPR/Cas9 (siehe Kapitel 2.2.1.8.1). Durch DNA-Sequenzierung von WT1 und Untersuchung der Proteinexpression (Westernblot) von WT1 wurde der Knockout verifiziert (vgl. Abb. 6 und Abb. 7). Es wurden jeweils drei K562 WT1<sup>wt</sup> Klone (siehe Kapitel 2.2.1.8.2) und drei K562 WT1 Knockout (WT1<sup>-/-</sup>) Klone ausgewählt und für anschließende Experimente expandiert. Die Herstellung der K562 WT1 Knockout Zellen erfolgte durch die AG Spiekermann.



**Abbildung 6 Sequenzierung der K562 WT1<sup>wt</sup> und WT1<sup>-/-</sup> Klone.**

Durch CRISPR/Cas9 wurde ein Knockout im Exon3 des WT1 Genes eingeführt. Der Knockout von WT1 wurde mittels DNA-Sequenzierung von K562 WT1<sup>wt</sup> und WT1<sup>-/-</sup> Klonen verifiziert. A K562 WT1<sup>wt</sup> #1; B K562 WT1<sup>-/-</sup> #4. Die rote Sequenz zeigt den DNA-Verlust an dieser Stelle und steht für den erfolgreichen Knockout.

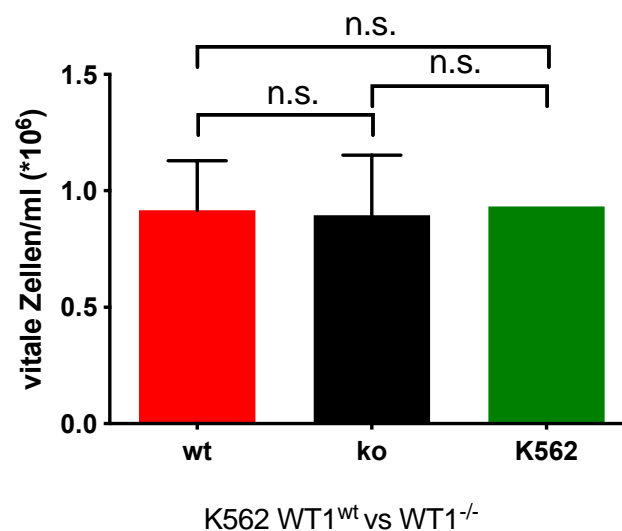


**Abbildung 7 Westernblot WT1 Expression in K562 Zellen nach CRISPR/Cas9 (AG Spiekermann, LMU).**

Das WT1 Protein hat eine erwartete Größe von 51 kDa, dementsprechend ist auf der Höhe von 51 kDa eine entsprechende Bande bei K562 WT1<sup>wt</sup> (wt#1, wt#2, wt#3, wt#4, wt#5, wt#7, wt#8) sichtbar. In den K562 WT1<sup>-/-</sup> Zellen (ko#1, ko#2, ko#3, ko#4, ko#5, ko#7) fehlt die entsprechende Bande. Fett markiert sind jene Klone, die in den nachfolgenden Experimenten charakterisiert wurden.

### 3.1.2 Die Viabilität von K562 WT1<sup>wt</sup> Zellen versus K562 WT1<sup>-/-</sup> Zellen

Der Einfluss von WT1 auf die Viabilität der Zellen wurde untersucht, indem in einer Dichte von jeweils  $0.15 \cdot 10^6$  Zellen/ml K562 WT1<sup>-/-</sup> Zellen bzw. WT1<sup>wt</sup> Zellen in unterschiedlichen 48-well Platten zu Beginn des Experiments ausgesät wurden. Nach 72 h wurde die Viabilität der Zellen mittels ViCell (Beckman Coulter, Krefeld) gemessen. Dabei fand sich kein signifikanter Unterschied in der Viabilität der K562 WT1<sup>wt</sup> (wt) (#1, #3 und #7) gegenüber K562 WT1<sup>-/-</sup> (ko) (#3, #4 und #9) ( $p=0.7855$ ) und der K562 WT1<sup>-/-</sup> gegenüber nativen K562 Zellen ( $p=0.8424$ ). Ebenfalls gab es - wie zu erwarten - keinen signifikanten Unterschied von WT1<sup>wt</sup> (siehe Kapitel 2.2.1.8.2) versus nativen K562 Zellen ( $p=0.9127$ ) (vgl. Abb. 8). Die nativen K562 Zellen wurden parallel zu den K562 WT1<sup>-/-</sup> Zellen einzeln kultiviert und FACS sortiert. Dadurch entstanden die als K562 WT1<sup>wt</sup> bezeichneten Zellen, welche sich folglich nicht von den nativen K562 Zellen unterscheiden.



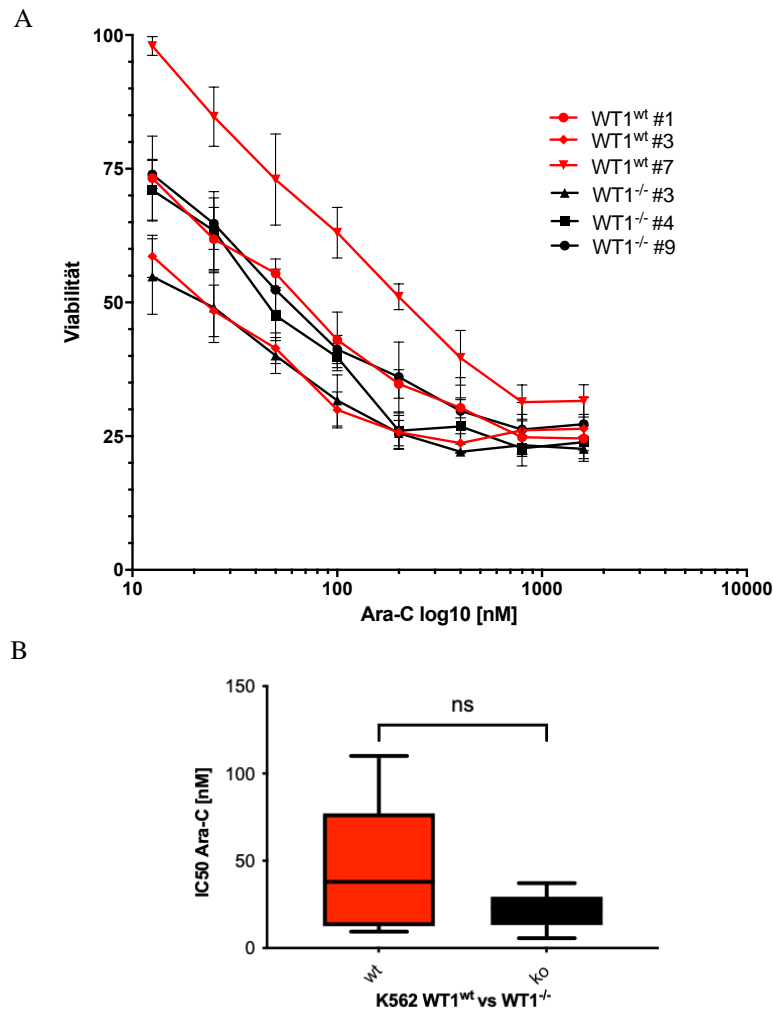
**Abbildung 8 Viabilität von K562 WT1<sup>wt</sup> und WT1<sup>-/-</sup> Klonen (n=3).**

Es wurden  $0.15 \cdot 10^6$  Zellen/ml in einer 48-well Platte ausgesät und nach 72 h die Viabilität am ViCell als vitale Zellen/ml gemessen. In Rot sind K562 WT1<sup>wt</sup> (wt) (#1, #3 und #7), in schwarz K562 WT1<sup>-/-</sup> (ko) (#3, #4 und #9) und in Grün native K562 dargestellt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des unpaired t-Tests bestimmt.



### 3.1.2.1 Viabilität von K562 WT1<sup>wt</sup> versus K562 WT1<sup>-/-</sup> Zellen unter Behandlung mit Cytarabin

Die Klone K562 WT1<sup>wt</sup> (#1, #3 und #7) und WT1<sup>-/-</sup> (#3, #4 und #9) wurden in einer Dichte von  $0.15 \cdot 10^6$  Zellen/ml über 72 h mit verschiedenen Konzentrationen (12.5; 25; 50; 100; 200; 400; 800; 1600 nM) Ara-C behandelt und die Viabilität der Zellen mit Hilfe des ViCells (Beckman Coulter, Krefeld) ausgewertet. Wie sich in Abb. 9-A darstellt, sinkt die Viabilität mit zunehmender Konzentration des Wirkstoffs, bis sich ein Plateau ausbildet. Dann kann auch bei weiterer Erhöhung der Wirkstoffkonzentrationen keine weitere Verminderung der Viabilität erreicht werden. Der K562 WT1<sup>wt</sup> Klon #7 zeigt im Vergleich zu den anderen Klonen eine bessere Viabilität unter Ara-C Konzentrationen von 12.5 – 400 nM. Hier unterscheidet sich der Klon #7 signifikant von den weiteren Klonen (Anova multiple comparison bei 12.5 nM: WT1<sup>wt</sup> #7 vs weitere Klone:  $p < 0.0001$ ) (vgl. Abb. 9-A). Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC50) kann mit Hilfe von GraphPad Prism 8 berechnet werden. Vergleicht man die IC50 Werte von K562 WT1<sup>wt</sup> mit denen der K562 WT1<sup>-/-</sup> Klone, sieht man in Abb. 9-B keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0.0907$ ) der Viabilitäten. Der IC50 Wert von K562 WT1<sup>wt</sup> #7 weicht signifikant von den anderen K562 WT1<sup>wt</sup> Klonen ab (WT1<sup>wt</sup> #7 vs WT1<sup>wt</sup> #1  $p = 0.0105$ ; WT1<sup>wt</sup> #7 vs WT1<sup>wt</sup> #3  $p = 0.0022$ ).



**Abbildung 9 IC50 Werte von K562 WT1<sup>wt</sup> und WT1<sup>-/-</sup> Klonen unter Ara-C Behandlung (n=3).**

A Die Klone wurden für 72 h mit folgenden Ara-C Konzentrationen inkubiert: 12.5; 25; 50; 100; 200; 400; 800; 1600 [nM]. Die Viabilität von K562 WT1<sup>wt</sup> und WT1<sup>-/-</sup> Klonen ist in Relation zu einer nur mit DMSO behandelten Kontrolle abgebildet. Die Abweichung der Viabilität bei einzelnen Konzentrationen des Graphen von WT1<sup>wt</sup> #7 zu den anderen Graphen wurde mit ANOVA ermittelt. B Die IC50 Werte [nM] der jeweiligen Versuche der einzelnen K562 WT1<sup>wt</sup> (rot) und WT1<sup>-/-</sup> Klone (schwarz) wurden gegenübergestellt. Jeder Punkt in der Abbildung steht für ein biologisches Replikat. Die Signifikanz wurde anhand des unpaired t-Tests bestimmt.

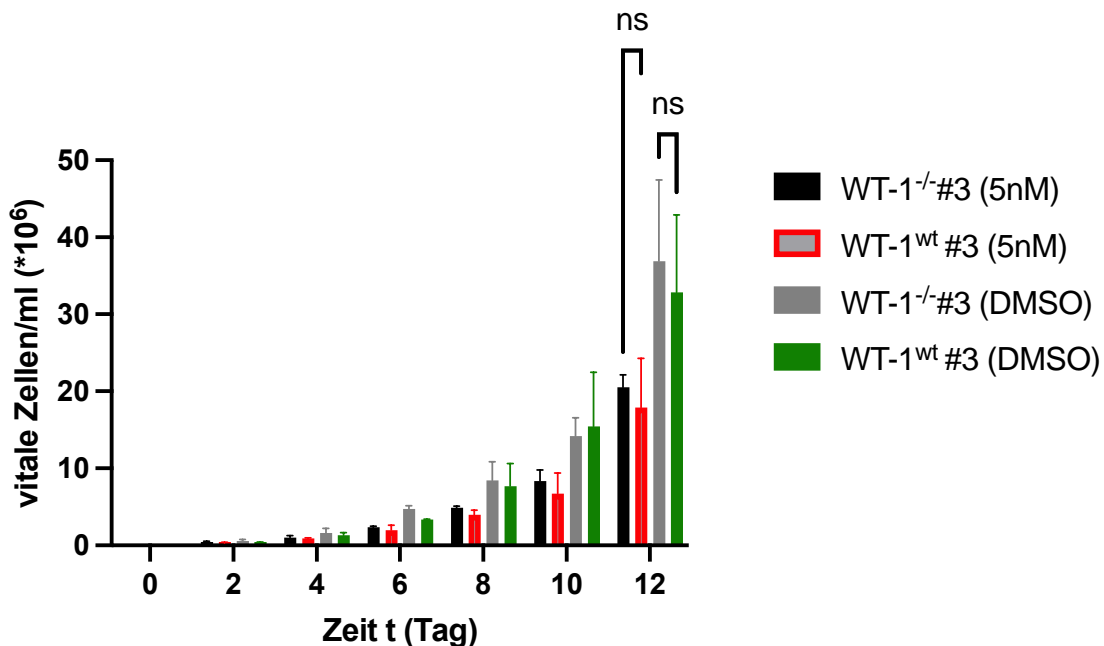
### 3.1.2.2 Viabilität von K562 WT1<sup>wt</sup> versus K562 WT1<sup>-/-</sup> Zellen unter Behandlung mit Daunorubicin

Nachdem die Klone K562 WT1<sup>wt</sup> #3 und K562 WT1<sup>-/-</sup> #3 unter der Ara-C Behandlung ähnlich wuchsen (siehe Kapitel 3.1.2.1), wurden diese beiden Klone für den folgenden Versuch ausgewählt. In der Zellkultur wurden K562 WT1<sup>wt</sup> #3 und K562 WT1<sup>-/-</sup> #3 Zellen dahingehend getestet, ob die Behandlung mit Daunorubicin die Wachstums-Kurve beeinflusst. Dabei wurden die Zellen K562 WT1<sup>wt</sup> und WT1<sup>-/-</sup> jeweils in einer Dichte von  $0.15 \cdot 10^6$  Zellen/ml in getrennten Wells ausgesät und über 14 Tage dem Wirkstoff (Konzentration 5nM) ausgesetzt. Die Konzentration wurde in Vorversuchen anhand einer Dosis-Wirkungs-Kurve ermittelt und liegt im Bereich des IC50 Wertes (5.2 nM). In diesem Langzeitassay (siehe Kapitel 2.2.2.9) wurde die Viabilität im Abstand von 48 h gemessen und danach der Wirkstoff in einer solchen

## Ergebnisse

Konzentration erneut dem Medium hinzugefügt, dass die Endkonzentration (5nM) des Wirkstoffs konstant blieb. Insgesamt wurde das Experiment über 14 Tage durchgeführt. Durch den Langzeitversuch sollte der Effekt von Daunorubicin auf die Dosis-Wirkungs-Kurve eindrücklicher zu sehen sein. Eine deutlichere Wirkungsentfaltung von Daunorubicin im Langzeitversuch hat sich bei früheren Arbeiten mit diesem Wirkstoff in unserem Labor gezeigt und dieser Versuchsaufbau hat sich etabliert (45). Als Kontrolle dienten mit DMSO behandelte Zellen. Wie erwartet kann man sehen, dass die Ansätze unter Behandlung mit 5 nM Daunorubicin ab Tag 12 ein signifikant geringeres Wachstum im Vergleich zu der jeweiligen DMSO Kontrolle aufweisen (K562 WT1<sup>wt</sup> #3 vs DMSO: p=0.0009; K562 WT1<sup>-/-</sup> #3 vs DMSO: p= 0.0003).

Dagegen zeigt sich die Anzahl der vitalen K562 WT1<sup>wt</sup> und WT1<sup>-/-</sup> Zellen nicht signifikant unterschiedlich unter Daunorubicin Behandlung (p=0.8706) beziehungsweise unter DMSO (p=0.6498).



**Abbildung 10** Wachstum von K562 WT1<sup>wt</sup> und WT1<sup>-/-</sup> Klonen unter Daunorubicin Behandlung (n=2).

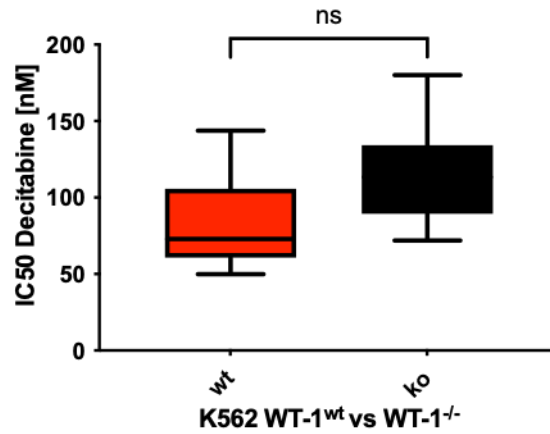
Die Zellen wurden mit 5 nM Daunorubicin oder DMSO behandelt. In rot wird K562 WT1<sup>wt</sup> #3 und in schwarz K562 WT1<sup>-/-</sup> #3 dargestellt. Die vitalen Zellen/ml wurden hier in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Zellen behandelt mit DMSO dienen als Kontrolle. Die Signifikanz wurde mit Anova bestimmt. Zur besseren Übersicht wurde die Signifikanz von WT1<sup>wt</sup> und WT1<sup>-/-</sup> unter Daunorubicin versus die jeweilige Kontrolle nicht in der Abbildung dargestellt.

### 3.1.2.3 Viabilität von K562 WT1<sup>wt</sup> versus K562 WT1<sup>-/-</sup> Zellen unter Behandlung mit Decitabin

Die K562 WT1<sup>wt</sup> (#1, #3 und #7) und WT1<sup>-/-</sup> Zellen (#3, #4 und #9) wurden in einer Dichte von jeweils 0.15\*10<sup>6</sup> Zellen/ml in separaten Wells ausgesät. Unter der Behandlung mit Decitabin (Konzentrationen: 0.01; 0.05; 0.1; 0.5; 1; 2.5; 5 µM) für 72 h zeigte sich zwischen

## Ergebnisse

der Viabilität von K562 WT1<sup>wt</sup> und WT1<sup>-/-</sup> Zellen kein signifikanter Effekt auf die Dosis-Wirkungs-Kurven. In Abbildung 11 sind die IC<sub>50</sub> Werte von K562 WT1<sup>wt</sup> und WT1<sup>-/-</sup> Zellen abgebildet ( $p=0.1298$ ), welche anhand der Dosis-Wirkungs-Kurve berechnet wurden.



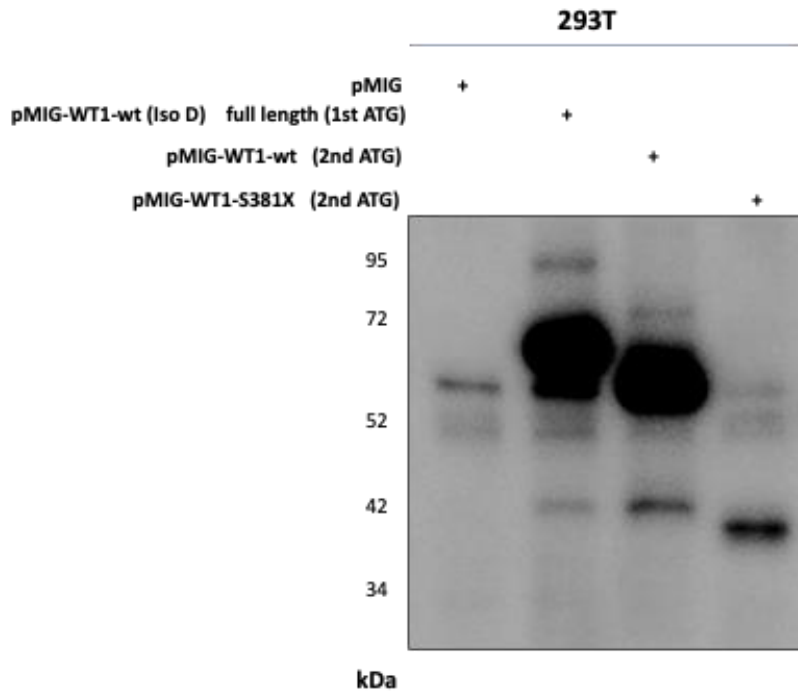
**Abbildung 11 Viabilität von K562 WT1<sup>wt</sup> und WT1<sup>-/-</sup> Klonen unter Decitabin Behandlung nach 72 h (n =3).**

Der Mittelwert der IC<sub>50</sub> Werte der einzelnen K562 WT1<sup>wt</sup> (rot) und WT1<sup>-/-</sup> (schwarz) Klone wurde bestimmt und der IC<sub>50</sub> Wert in nM dargestellt. Die Signifikanz wurde mit dem unpaired t-Test bestimmt.

### 3.1.3 Einfluss von WT1 Mutationen auf die Viabilität von K562 Zellen im Doxycyclin induzierbaren System

Zunächst haben wir durch WT1 Knockout Auswirkungen auf die Dosis-Wirkungs-Kurve der Tumorzellen unter Behandlung mit Chemotherapeutika untersucht. Anschließend haben wir für den direkten Vergleich von WT1 Wildtyp und WT1 Knockout in einer Zelle ein induzierbares System gewählt. Durch CRISPR/Cas9 kann es im WT1 Knockout System zur Selektion von einzelnen Klonen mit bestimmten Eigenschaften kommen. In dem induzierbaren System wird die Re-expression des Zielgens durch Zugabe von Doxycyclin ermöglicht, da ein Doxycyclin sensitiver Promoter des Zielgens vorliegt. Dadurch ist eine bessere Vergleichbarkeit von Knockout und Wildtyp möglich. Dieses Testsystem ist durch Zugabe von Doxycyclin kontrollierbar. Zudem kann das Gen in den Zellen überexprimiert werden. Dazu wurde in einem K562 WT1-Knockout (WT1<sup>-/-</sup>) Klon entweder WT1 Wildtyp (WT1<sup>wt</sup>) oder das mutierte WT1 Gen (WT1<sup>mut</sup>) via PiggyBac (PB) System stabil transfiziert. Der PiggyBac Vektor, die sog. sleeping beauty, dient als backbone für das Gen, mit dessen Hilfe das Gen in das Genom der Zelle integriert wird. Es wurde sowohl WT1<sup>wt</sup> als auch WT1<sup>mut</sup> separat re-exprimiert. In diesem induzierbaren System haben wir den Einfluss von WT1<sup>wt</sup> und WT1<sup>mut</sup> versus WT1<sup>-/-</sup> auf die Viabilität der Zellen unter der Behandlung mit Chemotherapeutika untersucht. Zur Kontrolle wurde ebenfalls der Ausgangs-Klon K562 WT1<sup>-/-</sup> #9 untersucht (siehe Kapitel 2.2.1.8).

Im Folgenden wurde für die Re-expression von WT1 in Knockout Zellen die Isoform D verwendet. Das Konstrukt bezieht sich dabei auf die Transkriptionsvariante NM\_024426.4 (NCBI, Origen). Dadurch zeigen die PB-Zellen eine größere Proteingröße als nativ K562 bzw. 293T Zellen (vgl. Abb. 12). Die Mutationen, die hier verwendet werden, beziehen sich ebenfalls auf die Isoform D (siehe Kapitel 1.3.2).



**Abbildung 12 pMIG-WT1-wt (Iso D) full length (1<sup>st</sup> ATG) und pMIG-WT1-wt (2<sup>nd</sup> ATG).**

Zu erwartende Größe bei WT1 in 293T Zellen 51kDa. Hier sieht man zum Vergleich die Isoform D translatiert ab dem ersten (68,49 kDa) und zweiten (60,39 kDa) ATG Startcodon. Das Produkt der Translation der Isoform D ab dem zweiten ATG ist 68 ASS kürzer. In dieser Arbeit wurde jeweils die Isoform ab dem ersten Startcodon verwendet.

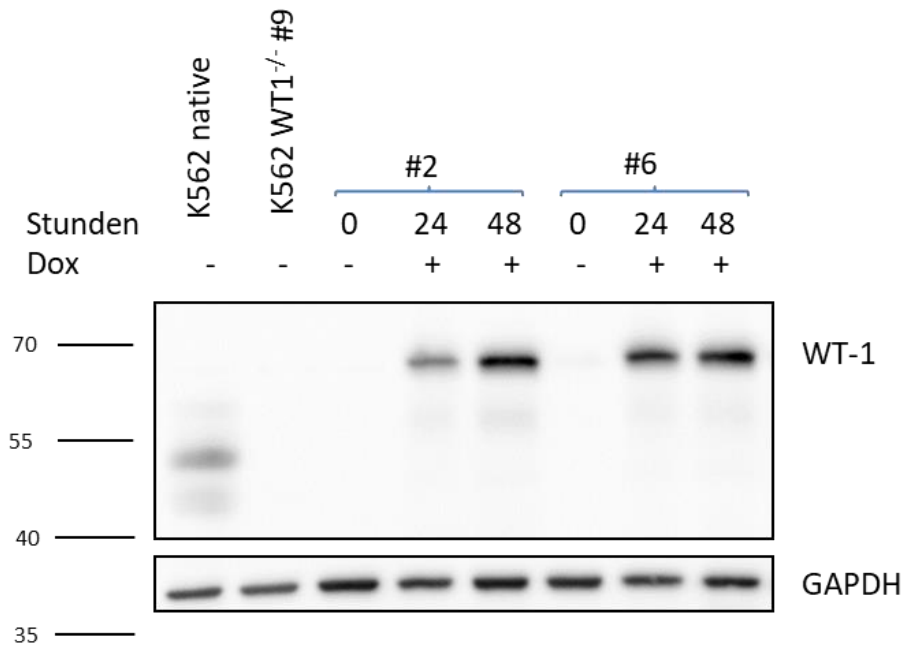
Wiederum wurden die Klone über 72 h mit Ara-C oder Decitabin behandelt und die Viabilität gemessen. Versuche mit Daunorubicin konnten aufgrund des großen zeitlichen Aufwandes für diese Arbeit nicht erstellt werden.

### 3.1.3.1 Einfluss von Doxycyclin auf die Expression von WT1 und die Viabilität von K562 Zellen

Das PiggyBac System muss mindestens 48 h vor Start des Experiments mit Doxycyclin induziert werden. Die Vorinkubationzeit wurde mithilfe einer Kinetikanalyse für Doxycyclin ermittelt. Dabei wurde das PiggyBac System in den K562-Zellen 24 h, 48 h und 72 h vor Herstellung der Lysate mit 1 µg/ml Doxycyclin induziert. Als Kontrolle dienen die unbehandelten Zellen, deren Lysat keine WT1-Expression zeigt (0 h). Anhand der Expressionsdaten lässt sich erkennen, dass nach 24 h und 48 h die Lysate nach Induktion mit 1 µg/ml Doxycyclin ähnlich hohe Expressions-Level zeigen (vgl. Abb. 13), nach 72 h nahm die Expression von WT1 bereits ab. Daher wurden in der Versuchsreihe die K562-Zellen alle 48 h Doxycyclin ausgesetzt. Ebenfalls wurde die Konzentration von 1 µg/ml bzw. 0.2 µg/ml Doxycyclin (Dox) zunächst in Expressionsanalysen ermittelt. Da die Expression des Proteins von der Dosierung von Doxycyclin abhängig ist, wurde diese jeweils so gewählt, dass eine

## Ergebnisse

Expression von WT1 der Expression in K562 nativen Zellen entspricht. Bei WT1/PB<sup>D464G</sup> #6 war bei einer Konzentration von 1 µg/ml Doxycyclin die Expression von WT1 sehr stark ausgeprägt. Daher wählten wir aus mehreren Versuchen zuletzt die Konzentration 0.2 µg/ml Doxycyclin für diesen Klon. Die anderen Klone wurden mit 1 µg/ml Doxycyclin induziert.

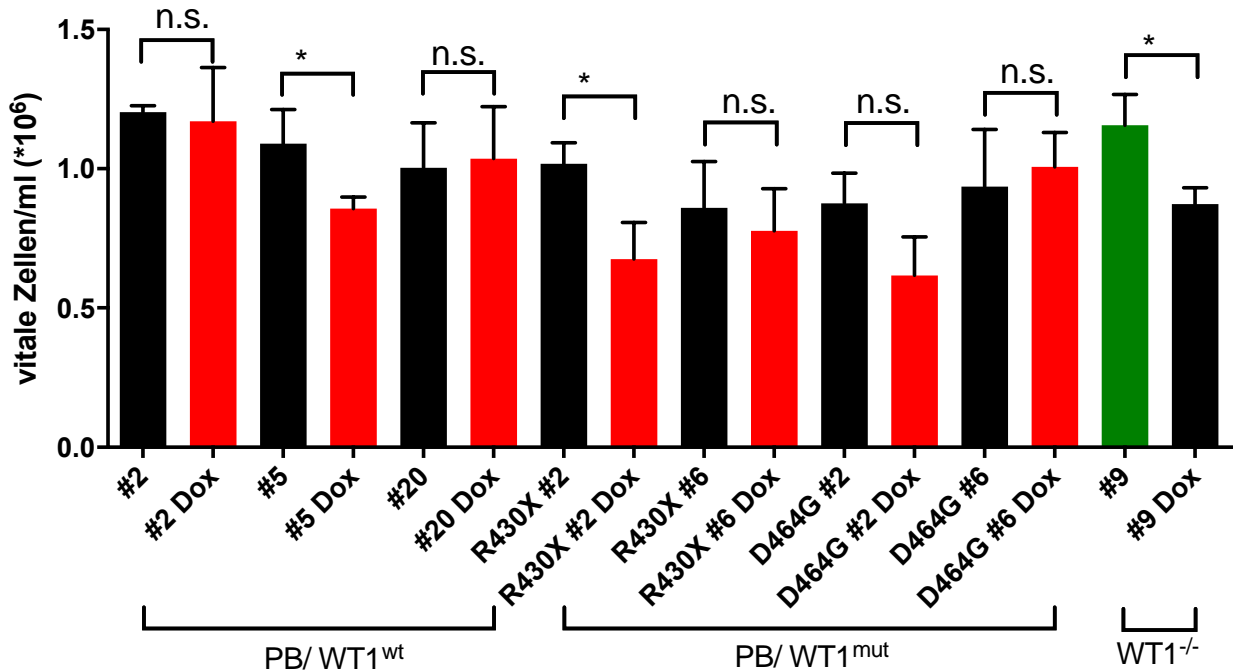


**Abbildung 13 Westernblot von PB/WT1<sup>mut</sup> in K562 WT1<sup>-/-</sup> Zellen.**

PB/WT1<sup>D464G</sup> wurde in K562 WT1<sup>-/-</sup> via PiggyBac Vektor re-exprimiert. Die Zellen wurden mit 1 µg/ml Doxycyclin über 0, 24, 48 h behandelt und die Expression von WT1 zu den unterschiedlichen Zeitpunkten verglichen. Hier sind zwei PB/WT1<sup>D464G</sup> Klone (#2, #6) zu sehen. Als Kontrolle wurde ein K562 nativ (51 kDa) und K562 WT1<sup>-/-</sup> Zell-Lysat aufgetragen und GAPDH als Ladekontrolle verwendet.

Ferner untersuchten wir den Einfluss von Doxycyclin auf die Viabilität von K562 Zellen. Es stellte sich heraus, dass bereits die Verwendung kleiner Konzentrationen von Doxycyclin (0.2-1 µg/ml) einen signifikanten Einfluss auf die Viabilität einiger Klone (PB/WT1<sup>wt</sup> #5 (p=0.0357); PB/WT1<sup>R430X</sup> #2 (p=0.017); WT1<sup>-/-</sup> #9 (p=0.0171)) nach 48 h Inkubation ausübt. Dies betrifft jeweils einen WT1<sup>wt</sup>, WT1<sup>mut</sup> Klon und den WT1<sup>-/-</sup> Klon. Dabei wachsen die Klone unter Doxycyclin Behandlung schlechter. Die weiteren Klone zeigten keinen signifikanten Unterschied unter Doxycyclin Behandlung.

## Ergebnisse



**Abbildung 14 Viabilität der K562 PB/WT1<sup>wt</sup>, PB/WT1<sup>mut</sup> und WT1<sup>-/-</sup> (n=6).**

Der WT1<sup>-Dox</sup> Klon (schwarz) wurde mit dem WT1<sup>+Dox</sup> Klon (induziert mit 1 µg/ml Doxycyclin; Ausnahme PB/WT1<sup>D464G</sup>#6: 0.2µg/ml Doxycyclin) (rot) verglichen. Signifikanzen (\*) wurden mit unpaired t-Test berechnet und werden angegeben gemäß: p<0.05(\*); p<0.01(\*\*); p<0.001 (\*\*\*)

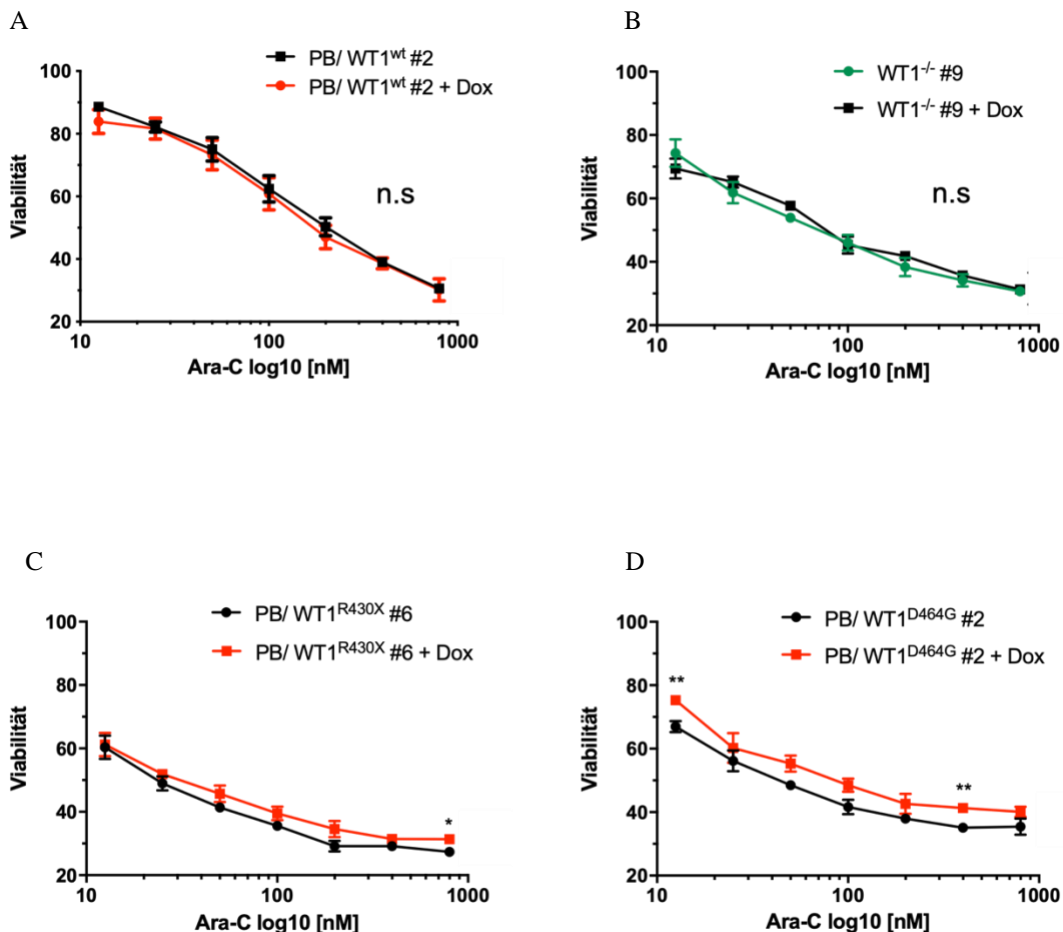
### 3.1.3.2 Viabilität von K562 Zellen (PB/WT1<sup>wt</sup>, PB/WT1<sup>mut</sup>, WT1<sup>-/-</sup>) unter Behandlung mit Cytarabin (Ara-C)

In den im Folgenden genannten K562 Zellen wurde jeweils WT1<sup>wt</sup> oder WT1<sup>mut</sup> via dem PiggyBac Vektor re-exprimiert (siehe Kapitel 2.2.1.7). Die Zellen PB/WT1<sup>wt</sup> (Klone: #2, #5 und #20), PB/WT1<sup>D464G</sup> (Klone: #2 und #6), PB/WT1<sup>R430X</sup> (Klone: #2 und #6) und WT1<sup>-/-</sup>#9 wurden in einer Dichte von 0.15\*10<sup>6</sup> Zellen/ml ausgesät. 48 h vor Start der Experimente, zum Startzeitpunkt und 24 h später, wurde jeweils zu einem Ansatz Doxycyclin (Konzentration: 1 µg/ml Doxycyclin; Ausnahme PB/WT1<sup>D464G</sup>#6: 0.2 µg/ml Doxycyclin) gegeben. Die Zellen wurden über 72 h unter den gleichen Kulturbedingungen und Ara-C Konzentrationen (12.5; 25; 50; 100; 200; 400; 800 nM) behandelt. Anschließend wurde die Viabilität von K562 Zellen mit fehlender Expression von WT1 (K562 PB/WT1<sup>-Dox</sup>) und mit Expression von WT1<sup>wt</sup> oder mut (K562 PB/WT1<sup>+Dox</sup>) verglichen. Die Werte wurden in Relation zur jeweiligen Kontrolle gesetzt, welche bei K562 PB/WT1<sup>+Dox</sup> Zellen mit DMSO und Doxycyclin und bei K562 PB/WT1<sup>-Dox</sup> Zellen nur mit DMSO behandelt wurden. Bei den folgenden Werten wurde ANOVA zur Bestimmung der Signifikanz der Viabilitäten angewandt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Viabilität von K562 PB/WT1<sup>wt/-Dox</sup> #2 versus PB/WT1<sup>wt/+Dox</sup> #2 unter Behandlung mit Ara-C (p=0.5870) (vgl. Abb. 15 A). Ebenfalls weist der Klon K562 WT1<sup>-/-</sup> #9<sup>-Dox</sup> versus WT1<sup>-/-</sup> #9<sup>+Dox</sup> keine Signifikanz in der Viabilität auf (p=0.5870) (Abb. 17 B). Auch bei K562 PB/WT1<sup>R430X</sup> #6 (p=0.1343) besteht keine Signifikanz (vgl. Abb. 15 C),



## Ergebnisse

während die Viabilität bei K562 PB/WT1<sup>D464G</sup> #2 signifikant ist ( $p=0.0022$ ) (vgl. Abb. 15 D). Sowohl bei der K562 PB/WT1<sup>R430X</sup> Stoppmutante als auch der K562 PB/WT1<sup>D464G</sup> Punktmutante ist bei höheren Konzentrationen von Ara-C in einzelnen Messpunkten ein signifikanter Unterschied der Viabilitäten mit dem multiple t-test zu bestimmen (vgl. Abb. 15). So zeigt der Klon PB/WT1<sup>R430X</sup> #6 bei einer Konzentration von 800 nM einen signifikanten Unterschied ( $p=0.04187$ ) und PB/WT1<sup>D464G</sup> #2 bei einer Konzentration von 400 nM ( $p=0.0015$ ). Die jeweiligen Viabilitäten der Klone PB/WT1<sup>wt</sup> #2 und WT1<sup>-/-</sup> #9 bei gleicher Konzentration unterscheiden sich nicht signifikant. Dies gilt ebenfalls für die Klone PB/WT1<sup>wt</sup> (#5 und #20), PB/WT1<sup>R430X</sup> #2 und PB/WT1<sup>D464G</sup> #6, welche hier nicht eigens durch einen Graphen aufgeführt sind.



**Abbildung 15 Viabilität von K562 PB/WT1<sup>wt</sup>, PB/WT1<sup>-/-</sup> und PB/WT1<sup>mut</sup> unter Ara-C Behandlung (n=3).** Die K562 Zellen wurden über 72 h mit Cytarabin behandelt (Konzentrationen: 12.5; 25; 50; 100; 200; 400; 800 [nM]). Es wird jeweils der PB/WT1<sup>-Dox</sup> Klon (schwarz) und der PB/WT1<sup>+Dox</sup> Klon (1µg/ml Doxycyclin) (rot) beziehungsweise der WT1<sup>-/-</sup>#9<sup>-Dox</sup> Klon (grün) und WT1<sup>-/-</sup>#9<sup>+Dox</sup> Klon verglichen. Die Viabilitäten wurden in Relation zur mit DMSO bzw. und Doxycyclin behandelten Kontrolle ausgewertet (Kontrolle entspricht 100%). Die Signifikanz (\*) ist angegeben gemäß:  $p<0.05$ (\*);  $p<0.01$ (\*\*);  $p<0.001$ (\*\*\*).

## Ergebnisse

Ergänzend wurden die IC50 Werte aller untersuchten Klone bestimmt. Es wurden drei PB/WT1<sup>wt</sup> (#2, #5 und #20) Klone und je zwei Klone der Punktmutante PB/WT1<sup>R430X</sup> (#2, #6) und Stoppmutante PB/WT1<sup>D464G</sup> (#2, #6) untersucht. Auch der Ausgangs-Klon WT1<sup>-/-</sup> #9 wurde untersucht. Die Sigifikanz der IC50 Werte von K562 PB/WT1<sup>-Dox</sup> versus PB/WT1<sup>+Dox</sup> sind jeweils mit dem unpaired t-test berechnet worden (siehe Abbildung 16 von links nach rechts: p=0.5439; p=0.5001; p=0.7084; p=0.9513; P=0.959; p=0.3726; p=0.5032; p=0.2093). Die IC50 Werte von induziertem Klon und Kontrolle sind alle nicht signifikant. Auch die Varianzen der jeweiligen IC50 Werte von PB/WT1<sup>-Dox</sup> versus PB/WT1<sup>+Dox</sup> unterscheiden sich nicht signifikant. Der Klon PB/ WT1<sup>wt</sup> #2 weicht von den anderen Klonen mit einem höheren IC50 Wert ab.

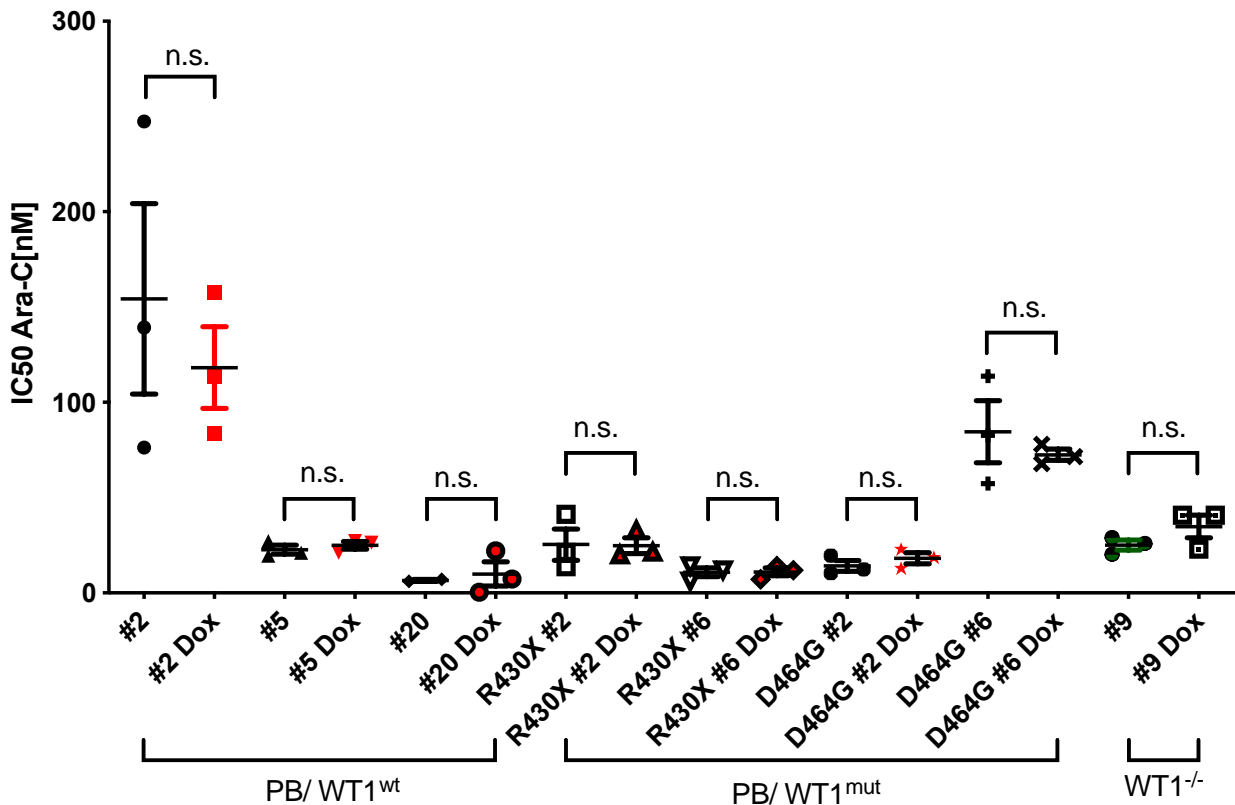


Abbildung 16 IC50 Werte der K562 PB/WT1<sup>wt</sup>, PB/WT1<sup>mut</sup> und WT1<sup>-/-</sup> Zellen unter Cytarabin Behandlung (n=3).

Es wird jeweils der PB/WT1<sup>-Dox</sup> Klon (schwarz) und der PB/WT1<sup>+Dox</sup> Klon (rot) (1 µg/ml Doxycyclin; Ausnahme PB/ WT1<sup>D464G</sup>#6: 0.2 µg/ml Doxycyclin) beziehungsweise der WT1<sup>-/-</sup>#9<sup>-Dox</sup> (grün) verglichen. Der IC50 Wert ist in nM angegeben.

### 3.1.3.3 Viabilität der K562 Zellen (PB/WT1<sup>wt</sup>, PB/WT1<sup>mut</sup>, WT1<sup>-/-</sup>) unter Decitabin Behandlung

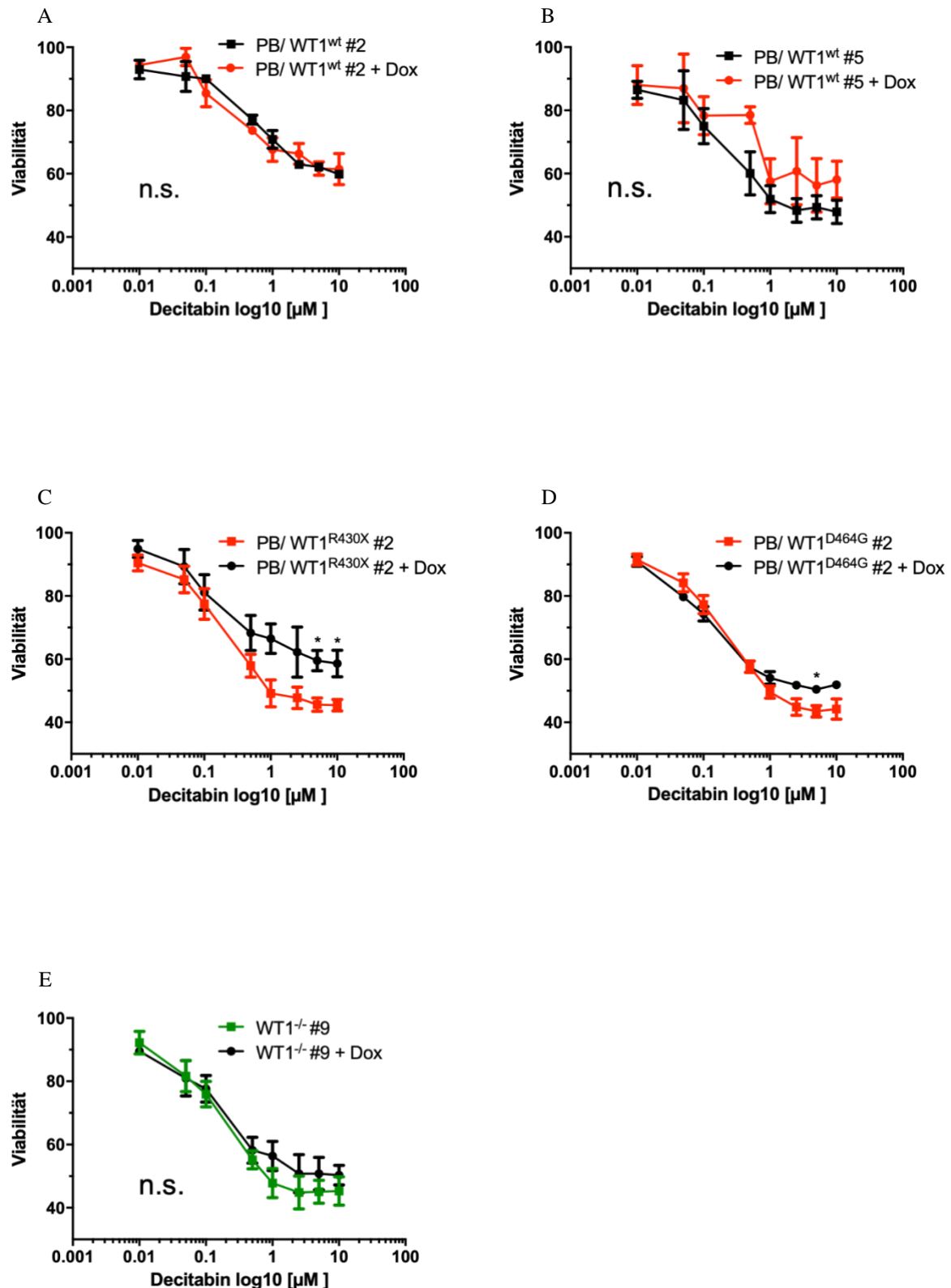
Die Klone von K562 PB/WT1<sup>wt</sup> (Klone: #2 und #5), PB/WT1<sup>D464G</sup> (Klone: #2 und #6), PB/WT1<sup>R430X</sup> (Klone: #2 und #6) und WT1<sup>-/-</sup> #9 wurden 72 h mit Decitabin (Konzentrationen:

## Ergebnisse

---

0.01; 0.05; 0.1; 0.5; 1; 2.5; 5; 10  $\mu$ M) behandelt. Die Zellen wurden jeweils in einer Dichte von  $0.15 \cdot 10^6$  Zellen/ml ausgesät. 48 h vor Start der Experimente, zum Startzeitpunkt und 24 h später, wurde jeweils zu einem Ansatz Doxycyclin (1  $\mu$ g/ml Doxycyclin; Ausnahme PB/WT1<sup>D464G</sup> #6: 0.2  $\mu$ g/ml Doxycyclin) gegeben. Anschließend wurde die Viabilität von K562 Zellen mit fehlender Expression (K562 PB/WT1<sup>-Dox</sup>) und mit Expression von WT1<sup>wt</sup> oder mut (K562 PB/WT1<sup>+Dox</sup>) anhand der Dosis-Wirkungs-Kurven verglichen. Die Viabilität ist dabei in Relation zu einer Kontrolle, welche entweder nur mit DMSO oder DMSO und Doxycyclin behandelt wurde, bestimmt worden. Unter der Decitabin Behandlung wird ein deutliches Plateau der Viabilität bereits bei niedrigen Konzentrationen erreicht (vgl. Abb. 17). Auch durch eine weitere Erhöhung der Konzentration von Decitabin sterben nicht mehr Zellen ab. Die Viabilität der induzierten Zellen PB/WT1<sup>mut</sup> kann dabei nicht unter 50-60% der Viabilität, der mit DMSO behandelten Kontrolle, gesenkt werden. Der IC50 Wert wurde berechnet (vgl. Abb. 18) und die Signifikanz der Viabilitäten der Dosis-Wirkungs-Kurven wurden mit dem Anova Test berechnet. Sowohl bei PB/WT1<sup>wt</sup> #2 (+Dox. vs. -Dox.:  $p=0.9816$ ) als auch bei PB/WT1<sup>wt</sup> #5 (+Dox vs. -Dox.:  $p=0.3793$ ) sind die Dosis-Wirkungs-Kurven nicht signifikant abweichend. Auch die Dosis-Wirkungs-Kurven von K562 WT1<sup>-/-</sup> #9 unterscheiden sich nicht signifikant (+Dox vs. -Dox:  $p=0.5860$ ). Ebenfalls unterscheiden sich die Dosis-Wirkungs-Kurven der Klone K562 PB/WT1<sup>R430X</sup> #2 (+Dox vs. -Dox:  $p=0.1503$ ) und PB/WT1<sup>D464G</sup> #2 (+Dox vs. -Dox:  $p=0.3571$ ) nicht signifikant. Jedoch unterscheiden sich die einzelnen Viabilitäten der Klone K562 PB/WT1<sup>R430X</sup> #2<sup>+Dox</sup> und PB/WT1<sup>D464G</sup> #2<sup>+Dox</sup> bei steigender Konzentration signifikant zur nicht mit Doxycyclin behandelten Kontrolle, während bei niedrigen Konzentrationen keine Signifikanz vorliegt (vgl. Abb. 17 C). Bei hohen Konzentrationen von Decitabin sterben weniger Zellen der induzierten Klone PB/WT1<sup>R430X</sup> #2<sup>+Dox</sup> und PB/WT1<sup>D464G</sup> #2<sup>+Dox</sup> als der nicht induzierten Kontrolle. Dazu wurde ein multiple t-test der Dosis-Wirkungs-Kurven durchgeführt. Ab einer Konzentration von 5  $\mu$ M ist die Viabilität von PB/WT1<sup>R430X</sup> #2 signifikant ( $p=0.023295$ ;  $p=0.044812$ ) und unter einer Behandlung mit 5  $\mu$ M Decitabin ist die Viabilität von PB/WT1<sup>D464G</sup> #2 ( $p=0.033946$ ) signifikant. Die Viabilitäten der Klone K562 PB/WT1<sup>R430X</sup> #6<sup>+Dox</sup> und PB/WT1<sup>D464G</sup> #6<sup>+Dox</sup> sind nicht signifikant. Die jeweiligen Graphen werden hier nicht eigens angeführt.

## Ergebnisse



**Abbildung 17 Viabilität von K562 PB/WT1<sup>wt</sup>, K562 PB/WT1<sup>mut</sup> und WT1<sup>-/-</sup> unter Decitabin Behandlung (n=3).**

Die Zellen wurden über 72 h mit Decitabin inkubiert (Konzentrationen: 0.01; 0.05; 0.1; 0.5; 1; 2.5; 5; 10 [µM]). Es wird jeweils der PB/WT1<sup>-Dox</sup> Klon (schwarz) und der PB/WT1<sup>+Dox</sup> Klon (1 µg/ml Doxycyclin induziert; Ausnahme PB/WT1<sup>D464G</sup>#6: 0.2 µg/ml Doxycyclin) (rot) beziehungsweise der WT1<sup>-/-</sup> #9<sup>-Dox</sup> (grün) verglichen. Die Viabilität wurden in Relation zur mit DMSO behandelten Kontrolle ausgewertet. Die Signifikanz (\*) wird bestimmt wie folgt: p < 0.05 (\*); p < 0.01 (\*\*); p < 0.001 (\*\*\*)

## Ergebnisse

Die IC50 Werte der untersuchten Klone unterscheiden sich unter Induktion mit Doxycyclin nicht signifikant von der jeweiligen Kontrolle ohne Zugabe von Doxycyclin. Einzige Ausnahme stellt K562 PB/WT1<sup>D464G</sup> #2 dar (p=0.0258). Hier liegt der IC50 von K562 PB/WT1<sup>D464G</sup> #2<sup>+Dox</sup> niedriger als bei der Kontrolle.

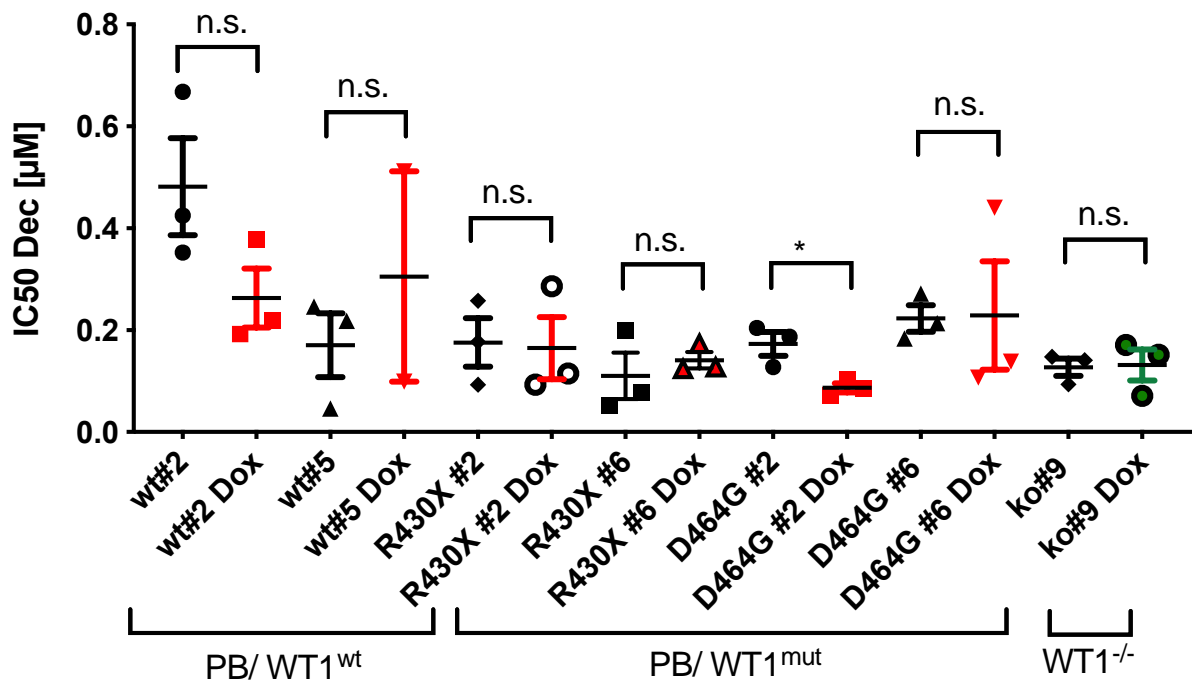


Abbildung 18 IC50 Werte von K562 PB/WT1<sup>wt</sup>, K562 PB/WT1<sup>mut</sup> und WT1<sup>-/-</sup> unter Decitabin Behandlung (n=3).

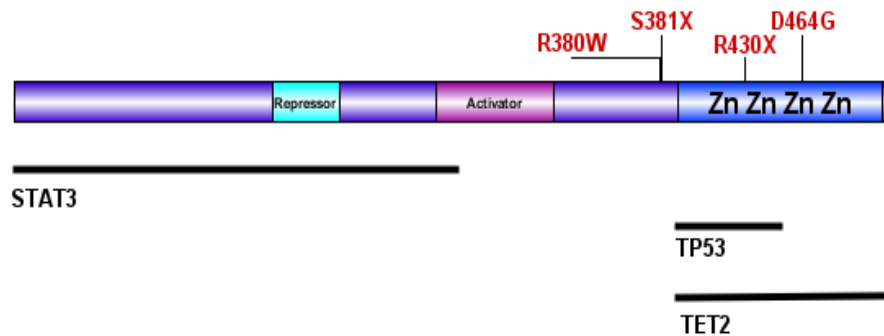
Es wird jeweils der PB/WT1<sup>-Dox</sup> Klon (schwarz) und der PB/WT1<sup>+Dox</sup> Klon (rot) (1 µg/ml Doxycyclin; Ausnahme PB/WT1<sup>D464G</sup> #6: 0.2 µg/ml Doxycyclin) beziehungsweise der WT1<sup>-/-</sup> #9<sup>+Dox</sup> (grün) verglichen. Der IC50 Wert wird in µM angegeben.

## 3.2 Charakterisierung von WT1-Proteininteraktionen

Bei der funktionellen Untersuchung der Zellen im Viabilitäts-Assay konnte kein signifikanter Unterschied der Viabilität von K562 Zellen mit WT1 Wildtyp gegenüber K562 mit WT1 Knockout festgestellt werden. Bei einzelnen WT1 Mutanten gab es unter bestimmten Zytostatika Konzentrationen Unterschiede in der Viabilität der Zellen. Durch die Untersuchung der Interaktion von WT1 mit Interaktionspartnern (TP53, STAT3, TET2) wollen wir eine mögliche Erklärung für die Viabilitätsunterschiede der K562 Zellen mit WT1 Mutationen gegenüber den K562 WT1 Knockout Zellen bei Zytostatika-Behandlung mit Ara-C und Decitabin finden. Im Folgenden wurde die Interaktion von WT1 und den mutierten WT1-Proteinen mit bekannten Interaktionspartnern (siehe Kapitel 1.3.4) untersucht.

### 3.2.1 Grundlagen der Interaktion von WT1 Wildtyp und WT1 Mutationen mit Interaktionspartnern

In Abbildung 19 wird das WT1 Protein schematisch dargestellt. Ebenfalls zu sehen ist die Lokalisation der in dieser Arbeit verwendeten WT1 Mutationen auf dem WT1 Protein und die Bindungsstellen (18, 29) der zu untersuchenden Interaktionspartner (TP53, STAT3, TET2).



**Abbildung 19 WT1 Struktur und Interaktion mit Proteinen.**

Der Transkriptionsfaktor WT1 interagiert mit STAT3, TP53 und TET2. Hier wird die in der Literatur beschriebene strukturelle Bindungsstelle der Interaktionsproteine mit der WT1 Isoform D dargestellt (18, 29).

**Tabelle 18 Größe der Isoform D und der WT1 Mutanten**

Protein	Größe
WT1 Isoform D = wt	1647bp = 549aa = 60,39kDa
WT1 S381X	1143bp = 381aa = 41,91kDa
WT1 R430X	1290bp = 430aa = 47,3kDa

## Ergebnisse

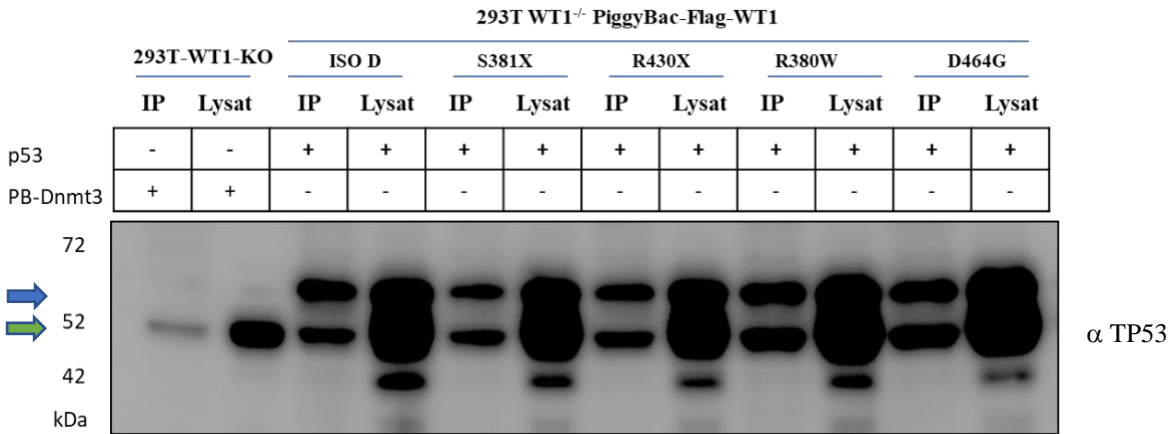
WT1 R380W	1647bp = 549aa = 60,39kDa
WT1 D464G	1647bp = 549aa = 60,39kDa

Es wurden HEK 293T-WT1-KO Zellen (siehe Kapitel 2.2.1.8.1) mit WT1<sup>wt</sup> bzw. WT1<sup>mut</sup> und den genannten Interaktionspartnern co-transfiziert. 293T Zellen entstehen aus der humanen embryonalen Kidney (HEK) Zelllinie und sind als Modell für Transfektionsexperimente etabliert (53). WT1<sup>wt</sup> (Isoform D) oder WT1<sup>mut</sup> (S381X, R430X, R380W, D464G) und jeweils ein Interaktionspartner (STAT3, TP53, TET2) wurden in die Zellen transfiziert, und nach 48 h Lysate angefertigt. Zur Kontroll wurde die PB-DNMT3a (DNA (cytosine-5-) -methyltransferase 3) Sequenz ebenfalls in 293T-WT1-KO Zellen transfiziert. DNMT3a wird nicht vom WT1 Antikörper in der Immunpräzipitation (IP) erkannt und kann so hilfsweise als Negativ-Kontrolle dienen. WT1<sup>wt</sup> und WT1<sup>mut</sup> wurden via PB Vektor transfiziert. Die WT1 Sequenz hat jeweils am N-terminalen Ende eine FLAG Sequenz. Zunächst wurde mit Anti-FLAG-Antikörpern die FLAG-Sequenz des WT1-Proteins mit FLAG-Tag erkannt und dadurch WT1 in der Immunpräzipitation gebunden. Anschließend wurde im Immunpräzipitat mit dem spezifischen Antikörper für den jeweiligen Interaktionspartner (TP53, STAT3, TET2 bzw. als Kontrolle WT1) das jeweilige Protein im Westernblot detektiert. So kann die Interaktion zwischen WT1 und dem Interaktionspartner nachgewiesen werden. Die Interaktion von WT1 Wildtyp mit den folgenden Partnern wurde, wie in der Einleitung (Kapitel 1.3.4) beschrieben, bereits in der Literatur geprüft. So können wir als Positiv-Kontrolle WT1<sup>wt</sup> transfiziert mit einem der Interaktionspartner (TP53, STAT3 oder TET2) verwenden.

### 3.2.2 Immunpräzipitation von WT1 Wildtyp und WT1 Mutationen mit Interaktionspartnern

HEK 293T Zellen exprimieren endogenes p53 (54). Zunächst wurden die HEK 293T-WT1-KO Zellen mit WT1<sup>wt</sup> oder <sup>mut</sup> und anschließend mit TP53 transfiziert. Wie in Abbildung 20 zu sehen ist, wird TP53 im Westernblot detektiert. Das transfizierte TP53 Konstrukt zeigt, wie zu erwarten, eine Doppelbande im Westernblot, während bei 293T-WT1-KO das endogene p53 in einer Bande mit der erwarteten Größe 53 kDa sich darstellt. TP53 konnte bei allen Immunpräzipitaten und Lysaten der WT1 Mutanten im Westernblot nachgewiesen werden.

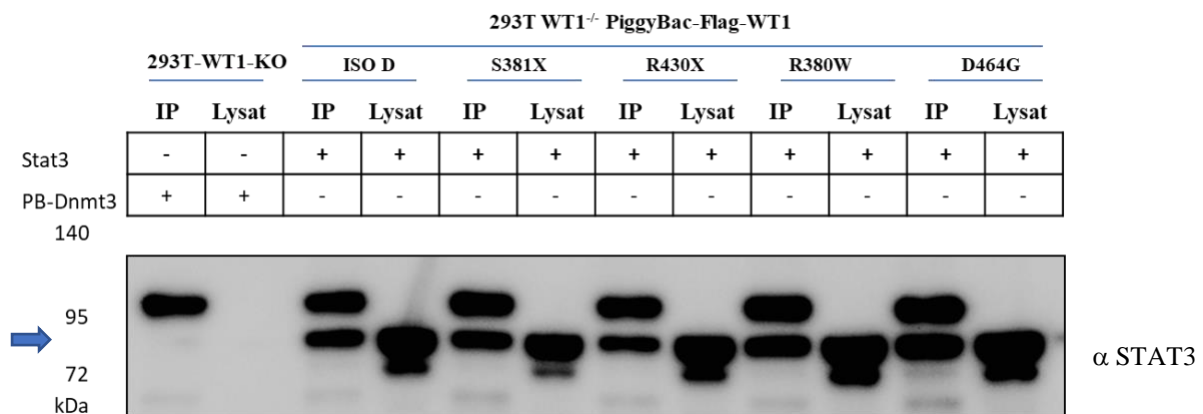
## Ergebnisse



**Abbildung 20 Immunpräzipitation von FLAG-WT1, Westernblotting gegen TP53.**

Alle Zellen ausgenommen 293T-WT1-KO wurden mit TP53 transfiziert und anschließend Lysate bzw. Immunpräzipitate (gegen FLAG-WT1) erstellt. Die Lysate und Immunpräzipitate wurden nebeneinander auf ein Gel aufgetragen und mit dem Antikörper gegen TP53 (erwartete Größe 53 kDa) detektiert. Die Negativ-Kontrolle ist 293T-WT1-KO. Als Positiv-Kontrolle dient Iso D co-transfiziert mit p53. Der grüne Pfeil weist auf die Größe des endogenen p53 hin. Der blaue Pfeil zeigt auf die zusätzliche Bande des TP53 Konstrukts.

Als nächstes wurden HEK 293T WT1<sup>-/-</sup> Zellen mit WT1<sup>wt</sup> oder mut und dann mit Stat3 transfiziert. STAT3 zeigt eine sehr geringe Expression in HEK 293T Zellen (55, 56). 293T-WT1-KO mit PB-DNMT3a dient als Negativ-Kontrolle. Als Positiv-Kontrolle wurde WT1<sup>wt</sup> transfiziert mit STAT3 gewählt. Beim Immunpräzipitat zeigt die untere Bande Stat3 bei 88 kDa. Die obere Bande bei 95 kDa ist unspezifisch und somit auch im Immunpräzipitat von 293T-WT1-KO zu sehen. Bei 293T-WT1-KO zeigt sich keine Interaktion von Stat3. Wir sehen eine Interaktion von allen WT1 Mutanten mit Stat3 in Abbildung 21.



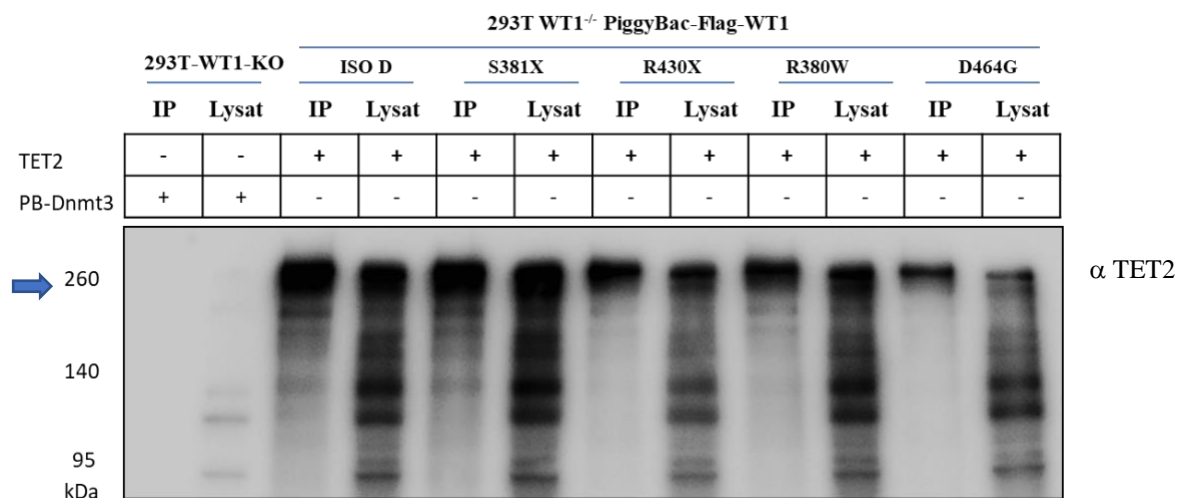
**Abbildung 21 Immunpräzipitation von FLAG-WT1, Westernblotting gegen Stat3.**

Alle Zellen wurden mit Stat3 transfiziert, anschließend wurden Lysate und daraus IPs erstellt. Die Lysate und IP-Lösungen wurden nebeneinander auf ein Gel aufgetragen und mit dem Antikörper gegen Stat3 (Pfeil: erwartete Größe 88 kDa) detektiert. Als Negativ-Kontrolle wurde der Vektor PB-DNMT3a (transfiziert in den 293T-WT1-KO Zellen) verwendet. Als Positiv-Kontrolle dient Stat3 co-transfiziert mit Iso D.



## Ergebnisse

Zuletzt wurden die HEK 293T-WT1-KO Zellen mit WT1<sup>wt</sup> oder mut und dann mit TET2 transfiziert. Wir sehen die Detektion von Tet2 in der Abbildung 22. Hek Zellen exprimieren sehr gering Tet2 (55, 57), daher ist wie zu erwarten beim Lysat von 293T-WT1-KO kaum eine Bande zu sehen. 293T-WT1-KO dient in der IP als Negativ-Kontrolle. Iso D transfiziert mit Tet2 ist unsere Positiv-Kontrolle. Bei den vier WT1-Mutanten kann Tet2 im Lysat und dem Immunpräzipitat nachgewiesen werden. Insgesamt sieht man einige unspezifische Banden bei den Lysaten, welche in der IP schwächer exprimiert werden.



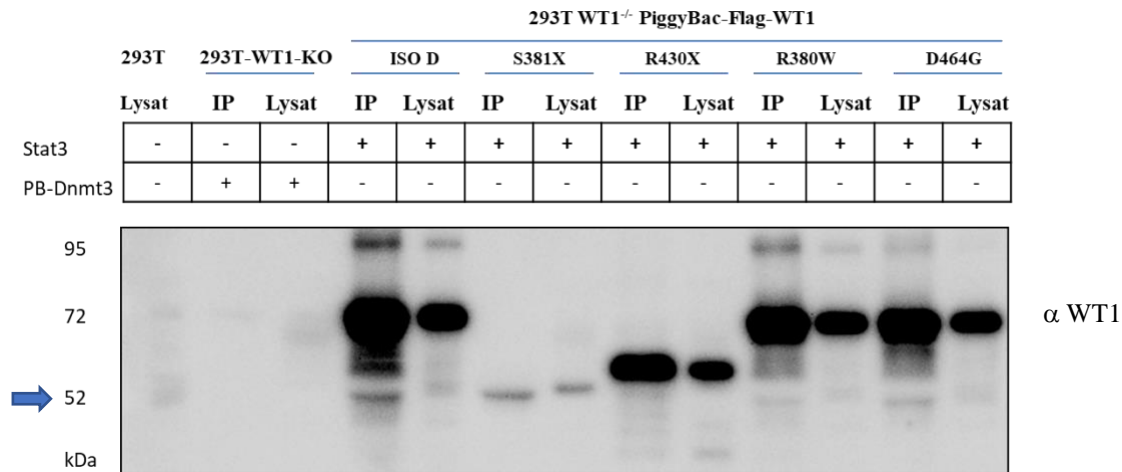
**Abbildung 22 Immunpräzipitation von FLAG-WT1, Westerblotting gegen TET2.**

Alle Zellen wurden mit TET2 transfiziert, daraus Lysate und anschließend IPs erstellt. Die Lysate und IP-Lösungen wurden nebeneinander auf ein Gel aufgetragen und mit dem Antikörper gegen Tet2 (erwartete Größe 224 kDa) detektiert. Als Negativ-Kontrolle wurde der Vektor PB-DNMT3a (293T-WT1-KO) verwendet. Als Positiv-Kontrolle wurde ISO D und TET2 co-transfiziert.

Zur Kontrolle der WT1-Spezifität des FLAG-Antikörpers wurden alle hier angeführten Membranen ebenfalls mit einem passenden Antikörper gegen WT1 geblotet. Hier wird nur die Membran von Stat3 angeführt. Für alle Lysate und Immunpräzipitate wurde die gleiche Menge an Protein verwendet. Das 293T Zelllysate zeigt eine geringe WT1-Expression und ist hier die Positiv-Kontrolle. Die Negativ-Kontrolle 293T-WT1-KO zeigt – wie erwartet – keine WT1-Expression. Die erwartete Höhe von WT1 unterscheidet sich je nach WT1 Mutation von endogenem WT1 (WT1 = 51 kDa; WT1 Isoform D = WT<sup>wt</sup> = 68.49 kDa; WT1 S381X = 49.84 kDa; WT1 R430X = 55.28 kDa; WT1 R380W = 68.49 kDa; WT1 D464G = 68.49 kDa). Die WT1 Mutante S381X zeigt eine deutlich verminderte Expression bzw. Anreicherung von WT1 im Vergleich zu den anderen WT1 Mutanten (vgl. Abb. 23). Da bei S381X die Expression der Proteinpartner in der IP im Vergleich zu den anderen Samples ähnlich ausfällt, könnte es sein, dass der WT1 Antikörper (D6M6S) die Stoppmutante schlechter erkennt als die anderen

## Ergebnisse

Konstrukte. Zudem wird in der IP das native Protein vom Antikörper erkannt, während im Westernblott mit dem Antikörper das denaturierte Protein auf der Membran geblottet wird.



**Abbildung 23 Immunpräzipitation von FLAG-WT1, Westernblotting gegen WT1.**

Hier wurden die Zellen mit STAT3 transfiziert und anschließend Lysate und IPs erstellt. Die Lysate und IP-Lösungen wurden nebeneinander auf ein Gel aufgetragen und mit dem Antikörper gegen WT1 (erwartete Größe 51 kDa siehe blauer Pfeil, bzw. je nach Mutante variiert die Größe vgl. Tab. 18) detektiert. Als Negativ-Kontrolle wurde der Vektor PB-DNMT3a (293T-WT1-KO) verwendet.

### 4 Diskussion

---

AML-Zellen sind fähig sich gemäß dem Prinzip der natürlichen Selektion von Charles Darwin an veränderte Lebensbedingungen anzupassen (58). So zeigen Genanalysen von Patientenmaterial eine höhere Mutationsrate von WT1 im Rezidiv im Vergleich zur Diagnose (22). Diese Mutationen scheinen eine Resistenz gegen Chemotherapeutika in den Zellen zu induzieren. In der vorliegenden Arbeit wurde im Zellmodell analysiert, ob WT1 Einfluss auf die Vermittlung von Resistenzmechanismen der Zellen ausübt. Bei den untersuchten WT1 Mutationen handelt es sich um Frameshift- und Insertions-Mutationen. Die Mutationen führen zu einem Frameshift bzw. einer Trunkierung im Bereich der Aminosäuren 281 bis 283 und 311 bis 315, dadurch kommt es zu einem Verlust der C-terminalen DNA-Bindungsstelle.

Zusammengefasst konnten wir unter Verwendung der K562-Zelllinie als Modell für die AML folgende Beobachtungen machen:

- 1) In den Viabilitäts-Assays konnten wir keinen signifikanten Unterschied zwischen K562 WT1<sup>wt</sup> versus K562 WT1<sup>-/-</sup> Zellen feststellen.
- 2) In Viabilitäts-Assays in einem induzierbaren System konnten wir keinen signifikanten Unterschied in der Viabilität zwischen K562 WT1<sup>wt</sup> gegenüber K562 WT1<sup>-/-</sup> Zellen feststellen. Wir konnten jedoch unter höheren Konzentrationen von Decitabin und Ara-C (5; 10  $\mu$ M Decitabin und 800 nM Ara-C) einen signifikanten Unterschied in der Viabilität der WT1-Mutanten R430X und D464G gegenüber WT1<sup>-/-</sup> erkennen.
- 3) In der Immunpräzipitation konnten wir die Interaktion von WT1 mit TP53, TET2 und STAT3 bestätigen. Eine Beeinflussung der Interaktion durch WT1-Mutationen konnten wir nicht erkennen.

### 4.1 Sensitivität gegenüber Standardchemotherapie im K562 WT1 Knockout Modell

In der AML ist die Rolle von WT1 umstritten. WT1 kommt in AML-Patienten sowohl überexprimiert als auch mutiert vor und wird in der Literatur sowohl als Tumorsuppressor als auch Onkogen diskutiert (59). Bis heute konnte die Rolle von WT1 in AML nicht klar erläutert werden und weitere Untersuchungen stehen aus.

In einer Studie von Marjanovic et al. wurden 104 CN-AML Patienten auf die WT1 Expression im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe untersucht. Dabei konnte man eine deutlich höhere Expression von WT1 in CN-AML Patienten sehen. Diese hohe WT1 Expression korrelierte dabei mit einem hohen Prozentanteil an Blasten im Knochenmark. In der Kontrollgruppe wurde WT1 in niedrigen Leveln in unreifen hämatopoetischen Zellen, den CD34<sup>+</sup> Zellen, detektiert. Dies gibt einen Hinweis auf die Bedeutung von WT1 in der Entwicklung der Hämatopoese. Hohe WT1-Level wurden in der Studie mit Therapieresistenz, geringer kompletter Remissionsrate (CR-Rate), geringerem krankheitsfreiem Überleben (DFS) und Gesamtüberleben (OS) assoziiert (60). In der Studie von Casalegno-Garduno et al. wurde gezeigt, dass die Expressionshöhe von WT1 in CR dem niedrigen WT1 Expressionsniveau von gesunden Kontrollen entspricht, während hohe WT1-Level mit Therapieversagen assoziiert sind (61). Diese Ergebnisse eröffnen die Möglichkeit, WT1 als prädiktiven Risikofaktor einzusetzen und Therapien mit WT1 als target zu entwickeln.

Wir haben in einem WT1 Knockout Modell in K562 Zellen die Viabilität von WT1 Wildtyp und WT1 Knockout Zellen unter Standard-Chemotherapie (Ara-C, Daunorubicin, Decitabin) untersucht. Dabei konnte keine höhere Viabilität von WT1 Wildtyp gegenüber WT1 Knockout festgestellt werden. Die Zellen unterschieden sich also nicht in Ihrem Therapieansprechen. Damit konnten wir die Ergebnisse der Studie von Marjanovic et al. und Casalegno-Garduno et al. nicht im Zellmodell bestätigen. Nur der Klon K562 WT1<sup>wt</sup> #7 zeigte einen signifikant unterschiedlichen IC50 Wert im Vergleich zu den anderen WT1<sup>wt</sup> Klonen und den WT1<sup>-/-</sup> Klonen. Das abweichende Verhalten des Klons #7 kann an der Methode der Selektion der Einzelzell-Klone liegen (siehe Kapitel 2.2.1.8.2). Dabei kann es durch das zufällige Auswählen von Klonen zur Auswahl eines Klones mit besonders hoher Resistenz kommen. Im Moment erscheint der Klon #7 als Ausreißer. Zur Validierung der Ergebnisse sollten weitere Wildtyp Klone untersucht werden. Nach unseren derzeitigen Ergebnissen hat der Verlust von WT1 keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen in diesem Zellmodell.

Um zu erklären, warum wir keine Signifikanz der Viabilitäten von K562 WT1<sup>-/-</sup> im Vergleich zu K562 WT1<sup>wt</sup> im Knockout Modell feststellen konnten, haben wir unsere verwendeten Chemotherapeutikadosierungen in den folgenden Kapiteln mit der Standard-Therapie nochmals verglichen und ebenfalls die Anwendung im Zellmodell evaluiert.

In unserem Versuchsaufbau haben wir uns an den Dosierungen der Standard-Chemotherapie orientiert und versucht die Experimente unter ähnlichen Bedingungen durchzuführen.

### **4.1.1 Vergleich der Behandlungsschemata im Zellmodell und am Patienten**

Wir haben uns für den jeweiligen Versuchsaufbau der Viabilitäts-Assays an den Konzentrationen der Leitlinientherapie für Ara-C, Daunorubicin und Decitabin orientiert. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Assays im Zellmodell mit der Therapie am Patienten anhand der Rahmenbedingungen und des Behandlungs-Outcomes verglichen.

Die K562 Zellen wurden mit verschiedenen Ara-C Konzentrationen (12.5; 25; 50; 100; 200; 400; 800 nM) einmalig zu Beginn des Assays behandelt und die Viabilität nach 72 Stunden Inkubation gemessen. Nach Protokoll der Leitlinientherapie (1) wird Cytarabin als intravenöse Gabe von 100 mg/m<sup>2</sup> kontinuierlich über sieben Tage gegeben. Dabei wird eine Plasmakonzentration von 0.04 bis 0.6 µMol/l erreicht (62), welche vergleichbar mit unserer Konzentrationen ist. Die höchste wirksame Dosis ist 1000 mg/m<sup>2</sup>, eine weitere Dosissteigerung zeigt keinen stärkeren Effekt (63). Ara-C entfaltet seine Wirkung in der S-Phase des Zellzyklus. Die Plasmahalbwertszeit von Ara-C beträgt allerdings nur 3 h. Alle Zellen müssen während der Applikation von Ara-C die S-Phase durchlaufen, um abgetötet zu werden. Zellen, welche nicht die S-Phase durchlaufen, bleiben folglich am Leben. In Studien mit High-Dose Ara-C mit einem 12 Stunden Intervall zwischen den einstündigen Infusionen konnte die Wirksamkeit des Medikaments verbessert werden, wenn man das Intervall von 12 h zwischen den Therapiezyklen verkürzt (63). Wir haben Ara-C Dosierungen im Range der Leitlinien Dosierung benutzt und einmalig zu Versuchsbeginn auf die Zellen gegeben. K562 Zellen haben allerdings eine Verdopplungszeit von 30 bis 40 Stunden (51). Es ist möglich, dass Zellen dem Zytostatikum entkommen und sich bis zum Versuchsende weiter duplizieren können. Es wäre interessant, die Versuche unter Zugabe des Zytostatikums zu mehreren Zeitpunkten und über einen längeren Zeitraum durchzuführen und ebenfalls eine weitere leukämische Zelllinie zum Vergleich zu untersuchen.

## Diskussion

---

Die Viabilität der K562 WT1<sup>wt</sup> versus K562 WT1<sup>-/-</sup> Zellen unter Daunorubicin Behandlung wurde in einem Langzeitassay über 12 Tage untersucht. Dabei wurde jeden zweiten Tag die Zell-Viabilität gemessen und Daunorubicin zur Erhaltung einer Konzentration von 5 nM zugegeben. Daunorubicin (DNR) wird nach Leitlinien Therapie in einer Dosis von 60 mg/m<sup>2</sup> über 3 Tage gegeben (1) und erreicht eine maximale Plasmakonzentration von 68.62 µM (64). Die verwendete Dosierung bei Patienten ist deutlich höher als unsere Dosierung im Zellmodell. Wir haben uns für 5 nM aufgrund der ermittelten Dosis-Wirkungs-Kurve für Daunorubicin in K562 Zellen entschieden. Laut Literatur liegt der IC<sub>50</sub> von K562 Zellen allerdings bei 21.7 (±5.6) nM und damit etwas höher als von uns ermittelt. Der Unterschied in der benötigten Dosierung von DNR im Zellmodell im Vergleich zum Patienten könnte darauf zurückgeführt werden, dass sich die Pharmakokinetik anders verhält. So ist beispielsweise die Absorption von DNR im Zellmodell höher (65). In unseren Experimenten scheint WT1<sup>wt</sup> gegenüber WT1<sup>-/-</sup> keinen signifikanten Unterschied in der Viabilität der Zellen unter Behandlung mit Daunorubicin zu bewirken. Selbst die mehrfache Zugabe des Chemotherapeutikums über mehrere Tage führt zu keinem signifikanten Unterschied.

Die K562 Zellen wurden einmalig mit Decitabin (10, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000 nM) behandelt und nach 72 Stunden die Zell-Viabilität gemessen. Dabei wurde kein signifikanter Unterschied zwischen der Viabilität der K562 WT1 Knockout Zellen und den K562 WT1 Wildtyp Zellen festgestellt. Nach den Leitlinien wird Decitabin in einer Dosis von 20 mg/m<sup>2</sup> über 1 Stunde an 5 aufeinanderfolgenden Tagen intravenös verabreicht. Dabei wird in Patientenstudien eine maximale Plasmakonzentration von 2 µM für 1 Stunde erreicht (66). In diesem Bereich liegt auch unsere verwendete Konzentration von Decitabin. Decitabin greift dabei die Zellen in der S-Phase an, indem es auf epigenetische Prozesse durch Demethylierung von DNA wirkt und dadurch Tumorsuppressor Gene, welche durch DNA Methylierung inaktiviert sind, reaktiviert. Laut Literatur sind niedrige Dosen Decitabin aufgrund der geringeren Toxizität besser anzuwenden, zumal die Zellen sehr sensitiv auf niedrige Dosen reagieren. Allerdings sollte die Infusion über einen längeren Zeitraum laufen beziehungsweise das Intervall zwischen der Einzelgabe verkürzt werden. Zellen werden nur in der S-Phase angegriffen und Decitabin hat eine Halbwertszeit von 15-25 Minuten im Menschen. Durch eine einmalige Gabe von Decitabin - wie in unseren Versuchen - können Zellen die S-Phase durchlaufen ohne Decitabin ausgesetzt zu werden. Die Verdopplungszeit der K562 Zellen beträgt 30-40 Stunden (51). Um den Aspekt, dass die Zellen möglicherweise der Toxizität durch einen langen Zellzyklus entgehen können, zu betrachten, will die AG Spiekermann den Versuch

als Langzeitassay mit wiederholter Gabe an Chemotherapeutikum und mit mehreren Messzeitpunkten durchführen.

Interessant könnte auch die Kombination von Cytarabin und Daunorubicin für eine Versuchsreihe sein. In Patientenstudien werden die beiden Medikamente für die Induktionstherapie zusammen angewendet und zeigen so ihr bestes Ergebnis.

### **4.1.2 Einfluss von Genetic Engineering auf Versuchsbedingungen und Outcome im Zellmodell**

Nicht nur die verwendeten Konzentrationen und die Anwendung der Chemotherapeutika, sowie die Zelllinie spielen eine Rolle für den Experimentverlauf, sondern auch die Herstellung des WT1 Knockout ist von Bedeutung. Bei Anwendung von Cas9 zur Herstellung von Knockouts kann ein off-target Effekt nicht ausgeschlossen werden. Es kann also zu weiteren Veränderungen im Genom kommen. Der gewünschte Knockout wurde durch Westernblot und Sequenzierung bestätigt.

### **4.1.3 Limitationen des Zellmodells**

In der klinische Analyse von Marjanovic et al. wurden hohe WT1 Expressionslevel bei AML-Patienten mit Therapieresistenz, niedriger CR-Rate, niedrigem DFS und OS assoziiert (60). Demgegenüber konnten wir in unserem Zellmodell keinen signifikanten Unterschied der Viabilitäten zwischen K562 Zellen mit WT1 Wildtyp und K562 Zellen mit WT1 Knockout erkennen. Damit haben wir unsere erste Hypothese, dass ein WT1 Knockout zu einem besseren Ansprechen bei Chemotherapie führt, falsifiziert.

In Zelllinien liegen mehrere Gene zugleich überexprimiert oder reprimiert vor, sodass die Funktionalität eines einzelnen Gens schwierig zu untersuchen ist. Zellkultur-Zelllinien zeigen eine Vielzahl von genetischen Aberrationen und sind komplexer als Zellen von AML-Patienten. Dadurch spielt das Gesamtbild der Gene eine große Rolle für die Bildung von Resistenzen. In unserem Zelllinien- Modell versuchen wir einen isolierten Effekt nur eines Gens nachzubilden und zu untersuchen. Eine Möglichkeit der Erklärung für das Ausbleiben einer höheren Sensitivität bei WT1 Knockout auf die Chemotherapeutika wäre, dass es zu einer Kompensation des WT1 Knockouts durch ein anderes Signalmolekül kommt bzw. der Knockout von WT1 keinen Effekt zeigt, da redundante Pathways vorliegen. Dazu muss weiter untersucht werden, welche Gene die Funktion von WT1 übernehmen können beziehungsweise

welche Pathways durch den Knockout des WT1 Gens supprimiert oder aktiviert werden. Pronier et al. beschreibt beispielsweise, dass AML-Patienten mit WT1 loss of function Mutationen ebenfalls zumeist FLT3 Gain-of-Function-Mutationen aufweisen. Im Maus-Modell zeigt Pronier et al. wie es durch Kooperation der beiden Gene zu Veränderungen von Gen-Regulationswegen kommt und die Leukämogenese unterstützt wird (67). Desweiteren wurde hier mit K562 als ein besser manipulierbares Zellmodell gearbeitet. K562 ist eine CML-Zelle, welche in der Blastenkrise eine AML-Zelllinie modellieren kann. Möglicherweise ergeben sich in AML-Zelllinien jedoch andere Ergebnisse.

Es ist denkbar, dass das isolierte Gen allein keine funktionelle Rolle in der Resistenzbildung spielt und erst durch das Zusammenspiel der verschiedenen Faktoren eine Resistenz gegen die Chemotherapie entsteht. Daher ist vorallem die Untersuchung von WT1 und seinen Interaktionspartnern zur Erklärung von Regulationswegen, welche zur Resistenzbildung führen, entscheidend.



### 4.2 Bedeutung von WT1 Wildtyp und WT1 Mutationen unter Standardchemotherapie im Re-expressionsmodell

#### 4.2.1 Kontroverse Studienlage im Hinblick auf WT1 Mutationen und Therapieansprechen

In einer britischen Studie wurden Proben von 470 Erwachsenen (Durchschnittsalter 45) mit CN-AML (AML mit normalem Karyotyp) auf Mutationen im Exon 7 und 9 untersucht. In 10% der Proben wurden Mutationen von WT1 gefunden. Bei diesen Patienten wurde eine schlechtere Antwort auf eine Induktionschemotherapie (standard dose 100 mg/m<sup>2</sup> oder high dose 2-3 g/m<sup>2</sup>/12h Ara-C) festgestellt (CR-Rate 79% vs 90%, p=0.02). Insgesamt war das klinische Outcome der Patienten mit WT1 Mutation schlechter als mit WT1 Wildtyp. Nach 5 Jahren war bei Patienten mit WT1 Mutation der cumulative incidence of relapse (CIR) bei 67% versus 43% (p=0.0008) mit WT1 Wildtyp, das relapse free survival (RFS) war bei 22% versus 44% (p=0.005) und das overall survival (OS) war bei 26% versus 47% (p=0.007). Der Großteil der Mutationen lag dabei in Exon 7 (88%). Diese Mutationen führen zu einem Abbruch vor der Zinkfinger-Domäne, welche entscheidend für die DNA-Bindungs-fähigkeit ist. Ebenfalls enthält die Zinkfinger-Domäne eine Kernlokalisierungs-Sequenz und Bindungsdomänen für Proteininteraktionen, welche die WT1 Funktion regulieren. In welcher Form die trunkierten Mutanten auf die Funktion von WT1 Einfluss nehmen ist nicht genau bekannt. Virappane et al. vermuten, dass entweder die trunkierten Proteine stabil in der zellulären Umgebung sein könnten, oder aber nicht in den Zellkern aufgrund des Verlustes der Kernlokalisations-Sequenz transloziert werden. Dadurch können sie in einer dominant-negativen oder haploinsuffizienten Weise funktionieren. Alternativ können die trunkierten Proteine instabil sein oder gezielt abgebaut werden, wodurch es zur Haploinsuffizienz kommt (20). Demzufolge würde hier WT1 eher als Tumorsuppressor wirken und mutiertes WT1 würde diese Wirkung verlieren und sogar die Wirkung von WT1 Wildtyp hemmen. WT1 kann nachgewiesenermaßen sich selbst binden und die trunkierte Form kann die Kernlokalisierung von WT1 Wildtyp beeinflussen. Allerdings stehen eine genauere Beschreibung und Erforschung dieses dominant-negativen Mechanismus noch aus (20, 68).

Im Gegensatz dazu präsentiert Gaidzik et al. in einer Studie der German-Austrian AML Study Group Ergebnisse, in denen kein Unterschied der CR (complete remission) (77% versus 79%) und der RD (refractory disease) (19% vs 14%) der WT1 mutierten CN-AML Patienten gegenüber den WT1 Wildtyp CN-AML Patienten festgestellt wurde. Es wurden 617 Patienten im Alter von 16-60 Jahren in die Studie aufgenommen. Gaidzik et al. beschreibt ähnliche Hotspot WT1 Mutationen wie Virappane et al. (20) und King-Underwood et al. (68). In dieser

Arbeit untersuchte Mutationen liegen ebenfalls im Bereich des WT1 Mutations Hotspots der zuvor genannten Arbeiten. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz der Ergebnisse findet sich in der höheren kumulativen Dosierung von Ara-C, welche für die Konsolidierungstherapie (high dose 18 - 54 g/m<sup>2</sup>, Mehrheit der Patienten bekam >36 g/m<sup>2</sup>) bei Gaidzik et al. verwendet wurde. Nach dem Behandlungsprotokoll bei Virappane et al. wurde eine niedrigere kumulative Dosierung von high dose Ara-C (6 g/m<sup>2</sup> und 1-8 g/m<sup>2</sup>) verwendet. Der negative Impact von WT1 Mutationen könnte durch wiederholte Zyklen von hoch dosiertem Ara-C bei Gaidzik et al. überwunden worden sein. Hier muss noch genauer der Nutzen für die Therapieeffizienz gegenüber der höheren Toxizität abgewogen werden. Auch im relapse free survival (RFS) (p=0.40) und overall survival (OS) (p=0.62) wurde kein Unterschied zwischen Patientengruppen mit WT1 Mutation und WT1 Wildtyp festgestellt (21). Die Ergebnisse von Gaidzik et al. könnten zudem damit zusammenhängen, dass in der Studie WT1 Mutationen signifikant mit jungem Alter verbunden wurden. Jüngere Patienten mit AML zeigen generell eine bessere Überlebensrate (1). In der CN-AML-Kohorte der LMU führten WT1 Mutationen im Vergleich zu WT1 Wildtyp zu keinem Unterschied im RFS. Wiederum wurden WT1 Mutationen mit jungem Alter assoziiert (69). Das Alter spielt also eine wichtige Rolle für den Krankheitsverlauf.

Es wird auch die Funktion von einzelnen WT1 Mutationen in der Literatur beschrieben. In einer Fallstudie zeigte sich, dass ein Subklon, welcher durch eine Mutation im WT1 Exon 7 charakterisiert und bereits bei Diagnose vorhanden ist, unter wiederholter Chemotherapie selektioniert werden kann und sich zu einem dominanten Klon entwickelt (70, 71). Bei einer alternativ gesplittenen Isoform Ex4a(+) wird ein dominant negativer Effekt auf die 4 major WT1 Isoformen beschrieben. Die Isoform Ex4a(+) enthält die N-terminale Transkriptions-Regulations-Domäne, aber durch Addition von 153 Bp in Exon 4 kommt es zum Verlust der gesamten C-terminalen Zinkfinger-Domäne. Dadurch behält Ex4a(+) die Fähigkeit zur Interaktion mit Transkriptions Co-Aktivatoren, aber verliert die Fähigkeit an Promotoren von Downstream Targets zu binden. Ex4a(+) kann so vermutlich durch kompetitive Hemmung die Transkriptions-Aktivierung des anti-apoptotischen Bcl-xL Gen Promotors, vermittelt durch die major WT1 Isoformen, inhibieren und zu mitochondrialen Schäden und Apoptose führen. Dadurch reguliert Ex4a(+) die onkogene Funktion von major WT1 Isoformen und zeigt eine pro-apoptotische Funktion (72). Übertragen auf unsere Mutante S381X, welcher ebenfalls die Zinkfinger-Domäne fehlt und im Exon 7 liegt, würde man eine Tumorsuppressor Funktion vermuten. In weiteren Experimenten zum Ansprechen auf Chemotherapie wollen wir daher die Mutanten S381X und R380W, welche im Exon 7 liegen, untersuchen. Frameshift-Mutationen

in Exon 9 sind weniger häufig als Mutationen in Exon 7. Es wird vermutet, dass den Mutationen nur die Zinkfinger 3 und 4 fehlen und es zu einer Destabilisierung der Helix von Zinkfinger 3 kommt, welche zur Störung der DNA-Bindungsfähigkeit führt (15). Dies lässt eine ähnliche Wirkung wie bei Mutationen in Exon 7 vermuten.

### **4.2.2 Induktion von Chemotherapie-Resistenz durch WT1 Mutationen R430X und D464G im Zellmodell**

Im Re-expressionmodell wurde WT1 in WT1 Knockout-Zellen mithilfe des PiggyBac (PB) Vektor Systems exprimiert. Durch Zugabe von Doxycyclin kann nun WT1 dosisabhängig induziert werden. So kann WT1 und WT1 Knockout in einem Klon direkt verglichen werden. Die Ergebnisse der mit Doxycyclin induzierten Klone (PB/WT1<sup>wt/+Dox</sup>) gegenüber nicht induzierten Klonen (PB/WT1<sup>wt/-Dox</sup>) (entspricht WT1 Knockout) bestätigen die Ergebnisse, welche wir bereits im Knockout-Modell gefunden haben. WT1 Wildtyp scheint gegenüber WT1 Knockout zu keiner Veränderung der Sensitivität gegen Chemotherapeutika in K562 Zellen zu führen.

Desweiteren wurden in dieser Arbeit die trunkierte WT1 Mutante R430X (im Rezidiv und bei Erstdiagnose vorhanden) und die Punktmutante D464G (nur bei Rezidiv vorhanden) auf ihren funktionellen Phänotyp untersucht. Beide Mutationen liegen in der Zinkfinger Domäne in den Exonen 8 und 9 (siehe Kapitel 1.3.3). In unserem K562 PiggyBac Zellmodell (induzierbares System) konnten wir bei einzelnen Zellklonen mit WT1 Mutationen unter hohen Chemotherapeutika-Konzentrationen einen signifikanten Unterschied in der Viabilität der Mutanten PB/WT1<sup>mut/+Dox</sup> versus PB/WT1<sup>mut/-Dox</sup> (entspricht WT1 Knockout) feststellen. Unter Decitabin-Konzentrationen von 5 und 10  $\mu\text{M}$  zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Viabilität der beiden Mutanten PB/WT1<sup>mut/+Dox</sup> jeweils im Vergleich zu PB/WT1<sup>mut/-Dox</sup> (WT1 Knockout Zellen). Der IC50 Wert von PB/WT1<sup>D464G /+Dox</sup> #2 war signifikant unterschiedlich zu PB/WT1<sup>D464G /-Dox</sup> #2 (WT1 Knockout). Ebenfalls unter der Behandlung mit Ara-C zeigten beide untersuchten Mutanten PB/WT1<sup>mut/+Dox</sup> ab einer Konzentration von 400 und 800 nM einen signifikanten Unterschied in der Viabilität zu WT1 Knockout. Die Mutante WT1<sup>D464G/+Dox</sup> zeigt unabhängig von der Ara-C Konzentration eine niedrigere Sensitivität gegenüber dem Chemotherapeutikum als der Knockout. Unsere beiden WT1 Mutationen führen in K562 Zellen zu einer geringeren Sensitivität gegenüber der Standard-Chemotherapie als WT1 Knockout. R430X wurde bei Patienten bei Diagnose und im Rezidiv gefunden und spricht dafür, dass die Zellen mit R430X von Anfang an resistent gegenüber den Chemotherapeutika

sind. D464G wurde erst im Rezidiv bei Patienten gefunden und deutet auf eine Resistenzentwicklung durch Mutation oder eine sehr niedrige VAF bei Diagnose hin. Beide Ergebnisse weisen auf eine mögliche Rolle von WT1 Wildtyp als Tumorsuppressor hin. Durch Mutation scheint diese Funktion verloren zu gehen und WT1 Mutationen übernehmen eine Rolle als Onkogen. Zur Verifizierung sollte das Experiment mit weiteren Klonen der WT1 Mutationen R430X und D464G durchgeführt werden. Im nächsten Schritt wäre es interessant, den zugrunde liegenden Mechanismus noch weiter zu untersuchen.

Im Moment lässt sich keine allgemeine Aussage über den Einfluss von WT1 Mutationen in der AML-Standard-Chemotherapie treffen. Zum einen hängt die Auswirkung der Mutation von der Exon-Lokalisation ab (20) und ob die Mutation biallelisch oder monoallelisch vorliegt (15). Zum anderen haben wir die WT1 Mutationen in Exon 7 noch nicht untersucht.

In diesem Re-expressionsmodell haben wir versucht, die WT1 Mutationen isoliert zu betrachten, ohne auf das Gesamt-Mutationsprofil zu achten. Die Mutationen scheinen zum Teil einen signifikanten Einfluss auf das Therapieansprechen der Zellen unter Behandlung mit Ara-C und Decitabin zu haben. Diesen Effekt der WT1 Mutanten wollen wir weiter untersuchen. Dazu plant die AG Spiekermann in weiteren Projekten Langzeitversuche, um WT1 Mutanten mit WT1 Wildtyp beziehungsweise WT1 Knockout in einer Co-Kultur zu kultivieren. Dabei will die AG unter Inkubation mit Chemotherapeutika untersuchen, ob die WT1 Mutanten sich in solch einem Umfeld gegen den WT1 Wildtyp durchsetzen können. Desweiteren wollen Sie auch die beiden anderen Mutanten S381X und R380W, welche im Exon 7 liegen, in Viabilitäts-Assays untersuchen.

### **4.2.3 Limitationen des induzierbaren Re-expressionsmodells in K562 Zellen**

Zur Beurteilung der Ergebnisse müssen auch die Herstellung des induzierbaren Systems und die Versuchsbedingungen betrachtet werden. Über einen PiggyBac Vektor wurde die Ziel-DNA durch Transfektion in das Genom der K562 Zellen eingeführt. Durch Zugabe von Puromycin werden die Zellen selektioniert, welche das Plasmid mit der Antibiotika-Resistenz für Puromycin besitzen. Dabei kann nicht beeinflusst werden, wie oft das Plasmid in eine Zelle gelangt und in das Genom integriert wird. In einem induzierbaren System ist es daher schwer zu kontrollieren, wie stark das Protein letztendlich exprimiert wird. Über die Zugabe des Tetrazyklins Doxycyclin kann die Expression des Gens reguliert werden. Dabei ist die Expression von WT1 abhängig von der Konzentration von Doxycyclin und dem Zeitpunkt der

Viabilitätsmessung. Wir haben über Westernblots die Expression des Proteins kontrolliert und durch Doxycyclin Konzentrations-Titrationsanalyse ein Level entsprechend der Expression von endogenen WT1 in K562 Zellen angestrebt. In unseren Versuchen haben wir eine Doxycyclin-Konzentration von 1 µg/ml Doxycyclin (Ausnahme PB/ WT1D464G#6: 0.2 µg/ml Doxycyclin) verwendet und alle 48 h dazu gegeben. Doxycyclin induziert nicht nur die Transkription von WT1 sondern vermindert auch in mehreren unserer Zell-Klone (PB/WT1wt #5 (p=0.0357); PB/WT1R430X #2 (p=0.017); WT1-/- #9 (p=0.0171) signifikant das Wachstum und beeinflusst so die experimentellen Bedingungen. Warum nicht alle Klone im Wachstum signifikant eingeschränkt sind, könnte durch eine individuell höhere Resistenz der Klone erklärt werden. Es wird bereits von Ahler et al. beschrieben, dass Doxycyclin bei Konzentrationen von 100 ng/ml – 5 µg/ml (Konzentrationen verwendet in den meisten induzierbaren Systemen) den Zellmetabolismus verändert und die Proliferation signifikant vermindert. So kann Doxycyclin das metabolische Genexpressionprofil von Zellen ändern, zu G<sub>1</sub> Zell Arrest führen und Apoptose vermehren. Doxycyclin kann also zu zusätzlichen Effekten führen, welche weiter untersucht werden müssen (73). Um einen solchen Effekt möglichst gering zu halten, sollte eine möglichst niedrige Dosierung angestrebt werden und eine geeignete Kontrolle mitgeführt werden. Wie man sieht, liegt unsere Doxycyclin Konzentration eher im oberen Bereich der von Ahler angeführten Dosierungen. Eine geringere Konzentration hätte aber für uns nicht zu einer ausreichenden WT1 Expression geführt. Der Effekt von Doxycyclin könnte einerseits dazu führen, dass der Unterschied der Viabilität von WT1 Mutante zu Knockout unter Zytostatika noch deutlicher ausfallen würde, wobei Doxycyclin durch Förderung der Apoptose dem vermuteten Effekt der WT1 Mutationen auf Resistenzbildung gegen Chemotherapeutika entgegenwirkt. Andererseits wurde aber jeder Versuch ins Verhältnis zu einer Kontrolle, welche mit Doxycyclin behandelt wurde, gesetzt, sodass der Effekt von Doxycyclin keine Rolle spielen sollte. Um zu überprüfen, ob Doxycyclin in der verwendeten Dosierung dennoch einen zu großen Einfluss auf die Versuchsbedingungen ausübt, will die AG Spiekermann eine weitere Versuchsreihe mit einer geringeren Doxycyclin Konzentration durchführen und dabei auch näher betrachten, ob WT1 noch ausreichend funktionell induziert wird.

### 4.3 Einfluss von WT1 Mutationen auf Proteininteraktionen

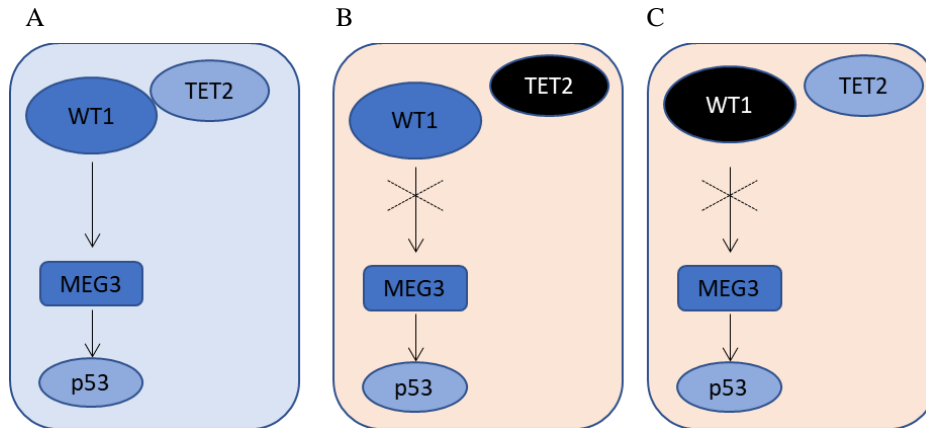
WT1 reguliert als Transkriptionsfaktor viele Pathways der Zelle. Dabei kann WT1 Interaktionspartner aktivieren oder supprimieren. Dies hängt unter anderem von der Lokalisation der Mutation im WT1 Gen ab. Die direkte Interaktion von WT1 mit weiteren Proteinen wird in der Literatur vielfach beschrieben (siehe Kapitel 1.3.4). Dabei wird immer eine bestimmte Bindungssequenz für die Interaktion genannt. Unser Ziel war es in der Immunpräzipitation (IP) nachzuweisen, ob WT1 Mutationen die Interaktion beeinflussen und so der Phänotyp von WT1 in der AML erklärt werden kann. Wir konnten bestätigen, dass WT1<sup>wt</sup> mit TP53, STAT3 und TET2 interagiert. Ebenfalls zeigten unsere WT1 Mutanten (S381X, R430X, R380W, D464G) in der IP eine Interaktion mit den genannten Proteinen.

Die WT1 Mutation S381X führt zu einem Abbruch der Aminosäure-Sequenz vor der Zinkfingerdomäne, die laut Literatur notwendig für die Interaktion mit TP53 und TET2 ist (18). Eine Interaktion sollte also nicht möglich sein. Warum können wir also eine Interaktion nachweisen? Die Proteininteraktion von TP53 und TET2 mit S381X könnte nicht nur durch die bekannten Bindungssequenzen (vgl. Abb. 19) möglich sein, sondern auch durch weitere Sequenzen oder andere Faktoren beeinflusst werden. So ist eine Interaktion durch einen Mediator vorstellbar. Eine andere Erklärung wäre, dass es durch die im Vergleich zu ihren endogenen Gegenstücken höheren Expressionslevel der transfizierten Proteine zu artefaktischen Ergebnissen kommt.

#### 4.3.1 Interaktion von TP53 und WT1 führt zu Inhibition von Apoptose

TP53 ist ein Tumorsuppressor und reguliert Zellarrest, Apoptose und Angiogenese. In der AML sind TP53-Mutationen mit schlechter Prognose assoziiert. TP53 kann eine physikalische Bindung mit WT1 eingehen. Zur Interaktion ist die Zinkfingerdomäne (256-429 Zinkfinger 1 und 2, Isoform A ab Alternativen Start) von WT1 notwendig (74). Durch die Interaktion wird TP53 stabilisiert und die pro-apoptotische Funktion inhibiert (75). WT1 kann aber auch über maternally expressed gene 3 (MEG3) Aktivierung die Tumorsuppressor-Funktion von TP53 hochregulieren und so das Tumorwachstum hemmen. MEG3 wirkt als Tumorsuppressor in der AML durch einen TP53 abhängigen und TP53 unabhängigen Regulationsweg. MEG3 kann die Zellproliferation unterdrücken und G0/G1 Zell-Zyklus Arrest in der AML initiieren. Dabei dient TET2 als Co-Faktor für WT1 bei der Regulierung von MEG3 (Abb. 24 A). Ist WT1 oder TET2 mutiert, kommt es zur Dysregulation der WT1-MEG3 Achse (Abb. 24 B\_C (76). Die TET2-WT1-MEG3 Achse spielt eine wichtige Rolle für Tumorsuppressor Regulationswege in

der AML. WT1 muss also nicht direkt mit TP53 interagieren, um dessen Aktivierung zu beeinflussen. Durch physikalische Bindung von WT1 und p53 wird die Funktion von p53 als Tumorsuppressor gehemmt, während WT1 über die Aktivierung von MEG3 p53 aktiviert.



**Abbildung 24 TP53 und WT1 Interaktion.**

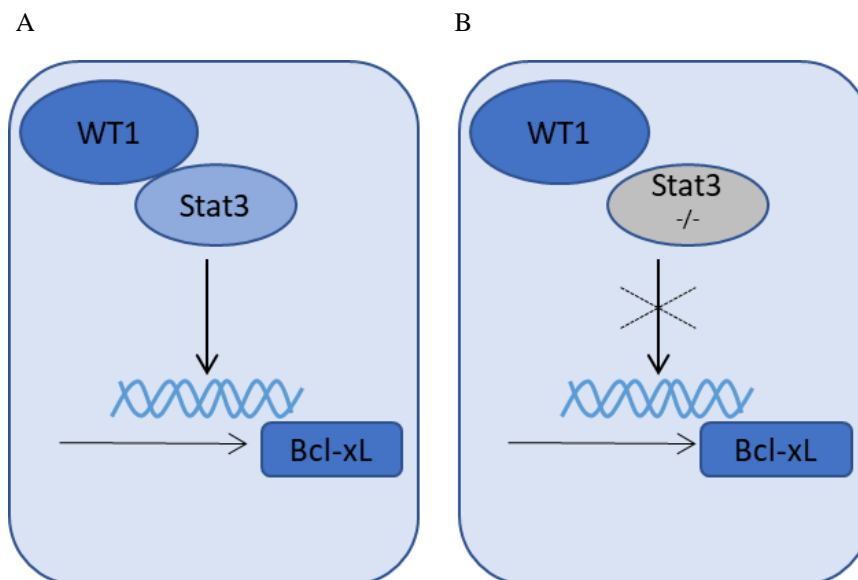
WT1-TET2 Interaktion kann über MEG3 die Funktion von p53 steigern. Liegt einer der Interaktionspartner mutiert vor (in Schwarz) wird die MEG3 Achse unterbrochen. Abbildung modifiziert nach Menke et al. (75).

WT1 kann direkt mit TP53 interagieren, wie wir in der IP bestätigen. Es zeigt sich ebenfalls eine Interaktion mit den verschiedenen WT1 Mutationen. Sowohl die trunkierte Mutante S381X, welche vor der Zinkfingerdomäne zu einem Abbruch führt, als auch die beiden Mutanten R430X und D464G zeigen eine Interaktion mit TP53. Bei diesen würde man eine Störung der Interaktion erwarten (74). R380W liegt noch vor der Zinkfinger-Domäne auf WT1, wodurch es nicht zu einer Störung der Interaktion kommt. Warum eine Interaktion von TP53 mit den WT1 Mutationen erhalten bleibt beziehungsweise nicht vermindert wird, müssen wir noch weiter aufklären. Eine Vermutung ist, dass neben der beschriebenen Bindungssequenz auch noch weitere Sequenzen des Proteins geringfügig zur Bindung beitragen könnten. Desweiteren ist es möglich, dass in der Immunpräzipitation eine indirekte Protein-Protein Interaktion detektiert wird, welche durch die WT1 Mutation nicht beeinträchtigt ist. Ein drittes Protein wie beispielsweise MEG3 könnte am Komplex beteiligt sein und die Detektion ermöglichen. Um einen solchen Mediator zu finden, müssen die Regulationswege von WT1 weiter untersucht werden. Zur Überprüfung einer möglichen Interaktion kann neben der Co-Immunpräzipitation ein in vivo Nachweis durch fluoreszenzmarkierte Peptide erfolgen.

### 4.3.1 Interaktion von STAT3 und WT1 reguliert Apoptose

Desweiteren konnten wir die Interaktion von WT1 mit STAT3 bestätigen. Wie zu erwarten war, konnten wir ebenfalls eine Interaktion aller vier WT1-Mutanten mit STAT3 in der Immunpräzipitation zeigen, da die Interaktions-Domäne noch vor den Mutationen auf WT1 liegt.

In STAT3<sup>-/-</sup> Zellen (Maus Fibroblast Zelllinie NIH 3T3 und Maus Melanoma Zelllinie B16) wirkt WT1 als Tumorsuppressor. Ist STAT3 aktiviert, wirken STAT3 und WT1 synergistisch, d.h. fördernd, auf das Tumorwachstum und Zellüberleben. Dabei bilden Tyrosin-phosphoryliertes STAT3 und WT1 einen Komplex. Die Interaktion im Zellkern führt zu einer höheren Aktivierung von anti-apoptotischen Downstream Genen wie Bcl-xL. Weitere Zielgene von STAT3 wie c-Myc, MPP-2 und cyclin D1 werden von WT1 in Anwesenheit von STAT3 vermehrt exprimiert, während sie durch WT1 in Abwesenheit von STAT3 inhibiert werden. Die synergistische Aktivierung der Zielgene führt zu einem verstärkten Tumorwachstum (27). In Anwesenheit von STAT3 wirkt WT1 als Onkogen und Co-Transkriptionsfaktor von STAT3. Dieses Zusammenspiel verdeutlicht, dass die Funktion von WT1 als Onkogen oder Tumorsuppressor vom Zellkontext und Proteinpartnern abhängig ist.



**Abbildung 25 STAT3 und WT1 Interaktion.**

A WT1 und Stat3 wirken synergistisch, B Stat3 Knockout (<sup>-/-</sup>) ist grau hinterlegt und bewirkt, dass WT1 als Tumorsuppressor wirkt. Abbildung modifiziert nach Rong et al. (27).

### 4.3.2 Regulation der DNA-Methylierung durch Interaktion zwischen WT1 und TET2

Zudem konnte ebenfalls die Interaktion von WT1 Wildtyp mit TET2 in der Immunpräzipitation (vgl. Abb. 4) bestätigt werden. Auch die vier WT1 Mutationen zeigen eine Interaktion mit



TET2 in der Immunpräzipitation. Die 293T-WT1-KO Zellen zeigen eine sehr niedrige Expression von endogenem TET2. Es war schwierig einen selektiven TET2 Antikörper zu finden, da selbst der von uns verwendete Antikörper unspezifische Banden detektiert. Laut Wang et al. kommt es zu einer direkten Interaktion an den vier Zinkfingern (AA 323-449, WT1 Isoform D Alternativer Start) von WT1, aber nicht im N-terminalen Bereich von WT1 (29). Eine Interaktion von TET2 mit der trunkierten Mutante S381X ist aufgrund der fehlenden Zinkfinger-Domäne eigentlich nicht zu erwarten. Genauso würde man vermuten, dass die Interaktion mit den beiden Mutanten R430X und D464G zumindest gestört sein sollte. Dies können wir so im Westernblot nicht sehen. In einem nächsten Schritt wäre es daher interessant, das DNA-Methylierungsmuster von WT1 Zielgenen zu untersuchen. So könnte man überprüfen, ob die Funktion von TET2 aufrechterhalten bleibt, wenn TET2 mit einer WT1-Mutante interagiert. TET2 reguliert die DNA-Methylierung, indem 5-Methylcytosin (5mC) zu 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) konvertiert wird. Dabei wird WT1 zur Rekrutierung von TET2 zu spezifischen Ziel-Sequenzen im Genom benötigt. Kommt es zu loss-of-function Mutationen von TET2 oder WT1 ist die Interaktion gestört und eine Reduktion von 5hmC resultiert (siehe Abb. 4). Dementsprechend gehen wir bei unseren WT1 Mutationen von loss-of-function Mutationen aus, da sich in den Viabilitäts-Assays eher eine onkogene Funktion zeigt. Bei Vorliegen von WT1<sup>wt</sup> kommt es zur Überexpression von 5hmC. WT1 reguliert über die Interaktion mit TET2 die Genexpression von WT1 Zielgenen und beeinflusst so beispielsweise den Wnt Signaling und MAPK Signaling Pathway. Quantitative PCR (ChIP-qPCR) Analysen demonstrieren, dass TET2 an Transkriptionsstartpunkten von WT1 Zielgenen binden kann, welche vorwiegend eine Funktion als Tumorsuppressoren zeigen. Gemeinsam führen TET2 und WT1 so zu Inhibition von Zellproliferation und Kolonie-Formation in Leukämie. WT1 agiert in Verbindung mit TET2 als Tumorsuppressor. Da sowohl WT1 als auch TET2 in AML mutiert auftreten ist dieser Regulationsmechanismus gestört (29, 30).

### 4.4 Personalisierte Therapie der AML in Zukunft

Bis heute wurden viele Therapiemöglichkeiten der AML erforscht und in Studien auf ihre Wirksamkeit getestet. Dadurch konnte die Prognose von AML-Patienten wesentlich verbessert werden. So erreichen heute Patienten unter 50 Jahren ein Überleben von 45% bis 50%. Ältere Patienten erreichen nur 15% bis 20% und Patienten über 70 Jahre erreichen sogar nur 10% 2-Jahres Überleben (77). Die bessere Prognose der Patienten wurde hauptsächlich durch bessere Pflege, verbesserten Einsatz vorhandener Therapeutika, Fortschritte in der Stammzelltransplantation und einem besseren Verständnis über Pathophysiologie und genauere Prognoseaussagen ermöglicht (78). Das Überleben der Patienten mit AML bietet aber immer noch Raum zur Verbesserung. Heute basiert die Therapie immer mehr auf individuellen Risikoprofilen. In diese fließen Alter, Komorbiditäten, Zyto- und Molekulargenetik ein. Die Genomforschung rückt damit immer mehr in den Vordergrund und macht deutlich, dass jeder Patient eine individuelle Behandlung benötigt. Patienten unterscheiden sich in ihren Mutationsprofilen und zeigen dadurch ein unterschiedliches Ansprechen auf Therapien. Daher kommen heute vermehrt personalisierte Therapieansätze zum Einsatz (5). Die Dosierung von bekannten Chemotherapeutika wird angepasst und Immuntherapien, welche spezifische Mutationen zum Ziel haben, werden entwickelt. Desweiteren können zielgerichtete Therapien in der AML z.B. gegen spezifische Transmembran-Rezeptoren der Tumorzellen zum Einsatz kommen. Neuzulassungen von Medikamenten wie beispielsweise Midostaurin ein FLT3-Inhibitor und Gemtuzumab Ozogamicin ein gegen CD33 gerichtetes Antikörper-Wirkstoff-Konjugat führen zu einem Überlebensvorteil (77). Durch die Kombination von Chemotherapie, Stammzelltransplantation und Immuntherapie soll das beste Outcome für die Patienten erreicht werden.

Bei Immuntherapien spielt die Impfung gegen WT1 eine Rolle. Sie wird als Erhaltungstherapie im Rahmen von klinischen Studien nach CR eingesetzt. Dabei wird ein Wilms Tumor 1 Peptid Impfstoff verwendet, welcher in Studien bereits zu einem besseren Gesamtüberleben der Patienten führt (79). Die Impfung basiert auf der Tatsache, dass AML-Zellen zu 90% WT1 exprimieren. In der normalen Hämatopoese wird WT1 in CD34<sup>+</sup> BM-Zellen und CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> Zellen nur geringfügig exprimiert. In CD34<sup>-</sup> Zellen und festgelegten Progenitor Zellen kann WT1 nicht nachgewiesen werden (17). Dadurch bietet diese Impfung einen spezifischen Angriff auf die leukämischen Zellen und bewirkt zusätzlich wenig Nebenwirkungen. In Zukunft werden solche spezifischen und personalisierten Therapieansätze eine immer größere Rolle spielen. Man wird sich in molekularen Tumorboards auf der Basis von Next Generation

## Diskussion

---

Sequencing damit auseinandersetzen, welches Mutationsprofil bei einem Patienten besteht und dadurch eine risikoadaptierte und personalisierte Therapie ableiten.

Die Rolle von WT1 in AML bleibt dennoch weiter kontrovers. Wir sehen die Bedeutung von WT1 in klinischen Patientenkollektiven und den dazugehörigen DNA-Sequenzierungen und die Wichtigkeit durch molekulare Diagnostik die Therapie weiter zu personalisieren. Eine Erklärung für den genauen Mechanismus, wie WT1 zur Leukämogenese und Therapieresistenz in AML beiträgt, erfordert hingegen weitere Untersuchungen.

## Literaturverzeichnis

---

1. Christoph Röllig DWB, Jan Braess, Richard Greil, Dietger Niederwieser, Jakob Passweg, Dirk Reinhardt, Richard F. Schlenk Akute Myeloische Leukämie (AML). onkopedia. 2022.
2. Khwaja A, Bjorkholm M, Gale RE, Levine RL, Jordan CT, Ehninger G, et al. Acute myeloid leukaemia. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16010.
3. Dohner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(4):424-47.
4. SEER 17 areas (San Francisco C, Hawaii, Iowa, New Mexico, Seattle, Utah, Atlanta, San Jose-Monterey, Los Angeles, Alaska Native Registry, Rural Georgia, California excluding SF/SJM/LA, Kentucky, Louisiana, New Jersey, and Georgia excluding ATL/RG). Expected Survival Life Tables by Socio-Economic Standards.
5. Dohner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*. 2022;140(12):1345-77.
6. Chen P, Aimiwu J, Xie Z, Wei X, Liu S, Klisovic R, et al. Biochemical modulation of aracytidine (Ara-C) effects by GTI-2040, a ribonucleotide reductase inhibitor, in K562 human leukemia cells. *AAPS J*. 2011;13(1):131-40.
7. Thompson P, Wheeler HE, Delaney SM, Lorier R, Broeckel U, Devidas M, et al. Pharmacokinetics and pharmacogenomics of daunorubicin in children: a report from the Children's Oncology Group. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2014;74(4):831-8.
8. Garcia-Manero G, Griffiths EA, Steensma DP, Roboz GJ, Wells RA, McCloskey J, et al. Oral cedazuridine/decitabine: a phase 2, pharmacokinetic/pharmacodynamic, randomized, crossover study in MDS and CMML. *Blood*. 2020.
9. Cristina Panuzzo ES, Chiara Calabrese, Muhammad Shahzad Ali, Jessica Petiti, Enrico Bracco, and Daniela Cilloni Landscape of Tumor Suppressor Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *Clinical Medicine*. 2020;9.
10. Greif PA, Hartmann L, Vosberg S, Stief SM, Mattes R, Hellmann I, et al. Evolution of Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia During Therapy and Relapse: An Exome Sequencing Study of 50 Patients. *Clin Cancer Res*. 2018;24(7):1716-26.
11. Walker A, Marcucci G. Molecular prognostic factors in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Expert Rev Hematol*. 2012;5(5):547-58.
12. Ediriwickrema A, Aleshin A, Reiter JG, Corces MR, Kohnke T, Stafford M, et al. Single-cell mutational profiling enhances the clinical evaluation of AML MRD. *Blood Adv*. 2020;4(5):943-52.
13. Krauth MT, Alpermann T, Bacher U, Eder C, Dicker F, Ulke M, et al. WT1 mutations are secondary events in AML, show varying frequencies and impact on prognosis between genetic subgroups. *Leukemia*. 2015;29(3):660-7.
14. Kramarzova K, Stuchly J, Willasch A, Gruhn B, Schwarz J, Cermak J, et al. Real-time PCR quantification of major Wilms' tumor gene 1 (WT1) isoforms in acute myeloid leukemia, their characteristic expression patterns and possible functional consequences. *Leukemia*. 2012;26(9):2086-95.
15. Owen C, Fitzgibbon J, Paschka P. The clinical relevance of Wilms Tumour 1 (WT1) gene mutations in acute leukaemia. *Hematol Oncol*. 2010;28(1):13-9.
16. Algar E. A review of the Wilms' tumor 1 gene (WT1) and its role in hematopoiesis and leukemia. *J Hematother Stem Cell Res*. 2002;11(4):589-99.

17. Hosen N, Shirakata T, Nishida S, Yanagihara M, Tsuboi A, Kawakami M, et al. The Wilms' tumor gene WT1-GFP knock-in mouse reveals the dynamic regulation of WT1 expression in normal and leukemic hematopoiesis. *Leukemia*. 2007;21(8):1783-91.
18. Toska E, Roberts SG. Mechanisms of transcriptional regulation by WT1 (Wilms' tumour 1). *Biochem J*. 2014;461(1):15-32.
19. Rampal R, Figueroa ME. Wilms tumor 1 mutations in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2016;101(6):672-9.
20. Virappane P, Gale R, Hills R, Kakkas I, Summers K, Stevens J, et al. 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*. 2008;26(33):5429-35.
21. Gaidzik VI, Schlenk RF, Moschny S, Becker A, Bullinger L, Corbacioglu A, et al. Prognostic impact of WT1 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study of the German-Austrian AML Study Group. *Blood*. 2009;113(19):4505-11.
22. Vosberg S, Hartmann L, Metzeler KH, Konstandin NP, Schneider S, Varadharajan A, et al. Relapse of acute myeloid leukemia after allogeneic stem cell transplantation is associated with gain of WT1 alterations and high mutation load. *Haematologica*. 2018;103(12):e581-e4.
23. Lee KY, Jeon YJ, Kim HG, Ryu J, Lim DY, Jung SK, et al. The CUG-translated WT1, not AUG-WT1, is an oncogene. *Carcinogenesis*. 2017;38(12):1228-40.
24. Roszkowska KA, Gizinski S, Sady M, Gajewski Z, Olszewski MB. Gain-of-Function Mutations in p53 in Cancer Invasiveness and Metastasis. *Int J Mol Sci*. 2020;21(4).
25. Harris SL, Levine AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*. 2005;24(17):2899-908.
26. Mohammad A, Bani-Ahmad SAA-S, Mohammad A, Al-Asseiri, Ahed J, Alkhatib. A Proposed Kinetic Model for the Diagnostic and Prognostic Value of WT1 and p53 in Acute Myeloid Leukemia. *Clinical Laboratory*. 2018;64:357-63.
27. Rong Y, Cheng L, Ning H, Zou J, Zhang Y, Xu F, et al. Wilms' tumor 1 and signal transducers and activators of transcription 3 synergistically promote cell proliferation: a possible mechanism in sporadic Wilms' tumor. *Cancer Res*. 2006;66(16):8049-57.
28. Rubashruti Kanna GC, Nandini Ramachandra, Ulrich Steidl, Amit Verma & Aditi Shastri. STAT3 inhibition as a therapeutic strategy for leukemia. *Leukemia&Lymphoma*. 2018;59(9):2068-74.
29. Wang Y, Xiao M, Chen X, Chen L, Xu Y, Lv L, et al. WT1 recruits TET2 to regulate its target gene expression and suppress leukemia cell proliferation. *Mol Cell*. 2015;57(4):662-73.
30. Raajit Rampal AA, Jozef Madzo, Aparna Vasanthakumar, Elodie Pronier, Jay Patel, Yushan Li, Jihae Ahn, Omar Abdel-Wahab, Alan Shih, Chao Lu, Patrick S. Ward, Jennifer J. Tsai, Todd Hricik, Valeria Tosello, Jacob E. Tallman, Xinyang Zhao, Danette Daniels, Qing Dai, Luisa Ciminio, Iannis Aifantis, Chuan He, Francois Fuks, Martin S. Tallman, Adolfo Ferrando, Stephen Nimer, Elisabeth Paietta, Craig B. Thompson, Jonathan D. Licht, Christopher E. Mason, Lucy A. Godley, Ari Melnick, Maria E. Figueroa, and Ross L. Levine DNA Hydroxymethylation Profiling Reveals that WT1 Mutations Result in Loss of TET2 Function in Acute Myeloid Leukemia *Cell Reports* 2014;9:1841-55.
31. Stastna M. Continuous flow electrophoretic separation - Recent developments and applications to biological sample analysis. *Electrophoresis*. 2020;41(1-2):36-55.
32. Karasartova D, Gureser AS, Ruh E, Turegun-Atasoy B, Calgin MK, Tasci L, et al. An alternative DNA extraction method for detection of Blastocystis spp. in human fecal samples. *Exp Parasitol*. 2018;186:36-41.
33. Sambrook J, Russell DW. The inoue method for preparation and transformation of competent e. Coli: "ultra-competent" cells. *CSH Protoc*. 2006;2006(1).

34. James D. Glover LT, Adrian Sherman, Caroline Zeiger-Poli, Helen M. Sang, Michael J. McGrew. A Novel Piggybac Transposon Inducible Expression System Identifies a Role for Akt Signalling in Primordial Germ Cell Migration. *LoS ONE* 8(11): e77222 doi:10.1371/journal.pone.0077222. 2013.
35. Lino CA, Harper JC, Carney JP, Timlin JA. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Deliv.* 2018;25(1):1234-57.
36. Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science.* 2014;346(6213):1258096.
37. Mulholland CB, Smets M, Schmidtman E, Leidescher S, Markaki Y, Hofweber M, et al. A modular open platform for systematic functional studies under physiological conditions. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(17):e112.
38. Lab Z. Cas9-Activators with SAM [Available from: <http://sam.genome-engineering.org/>].
39. Waters DL, Shapter FM. The polymerase chain reaction (PCR): general methods. *Methods Mol Biol.* 2014;1099:65-75.
40. Boxberger HJ. Leitfaden für die Zell- und Gewebekultur. Wiley-VCH, Weinheim. 2006.
41. Matan Geron AH, Avi Priel. Controllable Ion Channel Expression through Inducible Transient Transfection. *Journal of Visualized Experiments.* 2017.
42. Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem.* 2010;397(8):3173-8.
43. Ishino T, Kurita H, Kirisawa R, Shimamoto Y, Numano R, Kitamura H. Introduction of a plasmid and a protein into bovine and swine cells by water-in-oil droplet electroporation. *J Vet Med Sci.* 2020;82(1):14-22.
44. HAZEL M. DAVEY DBK. Flow Cytometry and Cell Sorting of Heterogeneous Microbial Populations: the Importance of Single-Cell Analyses. *American Society for Microbiology.* 1996;p. 641–96.
45. Sophia M. Stief A-LH, H. Leonhardt und K. Spiekermann. Loss of KDM6A confers drug resistance in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2019;Leukemia 34:50-62.
46. Harlow E, Lane D. Bradford assay. *CSH Protoc.* 2006;2006(6).
47. Lin JS, Lai EM. Protein-Protein Interactions: Co-Immunoprecipitation. *Methods Mol Biol.* 2017;1615:211-9.
48. Kim B. Western Blot Techniques. *Methods Mol Biol.* 2017;1606:133-9.
49. Li YX, Long DL, Liu J, Qiu D, Wang J, Cheng X, et al. Gestational diabetes mellitus in women increased the risk of neonatal infection via inflammation and autophagy in the placenta. *Medicine (Baltimore).* 2020;99(40):e22152.
50. Quentmeier H, Pommerenke C, Dirks WG, Eberth S, Koeppel M, MacLeod RAF, et al. The LL-100 panel: 100 cell lines for blood cancer studies. *Sci Rep.* 2019;9(1):8218.
51. Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH: K-562. <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-10>. Aufgerufen am 27.12.2021 [
52. DiNardo CD, Pratz K, Pullarkat V, Jonas BA, Arellano M, Becker PS, et al. Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naive, elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2019;133(1):7-17.
53. Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(18):8392-6.
54. Sun L, Shen X, Liu Y, Zhang G, Wei J, Zhang H, et al. The location of endogenous wild-type p53 protein in 293T and HEK293 cells expressing low-risk HPV-6E6 fusion protein with GFP. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica.* 2010;42(3):230-5.
55. Uhlen M, Zhang C, Lee S, Sjostedt E, Fagerberg L, Bidkhori G, et al. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science.* 2017;357(6352).

56. Human Protein Atlas <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000168610-STAT3>. Aufgerufen am 09.02.2022. [proteinatlas.org](https://www.proteinatlas.org).
57. Human Protein Atlas <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000168769-TET2>. Aufgerufen am 09.02.2022. [proteinatlas.org](https://www.proteinatlas.org).
58. Darwin C. On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life. 1859;London(John Murray).
59. Yang L, Han Y, Suarez Saiz F, Minden MD. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia*. 2007;21(5):868-76.
60. Irena Marjanovic TK-D, Milena Ugrin, Marijana Virijevec, Ana Vidovic, Dragica Tomin,2,3 Nada Suvajdzic Vukovic,2,3 Sonja Pavlovic,1 Natasa Tomic1. Use of Wilms Tumor 1 Gene Expression as a Reliable Marker for Prognosis and Minimal Residual Disease Monitoring in Acute Myeloid Leukemia With Normal Karyotype Patients. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*,. 2017;17:312-9
61. Casalegno-Garduno R, Schmitt A, Spitschak A, Greiner J, Wang L, Hilgendorf I, et al. Immune responses to WT1 in patients with AML or MDS after chemotherapy and allogeneic stem cell transplantation. *Int J Cancer*. 2016;138(7):1792-801.
62. Akinobu Hamada TKaMN. Clinical Pharmacokinetics of Cytarabine Formulations. *Clinical Pharmacokinetics* 2002;41.
63. Momparler RL. Optimization of cytarabine (ARA-C) therapy for acute myeloid leukemia. *Exp Hematol Oncol*. 2013;2:20.
64. Gill PS, Espina BM, Muggia F, Cabriales S, Tulpule A, Esplin JA, et al. Phase I/II clinical and pharmacokinetic evaluation of liposomal daunorubicin. *Journal of Clinical Oncology*. 1995;13(4):996-1003.
65. Adige S, Lapidus RG, Carter-Cooper BA, Duffy A, Patzke C, Law JY, et al. Equipotent doses of daunorubicin and idarubicin for AML: a meta-analysis of clinical trials versus in vitro estimation. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2019;83(6):1105-12.
66. Metin Karahoca RLM. Pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of 5-aza-2'-deoxyxytidine (decitabine) in design of its dose-schedule for cancer therapy. *Clinical Epigenetics*. 2013;5.
67. Pronier E, Bowman RL, Ahn J, Glass J, Kandoth C, Merlinsky TR, et al. Genetic and epigenetic evolution as a contributor to WT1-mutant leukemogenesis. *Blood*. 2018;132(12):1265-78.
68. King-Underwood L, Pritchard-Jones K. Wilms' tumor (WT1) gene mutations occur mainly in acute myeloid leukemia and may confer drug resistance. *Blood*. 1998;91(8):2961-8.
69. Herold T, Metzeler KH, Vosberg S, Hartmann L, Jurinovic V, Opatz S, et al. Acute myeloid leukemia with del(9q) is characterized by frequent mutations of NPM1, DNMT3A, WT1 and low expression of TLE4. *Genes Chromosomes Cancer*. 2017;56(1):75-86.
70. Nyvold CG, Stentoft J, Braendstrup K, Melsvik D, Moestrup SK, Juhl-Christensen C, et al. Wilms' tumor 1 mutation accumulated during therapy in acute myeloid leukemia: Biological and clinical implications. *Leukemia*. 2006;20(11):2051-4.
71. Bordin F, Piovan E, Masiero E, Ambesi-Impimbato A, Minuzzo S, Bertorelle R, et al. WT1 loss attenuates the TP53-induced DNA damage response in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2018;103(2):266-77.
72. NaoyaTatsumi N, HiroyukiSakamoto1,RenaInaba1,NahokoMoriguchi1, KeikoMatsuno1,MariFukuda1,AkihideoMatsumura2,SeijiHayashi3,SoyokoMorimoto4, JunNakata5,FumihikoFujiki4,SumiyukiNishida6,HirokoNakajima4,AkihiroTsuboi5, YoshihiroOka4,NaokiHosen7,HaruoSugiyama1,YusukeOj. Identification of a Novel C-Terminal Truncated WT1 Isoform with Antagonistic Effects against Major WT1Isoforms. *PLoS ONE*. 2015;10.
73. Ahler E, Sullivan WJ, Cass A, Braas D, York AG, Bensinger SJ, et al. Doxycycline alters metabolism and proliferation of human cell lines. *PLoS One*. 2013;8(5):e64561.

## Literaturverzeichnis

---

74. Scharnhorst V, Dekker P, van der Eb AJ, Jochemsen AG. Physical interaction between Wilms tumor 1 and p73 proteins modulates their functions. *J Biol Chem.* 2000;275(14):10202-11.
75. Menke AL, Clarke AR, Leitch A, Ijpenberg A, Williamson KA, Spraggon L, et al. Genetic interactions between the Wilms' tumor 1 gene and the p53 gene. *Cancer Res.* 2002;62(22):6615-20.
76. Lyu Y, Lou J, Yang Y, Feng J, Hao Y, Huang S, et al. Dysfunction of the WT1-MEG3 signaling promotes AML leukemogenesis via p53-dependent and -independent pathways. *Leukemia.* 2017;31(12):2543-51.
77. Burnett A, Stone R. AML: New Drugs but New Challenges. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2020.
78. Rowe JM. Will new agents impact survival in AML? *Best Pract Res Clin Haematol.* 2019;32(4):101094.
79. Maslak PG, Dao T, Bernal Y, Chanel SM, Zhang R, Frattini M, et al. Phase 2 trial of a multivalent WT1 peptide vaccine (galinpepimut-S) in acute myeloid leukemia. *Blood Adv.* 2018;2(3):224-34.



# Danksagung

---

Für die vielfältig erfahrene Hilfe während meiner Dissertation möchte ich mich an dieser Stelle recht herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Prof. Karsten Spiekermann, der meine Arbeit stets verständnisvoll unterstützt hat und mich dadurch ermutigte, mit Fleiß an der Arbeit zu sein.

Der Einstieg in die experimentelle Arbeit im Labor wurde mit durch die kooperative Betreuung und aufmunternde Unterstützung von Dr. Leo Edlinger erleichtert, wofür ich sehr dankbar bin.

Allen Mitgliedern des ELFF danke ich herzlich, wobei mein besonderer Dank an die Kollegen in der AG Spiekermann geht, die mich während der Zeit im Labor nicht nur fachlich, sondern auch moralisch unterstützten.

Ebenfalls gilt mein Dank dem SFB Programm, insbesondere Frau Elizabeth Schroeder-Reiter, die sich hinreißend um uns Studenten kümmerte und uns durch spannende Vorträge zum Forschungs-Austausch animierte.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken, besonders meinem Bruder Severin, der mir durch seine eigenen Erfahrungen in der experimentellen Forschung eine wichtige moralische Unterstützung während der Arbeit war.

# Affidavit

---

## Affidavit



### Eidesstattliche Versicherung

Rodler, Irmengard Maria

\_\_\_\_\_  
Name, Vorname

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

Die Rolle des Wilms Tumor 1 Gens 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, 16.12.2023

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum

Irmengard Rodler

\_\_\_\_\_  
Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

## Lebenslauf

---

Der Inhalt dieser Seite wird aus Gründen des Datenschutzes nicht gezeigt.