

Aus der
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
(Schwerpunkt: Hämatologie, Onkologie, Klinische
Immunologie, Rheumatologie)

Die Rolle von LIN9 in akuten Leukämien

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Orlich, Sara Tabea, geb. Dreher

2023

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. K. Kampa-Schittenhelm

2. Berichterstatter: Professorin Dr. K. Schilbach-Stückle

Tag der Disputation: 12.04.2023

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung.....	12
1.1 Akute myeloische Leukämie	12
1.1.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie	12
1.1.2 Pathogenese, Klassifikation und Diagnostik.....	13
1.1.3 Klinik, Therapie und Prognose.....	15
1.2 Akute lymphatische Leukämie	15
1.2.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie	18
1.2.2 Pathogenese, Klassifikation und Diagnostik.....	18
1.2.3 Klinik, Therapie und Prognose.....	21
1.3 LIN9	23
1.3.1 LIN9 als Zellzyklusprotein	23
1.3.2 LIN9 als Onkogen	24
1.3.3 LIN9 als Tumorsuppressor	25
1.4 Fragestellung der Arbeit	26
2 Material	28
2.1 Geräte	28
2.2 Verbrauchsmaterialien	28
2.3 Chemikalien und Reagenzien.....	29
2.4 Bakterienstämme.....	31
2.5 Plasmide.....	31
2.6 Antikörper	31
2.7 Medien und Puffer	32
2.8 Primer und Sonden	33
2.9 Kits.....	34
2.10 Zelllinien.....	34
2.11 Patientenproben.....	34
2.12 Software.....	35

2.13	Hersteller	35
3	Methoden.....	37
3.1	Isolation der mononukleären Zellen.....	37
3.2	Kultivierung der eukaryotischen Zelllinien	37
3.3	Kryokonservierung und Auftauen der Zellen.....	37
3.4	Virusherstellung.....	38
3.5	Etablierung der Zellmodelle.....	38
3.5.1	Transduktion – Herstellung der KD Zellmodelle.....	38
3.5.2	Transfektion – Herstellung der KI Zellmodelle	39
3.6	Quantifizierung der RNA-Expression	40
3.6.1	RNA-Isolation.....	41
3.6.2	cDNA-Herstellung	42
3.6.3	qPCR.....	43
3.7	Quantifizierung der Proteinexpression.....	44
3.7.1	Herstellung von Proteinlysaten und Quantifizierung nach Bradford.....	45
3.7.2	Proteinauftrennung mit SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	45
3.7.3	Western Blot.....	46
3.7.4	Immundetektion.....	46
3.8	Proliferation	47
3.9	Durchflusszytometrie.....	48
3.9.1	Apoptosedetektion mittels Annexin V/PI Methode.....	49
3.10	Statistik	50
4	Ergebnisse	51
4.1	LIN9 Expression in gesunden Knochenmarkspendern und AML Patienten	51
4.1.1	AML zeigen verminderte LIN9 Expression.....	54
4.1.2	Patienten mit sekundärer AML zeigen verminderte LIN9 Expression	55
4.1.3	AML mit intermediärer Prognose zeigen verminderte LIN9 Expression..	57
4.1.4	Kein Unterschied in der LIN9 Expression bei Unterteilung nach Therapieansprechen.....	59
4.1.5	Keine Korrelation zwischen LIN9 Expression und Alter oder Leukozytenzahl.....	61
4.2	Funktionelle Untersuchung von LIN9	63
4.2.1	Molm-14 LIN9 KD Zellmodell.....	64

4.2.1.1	Verifikation des LIN9 KD Zellmodells.....	64
4.2.1.2	Suppression der LIN9 Expression in Molm-14 zeigt geringen Einfluss auf die Proliferation.....	65
4.2.1.3	Verminderte LIN9 Expression resultiert in einer erhöhten Apoptoserate	67
4.2.2	Molm-14 LIN9 KI Zellmodell	68
4.2.2.1	Verifikation des LIN9 KI Zellmodells.....	68
4.2.2.2	Erhöhte LIN9 Expression zeigt in Molm-14 keine veränderte Proliferation	69
4.2.2.3	Geringe Steigerung der Apoptoseinduktion durch Daunorubicin im KI Zellmodell	70
4.2.3	Jurkat LIN9 KD Zellmodell	72
4.2.3.1	Verifikation des LIN9 KD Zellmodells.....	72
4.2.3.2	Suppression von LIN9 im ALL KD Zellmodell führt zu einer verminderten Proliferation.....	73
4.2.3.3	Herabregulation von LIN9 verursacht eine erhöhte Sensitivität gegenüber Apoptoseinduktion in Jurkat Zellen	74
4.2.4	Jurkat LIN9 KI Zellmodell	75
4.2.4.1	Verifikation des LIN9 KI Zellmodells	76
4.2.4.2	Überexpression von LIN9 zeigt geringe Änderung in der Proliferation ..	76
4.2.4.3	Überexpression von LIN9 resultiert tendenziell in einer verminderten Sensitivität gegenüber Apoptoseinduktion.....	77
5	Diskussion.....	79
5.1	Vergleich der LIN9 Expression in Gesunden und AML Patienten	79
5.1.1	Verminderte LIN9 Expression in AML Patienten	79
5.1.2	Verminderte LIN9 Expression in sAML	80
5.1.3	Verminderte LIN9 Expression in AML Subgruppe mit intermediärer Prognose.....	81
5.2	Modellierung der LIN9 Expression in AML Zellmodell.....	83
5.2.1	Suppression der LIN9 Expression zeigt keinen wesentlichen Einfluss auf die Proliferation im AML Zellmodell	83
5.2.2	Suppression der LIN9 Expression resultiert in einer gesteigerten Apoptoserate im AML Zellmodell	84
5.3	Translation in ALL Zellmodell	85

5.3.1	Suppression der LIN9 Expression resultiert in einer verminderten Proliferation und tendenziell gesteigerten Apoptoserate	86
6	Zusammenfassung.....	88
7	Literaturverzeichnis.....	90
8	Anhang	98
8.1	Western Blot Originale	98
9	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....	99
10	Danksagung	100

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modularer Aufbau des DREAM und MMB Komplexes	24
Abbildung 2: Mittlere LIN9 Expression in gesunden Donoren und AML Patienten.....	55
Abbildung 3: Mittlere LIN9 Expression bei Unterscheidung nach Ätiologie der AML. ..	56
Abbildung 4: Mittlere LIN9 Expression bei Unterscheidung nach Prognose der AML... 58	
Abbildung 5: Mittlere LIN9 Expression bei Unterscheidung nach Therapieansprechen.	60
Abbildung 6: Korrelation zwischen Alter bzw. Leukozytenzahl und mittlerer LIN9 Expression.....	62
Abbildung 7: Durchflusszytometrische Quantifizierung der GFP-positiven Zellpopulationen der transduzierten Molm-14 Zellen.	64
Abbildung 8: LIN9 Expression auf RNA Ebene und Proteinebene im Molm-14 LIN9 KD Zellmodell.	65
Abbildung 9: Proliferation von Molm-14 LIN9 KD Zellen im Vergleich zur Kontrolle. ...	66
Abbildung 10: Apoptoseinduktion im Molm-14 KD Zellmodell.	68
Abbildung 11: LIN9 Expression im Molm-14 KI Zellmodell.	69
Abbildung 12: Proliferation von Molm-14 LIN9 KI Zellen im Vergleich zur Kontrolle....	70
Abbildung 13: Apoptoseinduktion im Molm-14 KI Zellmodell.....	71
Abbildung 14: Durchflusszytometrische Quantifizierung der GFP-positiven Zellpopulationen der transduzierten Jurkat Zellen.	72
Abbildung 15: LIN9 Expression auf RNA Ebene und Proteinebene im Jurkat LIN9 KD Zellmodell.	73
Abbildung 16: Proliferation von Jurkat LIN9 KD Zellen im Vergleich zur Kontrolle.	74
Abbildung 17: Apoptoseinduktion im Jurkat KD Zellmodell.	75
Abbildung 18: LIN9 Expression im Jurkat KI Zellmodell.	76
Abbildung 19: Proliferation von Jurkat LIN9 KI Zellen im Vergleich zur Kontrolle.....	77
Abbildung 20: Apoptoseinduktion im Jurkat KI Zellmodell.....	78
Abbildung 21: Original Western Blot zu Abbildung 8 B.....	98
Abbildung 22: Original Western Blot zu Abbildung 15 B.....	98

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der AML.....	14
Tabelle 2: Risikostratifizierung nach ELN.....	17
Tabelle 3: WHO-Klassifikation der ALL.	20
Tabelle 4: GMALL/EGIL Klassifikationen der ALL.....	21
Tabelle 5: Zusammensetzung der Solution A und B für EV-Kontrolle und LIN9 KI.	40
Tabelle 6: Zusammensetzung des Primer-Mix.	42
Tabelle 7: Zusammensetzung des Mastermix.	43
Tabelle 8: Thermocycler Programm zur reversen Transkription von RNA zu cDNA.	43
Tabelle 9: Zusammensetzung des qPCR Ansatzes.....	44
Tabelle 10: Einteilung der Zellen mittels Annexin V/PI Methode.	49
Tabelle 11: Mittels q-PCR ermittelte LIN9 Expression von gesunden Knochenmarkspendern.	51
Tabelle 12: Klinische Parameter und experimentell ermittelte LIN9 Expression von AML Patienten.	52
Tabelle 13: Subgruppen der AML Patientenkohorte (n = 37).	53
Tabelle 14: Auflistung der statistischen Parameter der LIN9 Expression von gesunden Donoren und AML Patienten.....	55
Tabelle 15: Auflistung der statistischen Parameter der LIN9 Expression von Gesunden, de novo und sAML.....	57
Tabelle 16: Auflistung der statistischen Parameter der LIN9 Expression von Gesunden und AML Risikosubgruppen.....	58
Tabelle 17: Auflistung der statistischen Parameter der LIN9 Expression von Gesunden und Responder bzw. Non-Responder.....	60
Tabelle 18: Verdopplungszeit im Molm-14 LIN9 KD Zellmodell.....	67
Tabelle 19: Ermittelte IC ₅₀ Werte für die Behandlung mit Daunorubicin.	68
Tabelle 20: Nahezu identische Verdopplungszeit für Molm-14 EV und Molm-14 LIN9 KI Zellen.	70
Tabelle 21: Ermittelte IC ₅₀ -Werte für die Behandlung mit Daunorubicin.....	71
Tabelle 22: Verlangsamtes Wachstum in den Jurkat LIN9 KD Zellen.....	74

Tabelle 23: Ermittelte IC ₅₀ -Werte für die Behandlung mit Daunorubicin.....	75
Tabelle 24: Nahezu identische Verdopplungszeit für Jurkat EV und LIN9 KI Zellen.....	77
Tabelle 25: Ermittelte IC ₅₀ -Werte für die Behandlung mit Daunorubicin.....	78

Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
BCR-ABL1	Breakpoint cluster region-Abelson murine leukemia 1
BET	Bromodomain and extraterminal protein
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CI	Konfidenzintervall
CR	komplette Remission
CRC	Kolorektales Karzinom
CRISPR/Cas9	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated 9
C _t	Cycle threshold
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
DREAM	Dimerisierungspartner, RB-like, E2F, multivulva class B
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGIL	European Group for the Immunological Classification of Leukemias
ELN	European LeukemiaNet
EV	empty-vector
FBS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

FLT3-ITD	FMS-like Tyrosin Kinase 3-interne Tandemduplikation
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GMALL	German Multicenter Study Group on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IQR	Interquartilsabstand
KD	knock-down
kDa	kiloDalton
KI	knock-in
Ki-67	Kiel-67
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MMB	Myb-MuvB
MPN	Myeloproliferative Neoplasie
MRD	minimale Resterkrankung
n	Anzahl
NR	Non-Responder (engl. Nicht-Ansprechgruppe)
ns	nicht signifikant
O-GlcNAc	O-linked N-acetylglucosamine
OGT	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) Transferase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PI	Propidiumiodid
PML	Promyelozytenleukämie
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
R	Responder (engl. Ansprechgruppe)

RAR α	Retinoic Acid Receptor alpha
Rb	Retinoblastom
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
r_s	Spearman-Rang Korrelationskoeffizient
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
shRNA	Short-hairpin-Ribonukleinsäure
synMuvB	synthetic multivulva class B
t	Zeitpunkt
TNBC	Triple-negativer Brustkrebs
TSS	Transkriptionsstartpunkt
U	Unit
V	Volt
WB	Western Blot
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Akute myeloische Leukämie

1.1.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie

Die akuten myeloischen Leukämien (AML) umfassen eine heterogene Gruppe von malignen Erkrankungen, die auf eine mutierte Vorläuferzelle zum Zeitpunkt der frühen, myeloischen Hämatopoese zurückzuführen sind.

Charakteristisch ist eine maligne klonale Neoplasie, die sich hyperproliferativ verhält und die Fähigkeit zur Ausdifferenzierung verloren hat. Die Expansion dieser leukämischen Vorläuferzellen, auch Blasten genannt, führen zu einer Verdrängung der physiologischen Hämatopoese und daraus resultierend zu einer Trizytopenie im peripheren Blut. Eine weitere Folge kann außerdem die Infiltration von Gewebe wie Haut oder ZNS, sowie die Ausschwemmung der malignen Zellen in das periphere Blut mit einhergehender Leukozytose sein (Estey and Dohner, 2006).

Mit 80 % ist die AML die häufigste akute Leukämie im Erwachsenenalter. Die Inzidenz in Deutschland beträgt 3,5 Neuerkrankungen je 100.000 Menschen pro Jahr und steigt mit dem Alter an. Das mediane Alter bei Erstdiagnose liegt in etwa bei 65 Jahren (Nagel et al., 2017). Die 5-Jahres Überlebensrate ist mit 22,8 % relativ gering, wobei hier neben krankheitsassoziierten (molekularen) Charakteristika auch ein Zusammenhang mit einem erhöhten Erkrankungsalter gefunden werden kann (Pulte et al., 2016).

Die Ursache der Erkrankung ist in den meisten Fällen unbekannt. Es gibt allerdings einige Risikofaktoren, die nachweislich zu einer erhöhten Inzidenz der AML führen (Ferrara and Schiffer, 2013).

Hierzu gehören ionisierende Strahlung, wie sie nach dem Bombenangriff auf Hiroshima und Nagasaki frei wurde (Ichimaru et al., 1978), außerdem Benzol (Hayes et al., 1997) und andere Noxen wie beispielsweise Zigarettenrauch (Fircanis et al., 2014).

Es gibt auch prädisponierende hämatologische Erkrankungen, wie das myelodysplastische Syndrom und genetische Faktoren wie das Down-Syndrom, die das Entstehen einer AML begünstigen (Caldwell et al., 2014).

Ein weiterer wichtiger Risikofaktor für das Entstehen einer AML ist die Behandlung mit Chemotherapeutika. Hierbei kann es zu einer sekundären, therapieinduzierten AML kommen. Vor allem stehen hier Alkylantien wie Cyclophosphamid (Christiansen et al., 2001) und Topoisomerase II-Hemmer (Pendleton et al., 2014) im Fokus.

1.1.2 Pathogenese, Klassifikation und Diagnostik

Die Pathogenese der AML beruht auf der Mutation einer hämatopoetischen Vorläuferzelle im Knochenmark. Durch akkumulierende Mutationen kann es zu einer Transformation in eine maligne Leukämiezelle kommen. Wichtige Mutationen die zu einer Entartung der Zellen führen sind zum Einen meist solche, die die Proliferation steigern oder die Apoptose hemmen und zum Anderen solche, die die physiologische Differenzierung der Zellen stören (Jan and Majeti, 2013, Gilliland et al., 2004).

Die Einteilung der AML erfolgte lange anhand morphologischer und zytochemischer Eigenschaften der leukämischen Blasten. Die FAB (French-American-British)-Klassifikation unterteilt die akuten myeloischen Leukämien anhand dessen in 8 Subgruppen (Bennett et al., 1976). Die zytogenetische und molekulargenetische Charakterisierung gewinnt heutzutage allerdings zunehmend an Bedeutung (Dohner et al., 2010). Daher erfolgt die aktuelle Kategorisierung der AML Subgruppen hauptsächlich anhand der 2016 aktualisierten WHO-Klassifikation (*Tabelle 1*) (Arber et al., 2016).

Eine zunehmende Evidenz zeigt sich auch im Beitrag von epigenetischen Prozessen an der AML Entstehung (Ribeiro et al., 2012). Methylierungen an Histonen und DNA können je nach Methylierungsmuster eine Aktivierung oder auch Repression von Schlüsselgenen in Differenzierungsprozessen zur Folge haben (Figuroa et al., 2010).

Die Diagnostik der AML erfolgt weitestgehend anhand klinischer Symptome, Untersuchungen des Knochenmarks und des peripheren Blutes. Krankheitsdefinierend ist ein Blastenanteil im Knochenmark oder peripheren Blut von $\geq 20\%$ bzw. ein Nachweis definierender struktureller Chromosomenaberrationen wie z.B. $t(15;17)(q22;q12)$ für die Promyelozytenleukämie (PML) (Weinberg et al., 2017).

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der AML.
Einteilung anhand zytogenetischer, molekulargenetischer und morphologischer Merkmale.
(Arber et al., 2016)

AML mit wiederkehrenden genetischen Veränderungen
AML mit t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
APL mit t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARA</i>
AML mit t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i>
AML mit t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
AML mit inv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i>
AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i>
Vorläufige Entität: AML mit <i>BCR-ABL1</i>
AML mit <i>NPM1</i> -Mutation
AML mit biallelischer <i>CEBPA</i> -Mutation
Vorläufige Entität: AML mit <i>RUNX1</i> -Mutation
AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen
Therapie-assoziierte myeloische Neoplasien
AML, nicht anderweitig klassifiziert
AML mit minimaler Differenzierung
AML ohne Ausreifung
AML mit Ausreifung
Akute myelomonozytäre Leukämie
Akute monoblastische/monozytäre Leukämie
Reine Erythrozytenleukämie
Akute Megakaryoblastenleukämie
Akute Basophilenleukämie
Akute Panmyelose mit Myelofibrose
Myelosarkom
Myeloische Down-Syndrom-assoziierte Proliferation
Transiente abnormale Myelopoese (TAM)
Myeloische Down-Syndrom-assoziierte Leukämie

1.1.3 Klinik, Therapie und Prognose

Die Klinik der AML zeigt sich aufgrund der gestörten Hämatopoese mit durch die Panzytopenie hervorgerufenen Symptomen. Typisch sind Fatigue, Blässe und Atemnot durch eine Anämie, Infektneigung durch eine Leukozytopenie und ein erhöhtes Blutungsrisiko durch eine Thrombozytopenie (Lowenberg et al., 1999).

Die Therapie muss vor Beginn an die Behandlungsfähigkeit des Patienten und das Risikoprofil des AML Subtyps angepasst werden. Hierbei spielen Faktoren wie Alter und Komorbiditäten des Patienten aber auch zytogenetische und molekulargenetische Aspekte der Leukämieerkrankung eine Rolle (Dohner et al., 2010).

In der Regel beginnt eine Therapie mit der sogenannten Induktionstherapie, gefolgt von der Postremissionstherapie, die beide die Gabe von Chemotherapeutika beinhalten.

In der allgemeinen Behandlungsstrategie der Induktionstherapie kommen vorzugsweise Chemotherapeutika wie Anthrazykline und Cytarabine (AraC) zum Einsatz. Diese greifen in den Vermehrungszyklus der malignen Blasten ein und hemmen so das Tumorwachstum. Bestmögliches Ziel der Induktionstherapie ist das Erreichen einer kompletten Remission (CR). Das heißt < 5 % Blastenanteil im Knochenmarkausstrich für die zytologische CR und ein negativer MRD-Status mit einer Sensitivität von mindestens 10^{-4} (1 Leukämiezelle/10.000 Zellen) für die molekulare CR. Die minimale Resterkrankung (MRD) bezeichnet die Menge leukämischer Blasten, die sich unterhalb der zytologischen Nachweisgrenze im Knochenmark befindet. Die MRD-Messung erfolgt meist mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) und aufgrund mehrmaliger Kontrollen im Verlauf der Therapie ist es ein wichtiger prognostischer Marker (Dohner et al., 2017).

Die Postremissionstherapie kann mit einer erneuten Chemotherapie begonnen werden. Zusätzlich gibt es die Möglichkeit der allogenen Stammzelltransplantation. Hierfür kommen vorzugsweise Patienten mit ungünstigem genetischen Risikoprofil oder einem erwartbaren Rezidivrisiko von mindestens 35 - 40 % in Betracht. Der immunologische Haupteffekt einer Stammzelltransplantation zielt auf die Elimination des (ggf. unter der Nachweisgrenze) verbliebenen Leukämiezellklons, auch bekannt als graft-versus-leukemia (GvL) Effekt (Sweeney and Vyas, 2019).

Neben patientenbezogenen Faktoren ist die AML Subgruppe ein weiterer Faktor, von dem die Wahl der Therapie abhängt. Bei AML mit Nachweis einer FMS-like Tyrosin Kinase 3 Mutation steht beispielsweise der FLT3-Inhibitor Midostaurin zur Verfügung (Stone et al., 2017). Die Folgen von Mutationen wie z.B. eine gesteigerte Proliferation und fehlgesteuerte Differenzierung der malignen Zellen, können durch diese additive Therapie spezifisch bekämpft bzw. der negative Einfluss ausgeglichen werden.

Ein Spezialfall, aber gutes Modell der Machbarkeit eines gänzlich molekular-basierten therapeutischen Ansatzes, wird bei der PML erfolgreich therapeutisch umgesetzt: Die bereits beschriebene, ursächliche Mutation der PML führt zu einer Fusion des Promyelozyten-Gens mit dem Retinsäurerezeptor α -Gen (RAR α). Das PML-RAR α Fusionsgen führt mit seinen transkriptionsrepressiven Eigenschaften durch eine erhöhte Bindungsaffinität an die DNA zu einer Differenzierungsblockade in den leukämischen Blasten (Grignani et al., 1993).

Eine sehr wirksame Therapie der PML basiert auf der Gabe von all-trans-Retinolsäure (ATRA) und Arsenitrioxid (ATO), die u.a. die Bindung von Korepressoren an PML-RAR α stören sowie dessen Degradation steigern. Dies führt wiederum zu einer erfolgreichen Überwindung der Differenzierungsblockade der leukämischen Promyelozyten (Tallman et al., 1997).

Für die Wahl des therapeutischen Vorgehens, im Besonderen auch zur Indikationsstellung einer konsolidierenden allogenen Stammzelltransplantation, wird eine Risikostratifikation anhand molekularer Marker vorgenommen. Für die Non-PML ist hierbei der Risikoscore des European LeukemiaNet (ELN) (*Tabelle 2*) weit etabliert. Weitere gut etablierte Parameter mit prognostisch ungünstigem Vorhersagewert sind eine Leukozytenzahl von > 100.000 Zellen/ μ l (physiologisch 4-10.000 Zellen/ μ l) und eine Laktatdehydrogenase (LDH) von > 400 U/l (physiologisch < 250 U/l) bei Erstdiagnose. Ebenfalls eine schlechte Prognose haben Patienten mit einer sekundären AML nach Exposition von ionisierender Strahlung oder Behandlung mit Chemotherapeutika (Dohner et al., 2017).

Tabelle 2: Risikostratifizierung nach ELN.
Einteilung in AML Subgruppen anhand zyto- und molekulargenetischer Veränderungen.
(Dohner et al., 2017)

Risikogruppe	Zytogenetik/Molekulargenetik
Günstig	t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> Mutiertes <i>NPM1</i> ohne <i>FLT3-ITD</i> oder mit <i>FLT3-ITD</i> ^{niedrig} * Biallelisch mutiertes <i>CEBPA</i>
Intermediär	Mutiertes <i>NPM1</i> mit <i>FLT3-ITD</i> ^{hoch} * (normaler Karyotyp) Wildtyp- <i>NPM1</i> ohne <i>FLT3-ITD</i> (normaler Karyotyp) oder mit <i>FLT3-ITD</i> ^{niedrig} * (mit oder ohne ungünstige genetische Aberrationen) t(9;11)(p22;q23); <i>MLL3-KMT2A</i> Zytogenetische Aberrationen, die nicht als günstig oder ungünstig eingestuft wurden
Ungünstig	t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11)(v;q23); <i>KMT2A</i> -Genumlagerung t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> inv(3)(q21q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); <i>GATA2, MECOM (EVI1)</i> -5 oder del(5q); -7; -17/abnl(17p) komplexer Karyotyp (≥ 3 Aberrationen) monosomaler Karyotyp Wildtyp <i>NPM1</i> und <i>FLT3-ITD</i> ^{hoch} * Mutiertes <i>RUNX1</i> Mutiertes <i>ASXL1</i> Mutiertes <i>TP53</i>

* niedrig: niedriger allelischer Anteil (< 0,5); * hoch: hoher allelischer Anteil (> 0,5)

1.2 Akute lymphatische Leukämie

1.2.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) entsteht durch die Entartung einer lymphatischen Vorläuferzelle. Sie ist eine bösartige Erkrankung, die durch unkontrollierte Zellteilung im Knochenmark zu einer Verdrängung der physiologischen Hämatopoese führt. Die malignen Zellen können, ebenso wie bei der AML, das periphere Blut sowie verschiedene Organe infiltrieren.

ALL ist die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter. Sie macht 30 % aller bösartigen Erkrankungen und 80 % der Leukämien im Kindesalter aus. Dagegen ist die ALL bei Erwachsenen mit einem Anteil von 15 % an allen Leukämien im Erwachsenenalter eher selten. Die Inzidenz liegt mit einer Geschlechterverteilung von 1,4:1 bei Männern geringfügig höher.

Zumeist bleibt die Ursache für die Erkrankung unbekannt. Es gibt jedoch einzelne Faktoren, die das Risiko an einer ALL zu erkranken, deutlich erhöhen. Hierzu gehören, ähnlich wie bei der AML, Kontakt zu Benzol oder ionisierender Strahlung. Außerdem medikamentöse Immunsuppression zum Beispiel bei Organtransplantation, ebenso wie genetische Prädisposition z.B. durch Trisomie 21 oder das Li-Fraumeni-Syndrom. Auch Virusinfektionen werden als zusätzliche Risikofaktoren diskutiert (Inaba et al., 2013, Bassan et al., 2004).

1.2.2 Pathogenese, Klassifikation und Diagnostik

Die Pathogenese der ALL beruht auf der Mutation von unreifen lymphatischen Blasten. Bei der Mehrzahl der Patienten lassen sich strukturelle und numerische Chromosomenveränderungen nachweisen.

Zu den häufigsten strukturellen Chromosomenaberrationen gehört z.B. die Translokation t(12;21), die zu einer Fusion von Translocation Ets leukemia-acute myeloid leukemia 1 (TEL-AML1) führt. Dieses chimärische Fusionsprotein fungiert als Transkriptionsfaktor in B-Vorläuferzellen. Es führt unter anderem zu einer verstärkten Transkriptionsaktivierung und beeinträchtigt die Kontrolle der Proliferation (Linka et al., 2013). Eine ebenfalls prominente, strukturelle Chromosomenaberration ist die t(9;22)

Translokation. Die hieraus resultierende BCR-ABL1 Genfusion ist auch als Philadelphia-Chromosom bekannt. Dieses Fusionsprodukt bedingt eine Autoaktivierung der Tyrosinkinase, die eine erhöhte Proliferation und verringerte Apoptose vermittelt (Ren, 2005).

Numerische Chromosomenaberrationen wie Deletionen und Amplifikationen können durch eine resultierende Überexpression von Onkogenen zu einer ALL führen (Greaves and Wiemels, 2003, Jan and Majeti, 2013).

Wichtige Gene, die ebenfalls Einfluss auf die Entstehung akuter lymphatischer Leukämien haben, sind Apoptose- und Zellzyklusgene wie zum Beispiel das Rb-Protein, TP53 und p16 (Della Ragione et al., 1995).

Ein weiterer wichtiger Punkt in der Pathogenese von ALL sind, wie auch in der AML, epigenetische Aberrationen. Besonders häufig werden die Gene der Zellzyklusregulatoren p15 und p16 in der ALL hypomethyliert. Dies hat eine verringerte Expression und somit eine Begünstigung des Tumorwachstums zur Folge (Yang et al., 2006).

Die Einteilung der ALL erfolgt anhand der aktuellen WHO-Klassifikation Stand 2016 (*Tabelle 3*). Klinisch relevant ist aber vor allem die immunologische und immunphänotypische Einteilung der ALL anhand den in *Tabelle 4* zusammengefassten GMALL und EGIL Klassifikationen.

Neben der Klassifizierung der ALL Subgruppe erfolgt die primäre Diagnostik durch eine ausführliche Anamnese, Deutung klinischer Symptome, Labor- und Knochenmarkuntersuchungen. Die reifzellige ALL grenzt sich dabei vom lymphoblastischen Lymphom durch einen Blastenanteil im Knochenmark von $\geq 20\%$ ab (Chiaretti et al., 2014).

Tabelle 3: WHO-Klassifikation der ALL.

Einteilung anhand zytogenetischer, molekulargenetischer und morphologischer Merkmale.
(Swerdlow et al., 2016)

B-lymphoblastische Leukämie/Lymphom nicht weiter klassifiziert
B-lymphoblastische Leukämie/Lymphom mit rekurrenten genetischen Anomalien
B-lymphoblastische Leukämie/Lymphom mit t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
B-lymphoblastische Leukämie/Lymphom mit t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearrangiert
B-lymphoblastische Leukämie/Lymphom mit t(12;21)(p13.2;q22.1); <i>ETV6-RUNX1</i>
B-lymphoblastische Leukämie/Lymphom mit Hyperdiploidie
B-lymphoblastische Leukämie/Lymphom mit Hypodiploidie
B-lymphoblastische Leukämie/Lymphom mit t(5;14)(q31.1;q32.3); <i>IL3-IGH</i>
B-lymphoblastische Leukämie/Lymphom mit t(1;19)(q23;p13.3); <i>TCF3-PBX1</i>
(provisorisch) B-lymphoblastische Leukämie/Lymphom, <i>BCR-ABL1</i> ähnlich
(provisorisch) B-lymphoblastische Leukämie/Lymphom mit <i>iAMP21</i>
T-lymphoblastische Leukämie/Lymphom
(provisorisch) Frühe T-Zell Vorläufer lymphoblastische Leukämie
(provisorisch) Natürliche Killerzell (NK)-Zell lymphoblastische Leukämie/Lymphom
Reife B-Zell Neoplasie
Burkitt Lymphom (reifzellige "Burkitt"-B-ALL)

Tabelle 4: GMALL/EGIL Klassifikationen der ALL.

Einteilung der immunologischen Subtypen anhand Zyto-/Molekulargenetik und Klinik.

(Bene et al., 1995)

Subgruppe	Immunphänotypisierung (charakteristische Marker)	Zyto-/Molekulargenetik		Inzidenz
		Häufige Aberrationen	Molekulare Marker	
B-Linien ALL	HLA-DR+, TdT+, CD19+ u/o CD79a+ u/o CD22+			76 %
B-Vorläufer ALL				
Pro-B	CD10-	t(4;11)	ALL1-AF4	11 %
common	CD10+	t(9;22)	BCR-ABL1	49 %
Prä-B	cyIgM+	t(1;19)	E2A-PBX1	12 %
		t(9;22)	BCR-ABL1	
T-Linien ALL	TdT+, cyCD3+, CD7+			24 %
Pro/Prä-T	sCD3-, CD1a-			6 %
Pro-T	CD2-, CD5-, CD8-			
Prä-T	CD2+ u/o CD5+ u/o CD8+			
Kortikal/Thymisch	sCD3+/-, CD1a+			12 %
Reife T	sCD3+, CD1a-			6 %

1.2.3 Klinik, Therapie und Prognose

Die mutierten Leukämiezellklone zeigen zumeist eine erhöhte Proliferation gegenüber nicht mutierten Zellen im Knochenmark. Dies führt zu einem erhöhten Blastenanteil im Knochenmark, der bei Diagnosestellung häufig > 90 % beträgt. Aus diesem Grund kommt es nach einiger Zeit zu einer Störung der physiologischen Hämatopoese und daraus resultierend zu einer Anämie, Leukozytopenie und Thrombozytopenie.

Diese pathophysiologischen Vorgänge zeigen sich ebenfalls in der Klinik der Erkrankung. Zu Beginn erscheint sie häufig unspezifisch. Im Verlauf jedoch leiden die Erkrankten aufgrund der Panzytopenie an sehr ähnlichen Symptomen, wie sie bereits für die AML beschrieben wurden. In 5 - 10 % der Fälle kommt es bei Erkrankten durch ZNS Befall zu Kopfschmerzen und Nervenlähmungen. Hepatosplenomegalie und vergrößerte Lymphknoten treten bei etwa der Hälfte auf. In weniger als 5 % der Fälle kommt es auch

zu einer klinisch messbaren Infiltration von Leukämiezellen in Gewebe wie z.B. Leber und Milz (Bassan et al., 2004). Eine stark erhöhte Leukozytenzahl über 100.000 Zellen/ μ l kann zu einer Leukostasesymptomatik mit respiratorischer Insuffizienz führen, zudem sind assoziierte Gerinnungsprobleme gefürchtet, v.a. kraniale Blutungen, die einen hämatologischen Notfall darstellen (Porcu et al., 2000).

Die Therapie der ALL umfasst in der Regel eine komplexe Polychemotherapie mit aufeinanderfolgenden Phasen. Am Beginn steht die Induktionstherapie gefolgt von der Postremissionstherapie. Gegebenenfalls kann vor der Induktionsphase eine sogenannte „Vorphase“ durchgeführt werden. Diese führt durch Gabe von Dexamethason und Cyclophosphamid zur Reduktion der Tumorlast und zu einem verminderten Auftreten eines Tumorlysesyndroms. Die Induktionsphase hat, wie bei der AML, als Ziel die molekulare CR.

Zur Steigerung der Remissionschance werden Philadelphia-Chromosom positive ALL mit BCR-ABL1 Tyrosinkinaseinhibitoren behandelt (Liu-Dumlao et al., 2012).

Aufgrund des hohen ZNS Rezidiv Risikos erfolgt meist (anders als bei der AML) eine intrathekale Prophylaxetherapie.

Die Postremissionstherapie hat zum Ziel die CR zu erhalten. Bei Hochrisiko-Patienten in kompletter Remission und Standardrisiko-Patienten mit molekularer Resterkrankung oder Therapieversagen wird eine allogene Stammzelltransplantation durchgeführt (Terwilliger and Abdul-Hay, 2017).

Die Prognose der ALL Erkrankten ist von vielen Faktoren abhängig. Der wichtigste prognostische Faktor ist das initiale Ansprechen auf die Therapie. Dieses wird mit der bereits beschriebenen minimalen Resterkrankung (MRD) gemessen. Hinzu kommen beeinflussende Faktoren wie die Dauer bis zum Erlangen der kompletten Remission, das Alter des Patienten, die initiale Leukozytenzahl und der immunologische Subtyp der ALL (Hoelzer et al., 1988, Hoelzer and Gokbuget, 2012).

1.3 LIN9

1.3.1 LIN9 als Zellzyklusprotein

LIN9 ist eine Untereinheit des evolutionär konservierten und aus insgesamt 5 Untereinheiten bestehenden synthetic multivulva class B (synMuvB) Komplexes. Neben LIN9 gehören hierzu LIN37, LIN52, LIN54 und RBBP4. Der synMuvB Komplex kann kontextabhängig wiederum Teil des modular aufgebauten DREAM Komplexes sein. Hierbei kommt es zu einer temporären Bindung des synMuvB Komplexes mit den RB-like Proteinen p107 und p130, Dimerisierungspartnern (DP) und dem Transkriptionsfaktor E2F. Der DREAM Komplex übernimmt als Transkriptionsregulator eine wichtige Rolle im Zellzyklus. Er bewirkt eine Inhibierung der Transkription wichtiger E2F-Zielgene, die für die S-Phase benötigt werden und hat so ein Verweilen der Zelle in der G0/G1 Phase zur Folge (Litovchick et al., 2007).

Umgekehrt kann der synMuvB Komplex eine weitere Bindung mit B-Myb als Bindungspartner eingehen. Diese Verbindung wird als MMB Komplex bezeichnet. B-Myb ist ein Transkriptionsfaktor, dessen Überexpression in malignen Erkrankungen häufig mit einer schlechten Prognose korreliert (Musa et al., 2017). Im Gegensatz zum DREAM Komplex führt der MMB Komplex während der S und G2/M Phasen zu einer transkriptionalen Aktivierung mitotischer Gene (Osterloh et al., 2007, Knight et al., 2009). Zusammengefasst kann LIN9 in Komplexen kontextabhängig die Transkription von S und M Genen inhibieren oder aktivieren.

An embryonalen Stammzellen konnte in vitro die Relevanz von LIN9 für einen fehlerfrei ablaufenden Zellzyklus gezeigt werden. Die Herabregulation von LIN9 in embryonalen Stammzellen führte zu einer erhöhten Anzahl von Zellen in der G2 und M Phase und polyploider Zellen (Esterlechner et al., 2013).

Eine andere Studie konnte zeigen, dass die Phosphorylierung von LIN9 an Threonin-96 durch Cyclin E1/CDK3 in einer erhöhten Expression von zellzyklusfördernden Proteinen resultiert. E-Typ Cycline sind in malignen Erkrankungen häufig überexprimiert (Eckerdt et al., 2014).

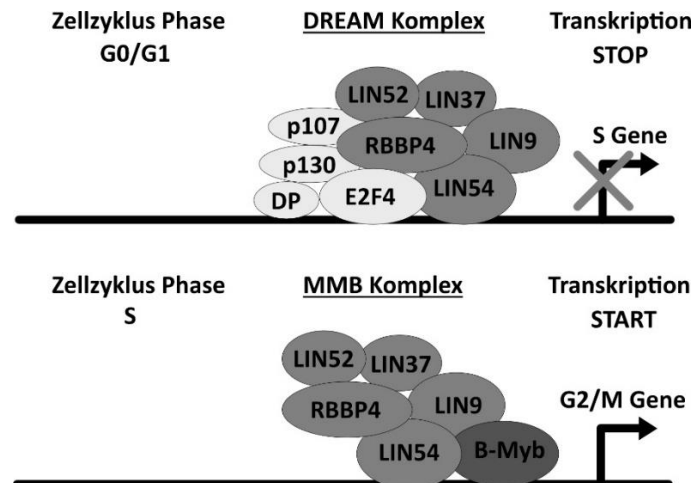


Abbildung 1: **Modularer Aufbau des DREAM und MMB Komplexes.** (In Anlehnung an: (Nor Rashid et al., 2011))
 (A) Im DREAM Komplex hemmt LIN9 den Zellzyklus und hält die Zelle in der G0/G1 Phase. (B) Im Komplex mit B-Myb (MMB) führt LIN9 zu einer Hochregulation der Expression von G2/M Phase Genen.

1.3.2 LIN9 als Onkogen

Störungen in der Regulierung des DREAM Komplexes können dazu führen, dass die Zelle unkontrolliert aus der G0 in die M Phase übergeht. Dabei werden Mitosegene hochreguliert, die auch bei bösartigen Tumorerkrankungen mit schlechter Prognose vermehrt gezeigt werden konnten. Beispielsweise korreliert eine schlechte Prognose bei Brustkrebs häufig mit einer Überexpression von B-Myb, was zu einer gesteigerten Proliferation und verminderten Differenzierung der Zellen führt (Sadasivam and DeCaprio, 2013, Thorner et al., 2009).

Sahni et al. konnten in 65 % der Fälle von triple-negativem Brustkrebs (TNBC) eine erhöhte Expression von LIN9 feststellen. Außerdem wurden Untersuchungen zu LIN9 als möglicher zukünftiger Ansatz für zielgerichtete Therapien beschrieben (Sahni et al., 2017, Gayle et al., 2017). Neueste Untersuchungen in vitro sehen zusätzlich einen Zusammenhang zwischen einer hohen LIN9 Expression in TNBC und der Resistenz gegenüber Taxanen (Lai et al., 2020, Roberts et al., 2020).

Auch für das ösophageale Adenokarzinom und das hepatozelluläre Karzinom (HCC) zeigten Experimente mit Zelllinien und Patientenproben eine erhöhte LIN9 Expression. In HCC Proben waren gesteigerte B-Myb-LIN9 Level auch mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet (Wiseman et al., 2015, Calvisi et al., 2011).

1.3.3 LIN9 als Tumorsuppressor

Gegensätzliche Ergebnisse zu der oben beschriebenen onkogenen Funktion von LIN9 lieferte eine Studie mit einer Osteosarkom Zelllinie und primären Fibroblasten der Maus. Es konnte gezeigt werden, dass LIN9 gemeinsam mit dem Tumorsuppressor RB Protein eine onkogene Transformation der Zellen verhindert und so Differenzierung von Zellen fördern kann (Gagrica et al., 2004).

Pilkinton et al. konnten in verschiedenen Zelllinien demonstrieren, dass LIN9 unabhängig von p107 und p130 einen hemmenden Einfluss auf die Zellproliferation ausübt (Pilkinton et al., 2007).

In vivo Untersuchungen an einem Mausmodell für Lungenadenome zeigten LIN9 in der Funktion eines haploinsuffizienten Tumorsuppressors. Es wurden Mäuse mit einem aktivierten Mitogen aktiviertes Protein (MAP)-Kinase Signalweg verwendet, die im Regelfall innerhalb von drei Monaten gutartige Lungenadenome entwickeln und nach etwa einem Jahr versterben. Heterozygote LIN9-deletierte Mäuse zeigten im Vergleich zu Wildtyp Mäusen eine erhöhte Prävalenz für Lungentumoren. Des Weiteren wurde gezeigt, dass LIN9 eine wichtige Rolle in der embryonalen Mausentwicklung und im Überleben von ausgewachsenen Mäusen einnimmt (Reichert et al., 2010).

Ergänzend hierzu zeigte der knock-out von LIN9 in humanen und murinen Fibroblastenzellkulturen eine erhöhte chromosomale Instabilität, die wiederum vermehrt in onkogenen Zellen vorkommt (Hauser et al., 2012).

Für kolorektale Karzinome (CRC) konnte LIN9 eine Transfer-Ribonukleinsäure (tRNA) Methyltransferase (hTRM9L) abhängige Hemmung des Tumorwachstums in CRC-Zelllinien zugesprochen werden (Begley et al., 2013).

In Ovarialkarzinomzellen konnte, ausgehend von LIN9, ein Zellproliferation-hemmender bzw. die Apoptose-fördernder Effekt nachgewiesen werden. Auch in diesem Fall in Abhängigkeit von hTRM9L (Ref: (Chen, Wang, Zhang, & Gao, 2017)).

1.4 Fragestellung der Arbeit

Unsere Arbeitsgruppe befasst sich mit der Evaluation eines potentiellen Antitumoreffektes von Cannabinoiden in akuten Leukämien. In Vorarbeiten konnte dabei gezeigt werden, dass durch eine Behandlung mit dem Cannabinoid Dronabinol sowohl bei akute Leukämie Zellmodellen als auch nativen leukämischen Blasten antileukämische Effekte in Bezug auf Antiproliferation, Apoptoseinduktion und Überwindung des Differenzierungsblocks induziert werden können. Globale Methylierungsanalysen legten dabei nahe, dass ein Teil dieser Effekte durch eine Veränderung der DNA Methylierung verschiedenster Gene moduliert wird.

Das am stärksten hypomethylierte Gen war dabei die Promoterregion kodierend für die O-linked N-Acetylglucosamin Transferase (OGT). OGT ist ein zentrales Enzym, das in Proteinen die Übertragung von O-linked N-Acetylglucosamin (O-GlcNAc) auf Serin- und Threoninreste katalysiert und damit posttranslationale Modifikationen von Proteinen vornimmt.

Die, durch Dronabinol induzierte, Hypomethylierung von Teilen der Promoterregion bzw. des Transskriptionsstartpunktes (TSS) resultierte dabei in einer gesteigerten Expression von OGT.

Interessanterweise zeigten die durchgeführten Methylierungsanalysen, dass innerhalb des TSS im Besonderen die Bindungsstelle von LIN9 von der Hypomethylierung betroffen war – was eine besondere funktionelle Bedeutung suggeriert (Kampa-Schittenhelm et al., 2020).

Insgesamt beinhaltet die aktuelle Datenlage bisher keine funktionelle Beschreibung von LIN9 in der Entwicklung und Behandlung von Leukämien. Die bekannten Forschungsergebnisse zu dem Einfluss von LIN9 auf das Wachstums- und Apoptoseverhalten in anderen Tumorentitäten lassen aber durchaus eine funktionelle Rolle von LIN9 auch in Leukämien vermuten. Diese Vermutungen lieferten die Rationale dieser Arbeit, eine erste Charakterisierung der Rolle von LIN9 in akuten Leukämien vorzunehmen.

Neben Expressionsanalysen von LIN9 in nativen Proben von Patienten mit neu diagnostizierter akuter Leukämie, wurden hierfür LIN9 knock-down/knock-in Zellmodelle etabliert, um so den funktionellen Einfluss von LIN9 auf das Proliferations- sowie Apoptoseverhalten zu untersuchen.

2 Material

2.1 Geräte

Geräte

Absaugsystem

(Integra Biosciences™ Vacusafe™ Comfort)

Begasungsbrutschrank (HERACell 240i CO2)

Bio-Rad PowerPac

Criterion™ Cell, Criterion™ Blotter

FACSCalibur®

Heizblock (neo Block 1)

LI-COR Odyssey®

LightCycler® LC480

Mastercycler® gradient

Mikroskop (IX51)

NanoDrop™ 2000

Neubauer Zählkammer

Schüttelapparat (GFL 3017)

Sicherheitswerkbank (HERAsafe™)

Sunrise™

Vortex Mixer (Vortex-Genie 2)

Wasserbad

Zentrifugen:

Varifuge 3.0RS

Centrifuge 5415R

Hersteller

INTEGRA Biosciences AG

Thermo Fisher Scientific

Bio-Rad Laboratories

Bio-Rad Laboratories

BD Biosciences

neoLab Migge GmbH

LI-COR®

Roche

Eppendorf AG

Olympus®

Thermo Fisher Scientific

Karl Hecht GmbH & Co KG

GFL®

Heraeus Holding GmbH

Tecan Group Ltd.

Scientific Industries

Köttermann GmbH

Heraeus Holding GmbH

Eppendorf AG

2.2 Verbrauchsmaterialien

Materialien

Criterion Blotter Filterpapier

Elektrophoreseigel

Hersteller

Bio-Rad Laboratories

Bio-Rad Laboratories

(Criterion™ XT Precast Gel 10 %-Bis-Tris)

FACS-Röhrchen 5 ml	BD Biosciences
Handschuhe (unsteril)	Paul Hartmann AG
Kryoröhrchen 2 ml	Thermo Fisher Scientific
Kryoröhrchen (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	nerbe plus GmbH
Kryoröhrchen safe lock (1,5 ml)	nerbe plus GmbH
Kulturflaschen (250 ml/75 cm ² , 70 ml/25 cm ² , 25 ml/12,5 cm ²)	BD Biosciences
Nitrozellulose Membran	GE Healthcare Life Sciences
PCR Platten (96-Well)	Genaxxon bioscience GmbH
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	BD Biosciences
Pipetten (verstellbar 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf AG
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	nerbe plus GmbH
Pipettenspitzen Filter	nerbe plus GmbH
Pipettierhilfe (Pipetboy)	INTEGRA Biosciences AG
Zellkulturplatten (6-, 12-, 96-Well)	Corning Incorporated
Zentrifugenröhrchen (15 ml)	Greiner Bio-One GmbH
Zentrifugenröhrchen (50 ml)	BD Biosciences

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Reagenzien

Albumin Fraktion V
Ampicillin
Annexin V Binding Buffer (10X)
APC-Annexin V
Aprotinin (10 mg/ml)
Biocoll-Trennlösung
Bradford-Reagenz (Bio-Rad Protein Assay)
Daunorubicin (1,77 mM in DMSO)

Hersteller

Carl Roth GmbH + Co. KG
Life Technologies
BD Biosciences
BD Biosciences
Roche
Biochrom GmbH
Bio-Rad Laboratories
Pfizer

Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Biochrom GmbH
Ethanol 100 %	Merck KGaA
Fetales Kälberserum (fetal bovine serum FBS)	Life Technologies; Sigma-Aldrich
Fluoresceinisothiocyanat (FITC) -Annexin V	BD Biosciences
Glycerol	Sigma-Aldrich
Glycin	Bio-Rad Laboratories
HyClone™ DMEM/High Modified	GE Healthcare Life Sciences
LB Broth	Life Technologies
Leupeptin (5 mg/ml)	Roche
MEM NEAA (100X) minimum essential medium non-essential amino acids	Life Technologies
Methanol 100 %	Merck KGaA
NaF (0,5 M)	Sigma-Aldrich
Natrium-Pyruvat (100 mM)	Life Technologies
NaVo (0,2 M)	Sigma-Aldrich
PBS (10X)	Life Technologies
Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)	Life Technologies
Pepstatin (1 mg/ml)	Roche
Perfabloc (500 mg/ml)	Roche
Phosphatase Inhibitor Cocktail II	Sigma-Aldrich
PPI	Sigma-Aldrich
Prestained Protein Ladder; Page Ruler Plus	Thermo Fisher Scientific
Propidium-Jodid	Thermo Fisher Scientific
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich
Puromycin (10 mg/ml)	Life Technologies
Rinder-Serumalbumin (bovine serum albumin BSA)	Sigma-Aldrich
RIPA Puffer	Sigma-Aldrich
RPMI Medium 1640 (1X), GlutaMAX™	Life Technologies

TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA (0,05 %)	Biochrom GmbH
Tween® 20	Carl Roth GmbH + Co. KG
XT MOPS Running Buffer (20X)	Bio-Rad Laboratories
XT Reducing Agent (20X)	Bio-Rad Laboratories
XT Sample Buffer (4X)	Bio-Rad Laboratories

2.4 Bakterienstämme

Glycerolstocks

	Hersteller
GIPZ Lentiviral Human LIN9 shRNA Clone ID: V3LHS_342744	Dharmacon
GIPZ Lentiviral empty-vector shRNA	Dharmacon

2.5 Plasmide

Plasmide

	Hersteller
LIN9 CRISPR Activation Plasmid	Santa Cruz Biotechnology
Control CRISPR Activation Plasmid	Santa Cruz Biotechnology

2.6 Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
LIN9	Maus	1:500	Santa Cruz Biotechnology
α -Tubulin	Maus	1:1000	Cell Signaling Technology
IRDye® Goat anti-Mouse 680RD	Maus	1:10000	LI-COR®
IRDye® Goat anti-Mouse 800CW	Maus	1:10000	LI-COR®

2.7 Medien und Puffer

Zellkulturmedium

450 ml RPMI/DMEM

50 ml Fetales Kälberserum (FBS)

5 ml NEAA

5 ml Penicillin/Streptomycin

5 ml Natrium-Pyruvat

Einfriermedium

25 ml Zellkulturmedium (DMEM/RPMI)

20 ml Fetales Kälberserum (FBS)

5 ml DMSO

Transferpuffer

7200 ml deionisiertes Wasser

1800 ml Methanol

129,6 g Glycin

27 g TRIS

Lysepuffer

943 µl RIPA Puffer

50 µl Glycerol

10 µl PP1

10 µl Protease Inhibitor Cocktail

10 µl Phosphatase Inhibitor Cocktail II

10 µl NaF

5 µl NaVo

1 µl Perfabloc

1 µl Pepstatin

1 µl Leupeptin

1 µl Aprotinin

Lämmli-puffer

5 µl XT Reducing Agent (20X)

25 µl XT Sample Buffer (4X)

Waschpuffer

900 ml deionisiertes Wasser

100 ml PBS (10X)

2,5 ml Tween® 20

Blockpuffer

50 ml Waschpuffer

5 ml Albumin Fraktion V

Laufpuffer

475 ml deionisiertes Wasser

25 ml XT MOPS Running Buffer (20X)

2.8 Primer und Sonden

Primer	Sequenz	Hersteller
LIN9 Vorwärts-Primer	5'-GGTTTCTGGGGTTGTGTGAG-3'	Eurofins
LIN9 Rückwärts-Primer	5'-CTGGCACAGGCTGGACTC-3'	Eurofins
GAPDH Vorwärts-Primer	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'	Eurofins
GAPDH Rückwärts-Primer	5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'	Eurofins

Protein	Sonde	Hersteller
LIN9	Universal ProbeLibrary Probe #81	Roche
GAPDH	Universal ProbeLibrary Probe #60	Roche

2.9 Kits

Kits	Hersteller
PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit	Thermo Fisher Scientific
Trans-Lentiviral Packaging Kit	Dharmacon
CRISPR Activation Plasmid Transfection	Santa Cruz Biotechnology
RNeasy Mini Kit	QIAGEN®
QIAshredder	QIAGEN®
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche

2.10 Zelllinien

Zelllinien	Hersteller
HEK293T (DSMZ-No.: ACC 635)	Thermo Fisher Scientific
Jurkat (DSMZ-No.: ACC 282)	CLS Cell Lines Service GmbH
Molm-14 (DSMZ-No.: ACC 777)	Prof. Dr. Heinrich, Oregon Health and Science University, Portland, OR

2.11 Patientenproben

In Zusammenarbeit mit der Inneren Medizin II des Universitätsklinikums Tübingen wurden für diese Arbeit 35 Blutproben und 2 Knochenmarksaspirate von Patienten mit neu diagnostizierter AML untersucht. Die Blutproben wurden vor Beginn einer Therapie abgenommen und an das Labor weitergegeben. Als Kontrolle wurden 19 Knochenmarksaspirate von gesunden Knochenmarkspendern verwendet. Das schriftliche Einverständnis der Patienten/Probanden zu einer Materialentnahme für Forschungszwecke lag vor. Der Ethikantrag (Projektnummer 405/2006BO2) wurde von der Ethikkommission der Universität Tübingen bewilligt.

2.12 Software

MagellanTM 3.0	Tecan Group Ltd.
Image Studio TM	LI-COR®
CellQuest ProTM 4.0.2	BD Biosciences
Microsoft Office 2010/2016	Microsoft
EndNote X9	Thomson Reuters
GraphPad Prism 8	GraphPad Software, Inc.

2.13 Hersteller

BD Biosciences	Franklin Lakes, NJ, USA
Biochrom GmbH	Berlin, Deutschland
Bio-Rad Laboratories	Hercules, CA, USA
Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
CLS Cell Lines Service GmbH	Eppelheim, Deutschland
Corning Incorporated	Corning, NY, USA
Dharmacon	Lafayette, CO, USA
Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Eurofins	Luxemburg
GE Healthcare Life Sciences	Marlborough, MA, USA
Genaxxon bioscience GmbH	Ulm, Deutschland
GFL®	Burgwedel, Deutschland
GraphPad Software, Inc.	San Diego, CA, USA
Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, Deutschland
Heraeus Holding GmbH	Hanau, Deutschland
INTEGRA Biosciences AG	Zizers, Schweiz
Karl Hecht GmbH & Co KG	Sondheim, Deutschland
Köttermann GmbH	Uetze, Deutschland
LI-COR®	Lincoln, NE, USA
Life Technologies	Carlsbad, CA, USA
Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland

Microsoft	Redmond, WA, USA
neoLab Migge GmbH	Heidelberg, Deutschland
nerbe plus GmbH	Winsen, Deutschland
Olympus®	Shinjuku, Tokio, Japan
Paul Hartmann AG	Heidenheim, Deutschland
Pfizer	New York City, NY, USA
QIAGEN®	Venlo, NL/Hilden, Deutschland
Roche	Basel, Schweiz
Santa Cruz Biotechnology	Dallas, TX, USA
Scientific Industries	Bohemia, NY, USA
Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Tecan Group Ltd.	Männedorf, Schweiz
Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Thomson Reuters	Toronto, Kanada

3 Methoden

3.1 Isolation der mononukleären Zellen

Um mononukleäre Zellen aus Knochenmarkproben von Spendern zu isolieren, wurden diese mittels Dichtezentrifugation in ihre Bestandteile (Erythrozyten, Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten, Thrombozyten, Plasma) aufgetrennt (Fuss et al., 2009). Hierfür wurde das Knochenmarksaspirat 1:1 mit PBS verdünnt und in einem Zentrifugenröhrchen über 15 ml Biocoll-Trennlösung geschichtet. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation (1200 rpm ohne Bremse) wurde der so genannte entstandene „buffy coat“, bestehend aus einer Schicht mononukleärer Zellen (Monozyten, Lymphozyten), vorsichtig abpipettiert und in weiteren Waschschrritten mit 50 ml PBS und 5-minütiger Zentrifugation bei 1200 rpm aufgereinigt. Abschließend wurde die Zellzahl, mittels der Neubauer Zählmethode bestimmt und die Zellen in 1 ml Kryoröhrchen mit je 1×10^6 - 5×10^7 Zellen/ml DMEM Einfriermedium bei -80°C eingefroren (siehe 3.3).

3.2 Kultivierung der eukaryotischen Zelllinien

Alle Zellkulturarbeiten fanden unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank statt. Die Zelllinien wurden bei 37°C , 5 % CO_2 sowie einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % in einem Brutschrank kultiviert. Abhängig vom Zellwachstum wurden die verwendeten Zelllinien in 5 ml (25 cm^2 Zellkulturflaschen) bzw. 10 ml (75 cm^2 Zellkulturflaschen) Zellkulturmedium kultiviert. Angaben zum verwendeten RPMI Zellkulturmedium sind unter 2.7 aufgelistet.

Alle 2 - 3 Tage wurden die Zellen neu ausgesät. Hierzu wurden die Suspensionszellen Jurkat und Molm-14 in einem Verhältnis von 1 : 10 in frischem RPMI Zellkulturmedium resuspendiert, sodass eine Dichte von etwa 1×10^5 Zellen/ml erreicht wurde.

Die adhärenenten HEK293T wurden als Erstes mit Trypsin-EDTA nach dem Protokoll des Herstellers (Biochrom GmbH) abgelöst. Anschließend wurden die Zellen in einem 1 : 5 Verhältnis neu ausgesät und weiter kultiviert.

3.3 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Um die Zellen einfrieren zu können, wurden 10 ml einer Zellsuspension für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, das Zellpellet

in Einfriermedium (siehe 2.7) auf eine finale Zellkonzentration von 1×10^7 Zellen/ml resuspendiert und die Zellsuspension anschließend in Kryoröhrchen in einem Kryokonservierungscontainer bei -80 °C eingefroren. Der Kryokonservierungscontainer stellte dabei ein schonendes Einfrieren der Zellen sicher (ca. -1 °C/min).

Das Auftauen der Zellen erfolgte bei Raumtemperatur (RT) durch Umspülen der eingefrorenen Zellen mit Zellkulturmedium. Hierdurch wurde gleichzeitig die zytotoxische Wirkung durch das flüssig werdende Einfriermedium abgeschwächt. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet je nach Größe in 5 ml bzw. 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert.

3.4 Virusherstellung

Eine mit dem LIN9-shRNA-Vektor bzw. dem leeren Kontrollvektor transformierte E. coli Suspension wurde in LB Broth Medium mit $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ Ampicillin für 24 h bei 37 °C inkubiert. Die Zugabe von Ampicillin führte zu einem selektiven Wachstum der Ampicillin resistenten und damit Vektor beinhaltenden E. coli Population.

Die Isolation der Plasmid-DNA fand nach Herstellerangaben des *PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kits* statt. Für die Produktion lentiviraler Transduktionspartikel wurden HEK293T-Zellen in einem Well einer 6-Well Platte ausgesät. Für die anschließende Transfektion sollten die Zellen in etwa eine Konfluenz von 80% aufweisen. Die Transfektion mit dem *Trans-Lentiviral Packaging Kit* erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die isolierten Viruspartikel wurden schließlich bei -80 °C gelagert und bei Bedarf für die folgende Transduktion aufgetaut.

3.5 Etablierung der Zellmodelle

3.5.1 Transduktion – Herstellung der KD Zellmodelle

Zu Beginn der Transduktion wurden die Zellen (Molm-14 bzw. Jurkat) für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert und in RPMI Medium ohne weitere Zusätze resuspendiert.

Anschließend wurde in zwei 6-Well Platten jeweils ein Ansatz mit 1 ml der Zellsuspension und $50\text{ }\mu\text{l}$ Viruspartikelsuspension (siehe 3.4) pipettiert. Ein Ansatz enthielt den LIN9 KD Virus, der andere diente mit dem EV Virus als Kontrolle.

Nach sechsstündiger Inkubation im Brutschrank wurde in beide Wells je 1 ml des RPMI Zellkulturmediums mit allen Zusätzen (siehe 2.7) hinzupipettiert. Es folgte eine weitere Inkubationszeit von 48 h.

Nach Ablauf der Zeit schloss sich eine weitere Inkubationsphase an. In dieser Phase wurden die frisch transduzierten Zellen in Puromycin-haltigem RPMI Zellkulturmedium für 72 h selektiert. Die passende Puromycin Konzentration wurde vorher in einer Verdünnungsreihe ermittelt. Bei einer Puromycin Konzentration von 10 µg/µl ergab diese für die Jurkat Zellen 0,5 µl Puromycin pro 10 ml Zellsuspension und für die Molm-14 Zellen 1 µl Puromycin pro 10 ml Zellsuspension.

Puromycin ist ein Antibiotikum, das durch seine hemmende Wirkung auf den Proteinstoffwechsel zytotoxisch wirkt (Nathans, 1964). In dem viralen Vektor ist neben der Information für die shRNA auch eine Resistenz gegen Puromycin codiert, die als Selektionsmarker für die erfolgreich transduzierten Zellen genutzt wird (de la Luna et al., 1988). Vektorpositive Zellen konnten aus diesem Grund trotz Puromycin Zugabe proliferieren, während untransduzierte Zellen nicht überlebensfähig waren.

Neben der Resistenz gegen Puromycin enthält der virale Vektor außerdem die genetische Information für das fluoreszierende Protein GFP (Green Fluorescent Protein). Indem die Expression von GFP durchflusszytometrisch gemessen wurde, konnte die erfolgreiche Integration der shRNA abschließend untersucht werden (Galbraith et al., 1999).

3.5.2 Transfektion – Herstellung der KI Zellmodelle

Die Transfektion wurde nach den Herstellerangaben des *CRISPR Activation Plasmid Transfection* Protokolls von Santa Cruz Biotechnology durchgeführt. Dabei wurde eine abgewandelte Version der CRISPR/Cas9 Methode angewendet. Die CRISPR/Cas9 Methode ermöglicht es genetische Manipulationen durchzuführen. Dies geschieht mit der Cas9 Nuklease, die mit Hilfe von guide-RNAs (gRNA) DNA an beliebiger Stelle schneiden kann. Die gRNA entscheidet dabei den Locus durch eine zum Locus komplementäre Sequenz. Dadurch kann der Locus prinzipiell frei gewählt werden. Die Cas9 führt einen gezielten Schnitt durch, der es ermöglicht, gezielt Gene zu entfernen oder einzufügen (Jinek et al., 2012, Doudna and Charpentier, 2014). In dieser Arbeit

wurde eine abgewandelte Form der CRISPR/Cas9 Methode verwendet, bei der die Nukleasefunktion der Cas9 kompromittiert wurde. Diese mutierte Cas9 (dCas9) wurde zusätzlich mit einer VP64 Transkriptionsaktivierungsdomäne fusioniert, die in der Lage ist, die Transkription zu initiieren. In Kombination mit einer sequenzspezifischen gRNA für LIN9 konnte so eine spezifische Hochregulierung erreicht werden (Koner mann et al., 2015).

24 h vor der Transfektion der Zellen (Molm-14 bzw. Jurkat) inkubierten diese in antibiotikafreiem Medium (RPMI Medium mit 10 % FBS). Am Tag der Transfektion erfolgte als Erstes die Herstellung von *Solution A* und *B*, jeweils für die Kontrolle und die LIN9 KI Zellen (*Tabelle 5*).

Tabelle 5: Zusammensetzung der Solution A und B für EV-Kontrolle und LIN9 KI.

Solution A		Solution B	
Plasmid Transfection Medium	148 μ l	Plasmid Transfection Medium	140 μ l
EV oder LIN9 Plasmid DNA	2 μ l	Transfection Reagent	10 μ l

Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT wurde *Solution A* tropfenweise in *Solution B* pipettiert und die gemischte Lösung nach weiteren 20 min in ein Well einer 6-Well Platte mit 3 ml Zellsuspension (1×10^5 Zellen/ml) gegeben. Jeweils ein Well für die EV-Kontrolle und ein Well für die LIN9 KI Zellen. Nach Ablauf von 72 h Inkubationszeit folgte die Selektion der transfizierten Zellen, wie in 3.5.1 beschrieben, mit Puromycin in RPMI Zellkulturmedium.

3.6 Quantifizierung der RNA-Expression

Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung und gleichzeitigen Quantifizierung definierter DNA Abschnitte. Die Polymerase-Kettenreaktion durchläuft hierbei mehrfach einen definierten Zyklus bestehend aus drei Phasen. Dies führt zur logarithmischen Amplifizierung der jeweiligen DNA-Sequenz. Während dieser Phasen sind verschiedene Enzyme aktiv, die durch Zusatz von Primern und Nukleotiden den gewünschten DNA Abschnitt amplifizieren. In der ersten Phase kommt es durch Erhitzen auf 95 °C zu einer Denaturierung des DNA

Doppelstranges. Daraufhin wird die Temperatur zügig auf 65 °C abgekühlt, um eine Rückbildung der Doppelhelix zu verhindern. Im Anschluss folgt die zweite Phase, das sogenannte Annealing, in der die Primer an den Matrizenstrang binden. Die Annealing Temperatur liegt zwischen 50 - 65 °C. Die genaue Temperatur hängt von der Länge des DNA Abschnittes, der Passgenauigkeit zum Matrizenstrang und der Basenkomposition (G/C Gehalt) ab. Die Primer dienen als Startpunkt für die DNA-Polymerase, die im dritten Schritt mit freien Nukleotiden den komplementären DNA Strang bildet (Elongationsphase). Diese DNA-Polymerase, auch Taq-Polymerase genannt, arbeitet bei einem Temperaturoptimum von ungefähr 70 °C (Schochetman et al., 1988). Wird innerhalb der Polymerase-Kettenreaktion zusätzlich ein DNA interkalierender Farbstoff wie z.B. SYBR-Green verwendet, so kann die Amplifikation in Echtzeit mitverfolgt werden.

Für die quantitative Messung des vervielfältigten DNA Abschnittes wurde in dieser Arbeit die TaqMan Methode verwendet, in der statt eines DNA interkalierenden Farbstoffes, sogenannte TaqMan-Sonden verwendet werden. Diese Oligonukleotidsonden binden im Bereich des zu amplifizierenden DNA Abschnittes und haben die Fähigkeit zu fluoreszieren. Die freiwerdende Fluoreszenz ist hoch spezifisch und kann gemessen werden. Je mehr Ausgangsmaterial von der, zu amplifizierenden, DNA Sequenz vorhanden ist, desto mehr Fluoreszenz wird detektiert.

Zur relativen Quantifizierung der amplifizierten DNA Produkte wird neben dem Zielgen auch ein Referenzgen amplifiziert, das unbeeinflusst von Transduktions- oder Transfektionsbehandlungen der Zellen exprimiert werden sollte (Heid et al., 1996). In dieser Arbeit wurde das Referenzgen GAPDH, das ein in der Glykolyse vorkommendes Enzym kodiert, verwendet.

3.6.1 RNA-Isolation

Zur Isolierung der RNA wurde das *RNeasy Mini Kit* von Qiagen® nach Herstellerangaben verwendet. 10 - 15 ml einer dicht gewachsenen Zellsuspension wurden pelletiert und mit RLT-Puffer lysiert. Bei sehr großen Pellets oder bei Patienten- bzw. Donorenzellen wurden 600 µl, ansonsten 350 µl, verwendet. Zusätzlich wurde in diesen Fällen das Lysat anschließend auf QIAshredder Columns gegeben und nach Anleitung des *QIAshredder*

Kits homogenisiert. Es folgten die Zugabe von Ethanol (70 %) und drei Waschschr tte mit RW1 Puffer, RPE Puffer und 80 %igem Ethanol. Um die reine, gebundene RNA zu eluieren, wurden 30 µl RNase-freies Wasser dazugegeben. Die RNA-Konzentration (ng/µl) wurde anschließend mit einem NanoDrop™ 2000 Spektralphotometer gemessen. Mögliche Proteinkontamination wurden über die Absorptionswerte bei 260 und 280 nm (A_{260}/A_{280}) gemessen (Glaseel, 1995). Das Eluat wurde bei - 20 °C gelagert oder zur cDNA-Herstellung verwendet.

3.6.2 cDNA-Herstellung

Die Herstellung von cDNA aus der isolierten RNA erfolgte nach dem Protokoll des *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* von Roche. In einem ersten Schritt wurde der Primer-Mix hergestellt (*Tabelle 6*), der für 10 min bei 65 °C im Thermocycler (Mastercycler® gradient) inkubierte.

Tabelle 6: Zusammensetzung des Primer-Mix.

Reagenz	Volumen
RNA (auf Eis)	1 µg
Random-Primer (600 pmol/µl)	2 µl
RNase-freies H ₂ O (Gesamtvolumen)	auf 26 µl

In dieser Zeit wurde der Mastermix wie in *Tabelle 7* aufgeführt hergestellt.

Tabelle 7: Zusammensetzung des Mastermix.

Reagenz	Volumen
Transkriptor Reverse Transkriptase Puffer 5x	8 µl
RNase Inhibitor (40 U/µl)	1 µl
dNTPs (10 mM)	2 µl
Reverse Transkriptase	1 µl
Gesamtvolumen	12 µl

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Primer-Mix für 1 min auf Eis heruntergekühlt und im Anschluss 12 µl Mastermix hinzupipettiert. Daraufhin wurden die Proben in einen Thermocycler transferiert. Das für die Herstellung der cDNA verwendete Temperaturprogramm des Thermocyclers ist in *Tabelle 8* dargestellt.

Tabelle 8: Thermocycler Programm zur reversen Transkription von RNA zu cDNA.

Dauer (min)	Temperatur (°C)
10	25 °C
30	55 °C
5	85 °C
∞	4 °C

Die Lagerung der synthetisierten cDNA erfolgte bis zur Verwendung bei - 20 °C.

3.6.3 qPCR

Die qPCR zur Quantifizierung der LIN9 RNA-Expression wurde mit dem *LightCycler® 480 ProbesMaster* von Roche durchgeführt. Zu Beginn wurden in eine 96-Well qPCR-Platte auf Eis pro Well jeweils 5 µl der cDNA Proben als Triplikate pipettiert. Als Negativkontrolle dienten Proben mit 5 µl H₂O ohne cDNA Zusatz in jeder Reihe. Der LC 480 ProbesMaster wurde mit den in *Tabelle 9* aufgeführten Reagenzien in ein Kryoröhrchen pipettiert und ebenfalls auf Eis gelagert. Die Vorwärts-/Rückwärts-Primer

wurden passend zum Gen (LIN9 oder GAPDH) gewählt. Die Sonden für LIN9 (#81) und für GAPDH (#60) kamen von der Universal Probelibrary, Roche (2.8). Pro Well wurden 15 µl des qPCR Ansatzes zusätzlich zu den 5 µl cDNA bzw. H₂O pipettiert, sodass es ein Gesamtvolumen von 20 µl/Well ergab.

Tabelle 9: Zusammensetzung des qPCR Ansatzes.

Reagenz	Volumen
H ₂ O	0,8 µl
Vorwärts-Primer (10x, 7,5 µmol)	2 µl
Rückwärts-Primer (10x, 7,5 µmol)	2 µl
Sonde (10 µM)	0,2 µl
LC 480 ProbesMaster (2x)	10 µl
Gesamtvolumen	15 µl

Am Ende wurde die Platte versiegelt und für 1 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die qPCR mit einem LightCycler® 480 durchgeführt. Dabei wurde das *Mono Colour Hydrolysis Programm* verwendet.

Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Der C_t -Wert gibt den Zeitpunkt an, an dem erstmals eine exponentielle Steigerung der DNA Menge über einen Hintergrundwert durch Fluoreszenzmessung detektiert werden kann. Der C_t -Wert ist abhängig von der zu Beginn eingesetzten DNA Menge (Karlen et al., 2007). Zur relativen Quantifizierung der LIN9 Expression wurde diese auf das Referenzgen GAPDH normiert (Rao et al., 2013).

3.7 Quantifizierung der Proteinexpression

Zur Messung der Proteinexpression wurde das Western Blot Verfahren mit dem BioRad Criterion® System durchgeführt. In diesem Verfahren kann die Menge des exprimierten Proteins durch die Messung eines Fluoreszenz-markierten Antikörpers detektiert werden.

3.7.1 Herstellung von Proteinlysaten und Quantifizierung nach Bradford

In einem ersten Schritt wurde der Lysepuffer, wie in 2.7 aufgelistet, auf Eis pipettiert. Daraufhin wurde die zuvor pelletierte Zellsuspension in 70 – 150 µl dieses Lysepuffers resuspendiert. Es folgte eine Inkubationszeit (auf Eis) von 15 min, in der das Lysat zu Beginn und dann alle 5 min gevortext wurde. Nach Ablauf der Inkubationszeit schloss sich eine Zentrifugation der Proben für 15 min (13200 rpm, 4 °C) in einer Tischzentrifuge an. Die Proben wurden anschließend im -20 °C Kühlschrank gelagert oder direkt weiterverarbeitet.

Um eine Vergleichbarkeit der Proteinexpressionen der Proben zu gewährleisten, mussten vorher die Proteinkonzentrationen bestimmt werden. Zur Quantifizierung der Proteinkonzentrationen wurde die Bradford Methode angewendet (Bradford, 1976).

Das Bradford-Reagenz mit dem Farbstoff Coomassie® Brilliant Blue G-250 ist eine saure, rötliche Lösung, die ein Absorptionsmaximum bei 470 nm hat. Reagiert der Farbstoff mit basischen und aromatischen Aminosäuren aus dem Proteinlysate, verschiebt sich das Absorptionsmaximum auf 595 nm und die Lösung färbt sich blau (Compton and Jones, 1985, Georgiou et al., 2008). Die Verschiebung ist dabei proportional zur Proteinmenge und ermöglicht dadurch eine Quantifizierung.

Parallel wurde eine Standard-Proteinlösung (BSA) in bekannten Konzentrationen gemessen (Compton and Jones, 1985). Hierfür wurde eine Standardreihe bestehend aus BSA im Konzentrationsbereich von 0 µg/µl bis 12 µg/µl in einem Gesamtvolumen von 200 µl Bradford-Reagenz angesetzt. Von den Proteinlysaten wurde pro Well 1 µl in 200 µl Bradford-Reagenz pipettiert. Der Ansatz erfolgte in Triplikaten in einer 96-Well Platte. Durch Erstellung einer Kalibriergerade über diese Standard-Proteinlösungen konnte die Proteinkonzentration im Lysat bestimmt werden. Die Messung erfolgte mit dem Sunrise™ Photometer.

3.7.2 Proteinauftrennung mit SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von denaturierten Proteinen nach ihrem molekularen Gewicht. Dabei wird ein elektrischer Strom an ein Polyacrylamid Gel angelegt. Der Stromfluss hat zur Folge, dass darauf aufgetragene Proteine migrieren. Abhängig vom Molekulargewicht erfahren die Proben

einen Widerstand, der zur Auftrennung der Proteine führt. Die Verwendung von SDS führt dabei zu einer gleichmäßig negativen Ladung der Proteine, sodass Eigenladungen keine Rolle bei der Auftrennung spielen und ausschließlich nach Größe aufgetrennt wird (SDS) (Al-Tubuly, 2000).

Das Denaturieren der Proben erfolgte nach Zugabe des Lämmli-Puffers (siehe 2.7) durch 5-minütiges Erhitzen der Proben auf 95 °C. Anschließend wurden die Proben bei - 20 °C eingefroren oder zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert (Laemmli, 1970).

Als Gel wurde das 10 % Criterion™ XT Bis-Tris Protein Gel von Bio-Rad Laboratories verwendet. Dieses wurde in die dafür vorgesehene Kammer geschoben und mit Laufpuffer (siehe 2.7) umspült. Im Anschluss konnten die Taschen des Gels mit 30 µl des denaturierten Lysats beladen werden. Als sichtbares Maß für die Proteingröße wurden 5 µl eines Proteinstandards (Page Ruler Plus) in eine separate Geltasche pipettiert. Die Gelelektrophorese fand bei 200 V für 60 min statt.

3.7.3 Western Blot

Im Anschluss an die SDS-Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine, ebenfalls durch das Anlegen eines Stroms, auf eine Nitrozellulose Membran übertragen (Blotting).

Die Durchführung des Blotting-Verfahrens erfolgte mit dem Criterion™ Blotter von BioRad Laboratories. Der Aufbau des Tank-Blot-Systems wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Transfer erfolgte mit Transferpuffer (2.7) und fand bei 100 V für 30 min bei 4 °C statt.

3.7.4 Immundetektion

Nach dem Blotten wurde die Membran mit 50 ml Blockpuffer (2.7) für 60 min bei RT geblockt. Der Blockpuffer verhindert die unspezifische Antikörperbindung an der Membran im weiteren Verlauf des Verfahrens. Anschließend wurde die Membran mit Waschpuffer (2.7) bei RT für 7 Minuten gewaschen. Daraufhin folgte der erste Inkubationsschritt mit einem LIN9-Primärantikörper bei 4 °C über Nacht. Hierfür wurde ein LIN9-bindender Maus-Antikörper verwendet. Am Folgetag wurde nach 4 Waschschritten mit Waschpuffer die Inkubation mit einem Sekundärantikörper für 1 h im Dunkeln durchgeführt. Als Sekundärantikörper wurde ein grün leuchtender Anti-

Maus-Antikörper verwendet. Nach weiteren 4 Waschschrritten konnte die Inkubation mit einem Primärantikörper gegen Tubulin wieder für 1 h im Dunkeln starten. Auch hier wurde ein Maus-Antikörper gegen Tubulin verwendet. Genauso wie für LIN9 beschrieben, folgten auch hier die Waschschrritte und eine Inkubation mit einem Sekundärantikörper (2.6). In diesem Fall jedoch ein rot leuchtender Anti-Maus-Antikörper um eine Unterscheidung der Banden gewährleisten zu können.

Die Primärantikörper binden hier an das zu untersuchende Protein LIN9 oder an Tubulin, was als Ladekontrolle fungiert. Tubulin eignet sich als Ladekontrolle, da es eine hohe Expression aufweist und weitestgehend, unabhängig von experimentellen Bedingungen, gleichbleibend exprimiert wird (Nie et al., 2017).

Die Primärantikörper-bindenden Sekundärantikörper werden benötigt, da sie als Infrarotfarbstoffe optimal mit dem LI-COR Odyssey® System detektiert und quantifiziert werden können.

Um die Quantifizierung in einem Balkendiagramm graphisch verdeutlichen zu können, wurde die relative Intensität der LIN9 Proteinbande, normiert nach der Intensität der Tubulin Proteinbande, berechnet. Die einzelnen Intensitäten der Banden konnten mit dem LI-COR Odyssey® System gemessen und so die Intensitäten von LIN9 in Abhängigkeit der Tubulin Intensitäten dargestellt werden.

3.8 Proliferation

Das Proliferationsverhalten der Zellen wurde über einen Zeitraum von 96 h beobachtet. Hierfür wurde alle 24 h zur selben Zeit die Zellzahl unter dem Phasenkontrastmikroskop bestimmt. Zum Zeitpunkt $t = 0$ wurde eine Zellzahl von 2,5 bzw. 5×10^5 Zellen/10 ml Zellkulturmedium gewählt. Zum Zählen der Zellen wurde die Neubauer Zählmethode angewendet. Hierfür wurden 10 μ l der Zellsuspension entnommen und mit Hilfe der Neubauer Zählkammer gezählt.

Die Zellzahl wurde mit folgender Formel bestimmt:

$$\text{Zellzahl} \left(\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Gesamtzahl gezählter Zellen}}{\text{Anzahl ausgezählter Quadranten}} * 10\,000 \text{ (Vol. Faktor)}$$

Insgesamt wurde ein Ansatz zu jedem Zeitpunkt ($t = 1$ bis $t = 4$) als technisches Triplikat gezählt, um daraus einen ersten Mittelwert berechnen zu können. Zu jeder Zellpopulation gab es darüber hinaus 3 separate Ansätze ($n = 3$; biologisches Triplikat), aus denen schließlich der endgültige Mittelwert zur Analyse der Daten ermittelt wurde. Eine weitere Auswertung der Daten erfolgte durch die Berechnung der Wachstumskonstante λ und der Zellzahlverdopplungszeit t_d (siehe *Formel 1* und *2*).

$$\lambda = \frac{\ln(N_4) - \ln(N_0)}{t_4 - t_0}$$

Formel 1: Berechnung der Wachstumskonstante λ

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\lambda}$$

Formel 2: Berechnung der Verdopplungszeit t_d

t_0	=	Ausgangszeitpunkt (0 h)
t_4	=	Beobachtungszeitpunkt (96 h)
N_0	=	Ausgangszellzahl
N_4	=	Zellzahl zum Zeitpunkt t_4
λ	=	Wachstumskonstante
t_d	=	Verdopplungszeit

3.9 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, das eine multiparametrische Analyse von Einzelzellen in Suspension ermöglicht. Dies geschieht auf Grundlage von individuellen Streuungseffekten und gegebenenfalls von Fluoreszenzeigenschaften durch genetische Modifikation oder Antikörper Markierung der Zellen.

Ein Analysestrahl, der die Zellen beinhaltet, wird durch einen, in eine Kapillare eingebrachten Druck in eine Mantelflüssigkeit gepresst. Dieser Prozess wird auch als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet. Die so geschaffene laminare Strömung leitet die Zellen einzeln, im 90° Winkel, an einem Laser vorbei. Passieren die Zellen den Laser, kommt es zu individuellen Streuungseffekten. Die Streuung der Zellen verhält sich proportional zu deren Größe und Granularität. Dabei wird in Vorwärtsstreuung und Seitwärtsstreuung unterschieden, wobei das Vorwärtsstreulicht (FSC) die Größe und das Seitwärtsstreulicht (SSC) die Granularität der Zellen beschreibt. Neben diesen beiden Informationen kann mithilfe von Fluoreszenz-markierten Antikörpern durch Bindung antigener Strukturen eine zusätzliche Aussage über Zelltyp oder Zustand der Zelle getroffen werden. Die Fluoreszenz-markierten Antikörper werden beim Passieren des

Lasers angeregt und emittieren Licht in einer bestimmten Wellenlänge. Das emittierte Licht und das Streulicht können von einem Detektor gemessen werden, was im Anschluss eine Analyse der Daten ermöglicht (McKinnon, 2018, Schmit et al., 2021).

3.9.1 Apoptosedetektion mittels Annexin V/PI Methode

Um die Apoptoserate der Zellen nach Chemotherapiebehandlung zu bestimmen, wurde die Annexin V/PI Methode mittels Durchflusszytometer angewendet.

Eine erste wichtige morphologische Veränderung apoptotischer Zellen ist die Translokation von Phosphatidylserin von der Innenseite zur Außenseite der Zellmembran. Im nächsten Schritt schrumpft die Zelle zunehmend, der Zellkern fragmentiert und die Membran wird durchlässiger (Pietkiewicz et al., 2015).

Das Protein Annexin V bindet mit hoher Affinität an das nach außen verlagerte Phosphatidylserin. In der Anwendung als Apoptosemarker wird Annexin V an einen fluoreszierenden Farbstoff, wie zum Beispiel Fluoresceinisothiocyanat FITC (emittiert bei Anregung Licht der Wellenlänge 520 nm – Farbe grün) oder Allophycocyanin APC (emittiert Licht der Wellenlänge 680 nm – Farbe rot) gekoppelt, um eine Detektierung mittels Durchflusszytometrie zu ermöglichen. Zur Unterscheidung frühapoptotischer von spätapoptotischen Zellen, braucht es neben Annexin V noch einen zusätzlichen Marker. Der zweite Marker ist Propidiumiodid (PI), der nur die durchlässige Membran von spätapoptotischen Zellen durchdringen kann und dort als DNA-Interkalator fungiert. Mithilfe dieser zwei Marker lassen sich die Zellen in verschiedene Stadien einteilen (Vermees et al., 1995).

Tabelle 10: Einteilung der Zellen mittels Annexin V/PI Methode.

Stadium	FITC/APC Annexin V	Propidiumiodid
Lebend	-	-
Frühapoptotisch	+	-
Spätapoptotisch	+	+

Vor der Apoptosemessung im Durchflusszytometer inkubierten die Zellen für 48 h in unterschiedlichen Konzentrationen des Chemotherapeutikums Daunorubicin. In einer 6-

Well Platte wurden die Zellen hierfür in 2 ml RPMI Zellkulturmedium mit Daunorubicin Konzentrationen von 10 bis 100 nM ausgesät. Nach der Inkubation wurden die Zellen pelletiert und in 100 µl Färbelösung (93 µl Annexin V Binding Buffer (1X), 2 µl Annexin V und 5 µl Propidiumiodid) resuspendiert. Für die GFP-exprimierenden KD Zellmodelle wurde APC-Annexin V, für die KI Zellmodelle FITC-Annexin V verwendet. Es folgte eine weitere Inkubation von 30 min im Dunkeln auf Eis. Vor der durchflusszytometrischen Messung wurden zu jeder Probe nochmals 150 µl Annexin V Binding Buffer (1X) pipettiert.

Im Anschluss an die Messung wurden die IC_{50} Werte (Konzentration an Daunorubicin (nM), bei der 50 % der Zellen apoptotisch sind) berechnet.

3.10 Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels der Software GraphPad Prism®. Für die in vitro Versuche im Zellmodell wurde von einer Normalverteilung der gemessenen Werte ausgegangen. Als statistischer Test wurde hierfür der Student's t-Test angewendet. Für nicht normalverteilte Datensätze kamen der Mann-Whitney-U- bzw. der Kruskal-Wallis-Test zur Anwendung. Unter Annahme nicht normalverteilter Datensätze wurde zur Signifikanzprüfung der Korrelationen zwischen LIN9 Expression und klinischen Charakteristika die Spearman-Rang Korrelation durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 LIN9 Expression in gesunden Knochenmarkspendern und AML Patienten

Untersuchungen zu der Funktion von LIN9 wurden bisher bereits in mehreren onkologischen Erkrankungen angestellt. Jedoch gibt es zu LIN9 in akuten Leukämien bisher keine publizierten Arbeiten. Daher wurde hier zu Beginn untersucht ob und falls ja – wie hoch LIN9 in nativen Leukämiezellen exprimiert wird. Dies wurde mittels der q-PCR Methode in Blutproben und Knochenmarksaspiraten von 37 AML Patienten analysiert. Als Referenzgen fungierte GAPDH und die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode (siehe 3.6.3). Eingeschlossen wurden Patienten, bei denen der Mittelwert der C_t -Werte von GAPDH < 25 lag.

Als Basiswert wurde die LIN9 Expression in 19 gesunden Knochenmarkspendern (Donoren) als Kontrolle analysiert (*Tabelle 11*).

Tabelle 12 gibt die LIN9 Expression aller gemessenen Patientenproben wieder. Die LIN9 Expression wurde dabei auf den Mittelwert der Donoren normalisiert. Außerdem gibt *Tabelle 12* weitere klinische Basischarakteristika an – die Gewichtung an der Gesamtkohorte ist ergänzend in *Tabelle 13* zusammengefasst.

Tabelle 11: Mittels q-PCR ermittelte LIN9 Expression von gesunden Knochenmarkspendern. Einzelwerte werden normalisiert auf den Mittelwert angegeben.

Donoren	LIN9 Expression
D1	1,27
D2	0,9
D3	0,89
D4	0,78
D5	1,36
D6	0,98
D7	0,53
D8	0,8
D9	1,34
D10	1,09

Donoren	LIN9 Expression
D11	0,74
D12	1,15
D13	0,83
D14	1,14
D15	1,01
D16	1,15
D17	0,94
D18	1,09
D19	1,01

Tabelle 12: Klinische Parameter und experimentell ermittelte LIN9 Expression von AML Patienten.

Patient	Alter (Jahre)	Ätiologie	ELN	Leukozytenzahl (Zellen/ μ l)	Therapieansprechen	LIN9 Expression
P1	80	de novo	ungünstig	85000	NR	0,12
P2	79	de novo	ungünstig	38000	-	0,12
P3	31	de novo	ungünstig	214000	NR	0,44
P4	58	de novo	intermediär	87940	R	0,14
P5	58	sekundär	intermediär	62000	NR	0,14
P6	70	de novo	ungünstig	3500	-	0,68
P7	71	de novo	intermediär	58900	R	0,06
P8	82	de novo	günstig	181000	-	3,72
P9	83	de novo	intermediär	920	-	0,02
P10	67	de novo	intermediär	42700	NR	0,3
P11	69	sekundär	intermediär	3940	NR	3,32
P12	52	de novo	günstig	23440	R	1,73
P13	72	de novo	günstig	6800	-	0,08
P14	71	sekundär	intermediär	87140	-	0,15
P15	64	de novo	günstig	61500	R	1,02
P16	63	sekundär	-	183000	-	0,04
P17	51	de novo	intermediär	1270	NR	1,68
P18	62	de novo	ungünstig	3100	NR	5,69
P19	78	sekundär	günstig	55300	-	0,07
P20	49	de novo	intermediär	9700	R	1,29
P21	77	de novo	günstig	37000	-	0,36
P22	76	sekundär	intermediär	39250	NR	0,58
P23	47	de novo	ungünstig	13500	R	0,95
P24	68	de novo	ungünstig	14300	NR	4,99
P25	49	de novo	günstig	69900	-	1,02

*R (Responder; engl. Ansprechergruppe), NR (Non-Responder; engl. Nicht-Ansprechergruppe)

Patient	Alter (Jahre)	Ätiologie	ELN	Leukozytenzahl (Zellen/ μ l)	Therapieansprechen	LIN9 Expression
P26	67	de novo	günstig	187000	R	1,05
P27	65	sekundär	intermediär	56000	NR	0,13
P28	73	de novo	intermediär	33300	R	0,31
P29	59	sekundär	günstig	211640	R	0,09
P30	45	de novo	ungünstig	880	NR	0,6
P31	69	sekundär	intermediär	49440	-	0,17
P32	29	de novo	ungünstig	33000	NR	0,11
P33	73	de novo	ungünstig	-	-	0,06
P34	78	sekundär	intermediär	16000	-	0,6
P35	78	sekundär	-	34000	-	0,23
P36	57	de novo	ungünstig	54000	R	2,15
P37	81	de novo	intermediär	60900	-	0,16

*R (Responder; engl. Ansprechergruppe), NR (Non-Responder; engl. Nicht-Ansprechergruppe)

Tabelle 13: Subgruppen der AML Patientenkohorte (n = 37).

Altersdurchschnitt (Jahren)	(n = 37)	65
durchschnittliche Leukozytenzahl (Zellen/μl)	(n = 36)	58868
Ätiologie	(n = 37) (n = 26) (n = 11)	de novo AML sAML
ELN-Risikostratifizierung	(n = 35) (n = 9) (n = 15) (n = 11)	günstig intermediär ungünstig
Therapieansprechen auf Induktionstherapie	(n = 22) (n = 10) (n = 12)	Responder Non-Responder

4.1.1 AML zeigen verminderte LIN9 Expression

Zu Beginn wurde die LIN9 Expression der gesamten AML Kohorte mit der LIN9 Expression von gesunden Knochenmarkspendern verglichen.

Abbildung 2 zeigt eine grafische Darstellung der ermittelten Werte. Es fällt auf, dass die einzelnen Werte der AML Kohorte einer erheblichen Streuung unterliegen. Der Interquartilsabstand (IQR), also das Intervall, in dem die mittleren 50 % der gemessenen Werte liegen (Whitley and Ball, 2002), betrug in der AML Kohorte 0,92 und war damit fast dreimal so groß wie der IQR der Donoren. Ebenso war das Minimum in der AML Kohorte deutlich kleiner und das Maximum deutlich größer als in der Kontrollgruppe. Um einzelne Ausreißer deutlicher zu zeigen, wurden die Werte in einem Box-Whisker Plot nach Tukey dargestellt. Nach Tukey sind die Antennen auf das maximal 1,5 fache des Interquartilsabstands definiert. Die Antennen enden somit am letzten Wert, der noch innerhalb dieser Spanne liegt. Die Werte außerhalb dieses definierten Bereichs werden als einzelne Markierungen dargestellt (Buttarazzi et al., 2018).

Trotz der beschriebenen Streuung lag der Median der AML Kohorte mit 0,31 deutlich unter dem der gesunden Kohorte. Die einzelnen Werte sind der *Tabelle 14* zu entnehmen. Im Mittel zeigte sich eine signifikante Reduktion der LIN9 Expression ($p = 0,0061$) in der gesamten AML Kohorte im Vergleich zu den gesunden Knochenmarkspendern. Die Signifikanz-Testung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test.

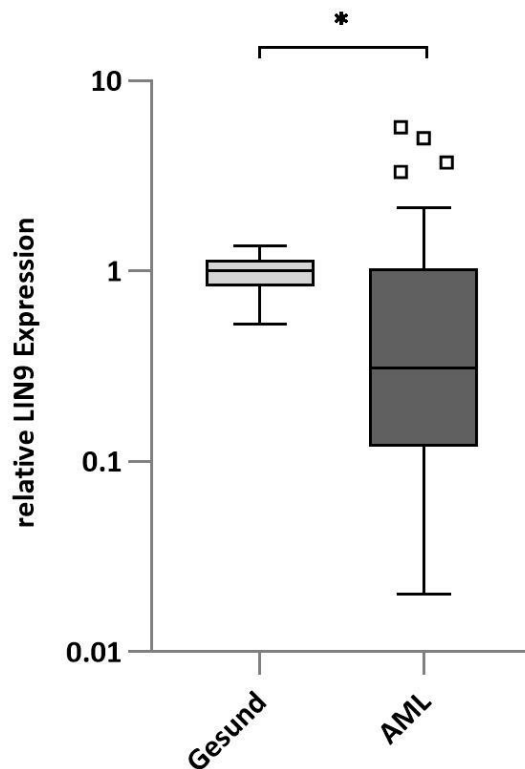


Abbildung 2: **Mittlere LIN9 Expression in gesunden Donoren und AML Patienten.**
 Vergleich der LIN9 Expression in gesunden Donoren (n = 19) und AML Patienten (n = 37). Die Darstellung erfolgt durch Box-Whisker Plot nach Tukey. Die ermittelten Mediane sind als waagerechte Linien innerhalb der Boxen dargestellt. Die Signifikanz wird durch * $p < 0,05$ gezeigt.

Tabelle 14: Auflistung der statistischen Parameter der LIN9 Expression von gesunden Donoren und AML Patienten.

	Gesund (n = 19)	AML (n = 37)
Minimum	0,53	0,02
Maximum	1,36	5,69
Median	1,01	0,31
IQR	0,32	0,92
95 %-CI	[0,83; 1,15]	[0,14; 0,68]

4.1.2 Patienten mit sekundärer AML zeigen verminderte LIN9 Expression

Um eine genauere Analyse der AML Kohorte zu ermöglichen, wurde diese anhand der Ätiologie unterteilt. Hierbei wurde zwischen einer neu entstandenen AML (de novo AML) und einer sekundären AML (sAML), beispielsweise aus einem myelodysplastischen Syndrom (MDS) oder einer myeloproliferativen Neoplasie (MPN) unterschieden.

Wie in *Abbildung 3* zu sehen, zeigte sich bei den de novo AML (n = 26) wie auch bei der Subgruppe der sAML (n=11) im Median eine Verminderung der LIN9 Expression verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe (n = 19). Die Kohorte der de novo AML wies im Vergleich zu der Kohorte der sAML allerdings einen deutlich größeren Interquartilsabstand auf (IQR_{de novo AML} = 1,27 vs. IQR_{sAML} = 0,49), sodass folgerichtig formal nur für die sAML eine signifikante Reduktion der mittleren LIN9 Expression festgelegt werden konnte (p = 0,0038).

Die statistischen Kennwerte sind in *Tabelle 15* aufgelistet. Die Signifikanz-Testung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test.

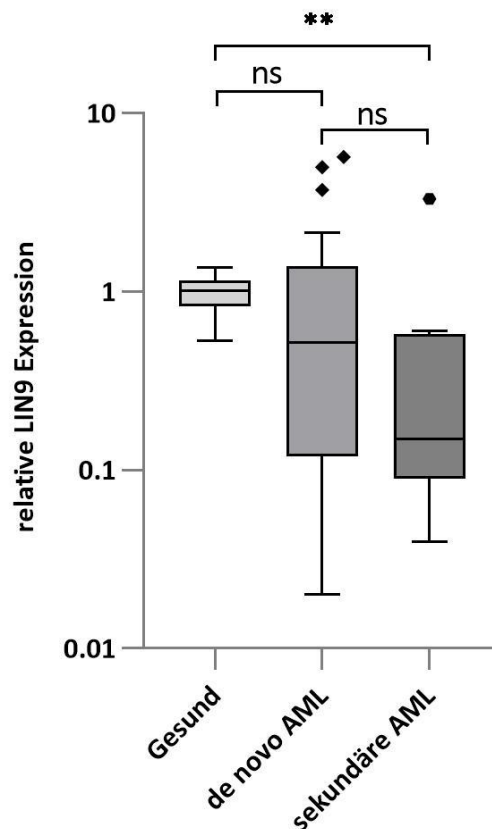


Abbildung 3: Mittlere LIN9 Expression bei Unterscheidung nach Ätiologie der AML.

Patienten mit einer sAML zeigen im Vergleich zu der gesunden Kohorte eine signifikante Repression der mittleren LIN9 Expression. Zwischen der de novo AML (n = 26) und der sAML (n = 11) zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Expressionen werden mit Box-Whisker Plot nach Tukey gezeigt. ** p < 0,005, ns = nicht signifikant.

Tabelle 15: Auflistung der statistischen Parameter der LIN9 Expression von Gesunden, de novo und sAML.

	Gesund (n = 19)	de novo AML (n = 26)	sAML (n = 11)
Minimum	0,53	0,02	0,04
Maximum	1,36	5,69	3,32
Median	1,01	0,52	0,15
IQR	0,32	1,27	0,49
95 %-CI	[0,83; 1,15]	[0,14; 1,05]	[0,09; 0,58]

4.1.3 AML mit intermediärer Prognose zeigen verminderte LIN9 Expression

Ein weiterer klinischer Parameter, der in die Analyse miteingeschlossen wurde, ist die Einteilung der AML Kohorte anhand der ELN-Risikostratifizierung (siehe *Tabelle 2*) in drei Gruppen. Demnach konnten die Patienten in eine Gruppe mit günstiger Prognose (n = 9), in eine Gruppe mit intermediärer Prognose (n = 15) und in eine Gruppe (n = 11), die nach ELN-Kriterien einen prognostisch ungünstigen Verlauf aufweist, eingeteilt werden. Auch in den drei unterschiedlichen Gruppen zeigte sich jeweils, genau wie in der gesamten AML Kohorte, eine große Streuung der einzelnen LIN9 Expressionen (*Abbildung 4*). Die jeweiligen IQR sind *Tabelle 16* zu entnehmen. Eine signifikante Reduktion der mittleren LIN9 Expression im Vergleich zu der Donorengruppe konnte formal nur in der Gruppe mit der intermediären Prognose ($p = 0,0386$) gezeigt werden – wobei dies vor allem der hohen Streuung der Expressionswerte in den Gruppen mit günstiger und ungünstiger Prognose geschuldet zu sein scheint. Die Signifikanz-Testung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test.

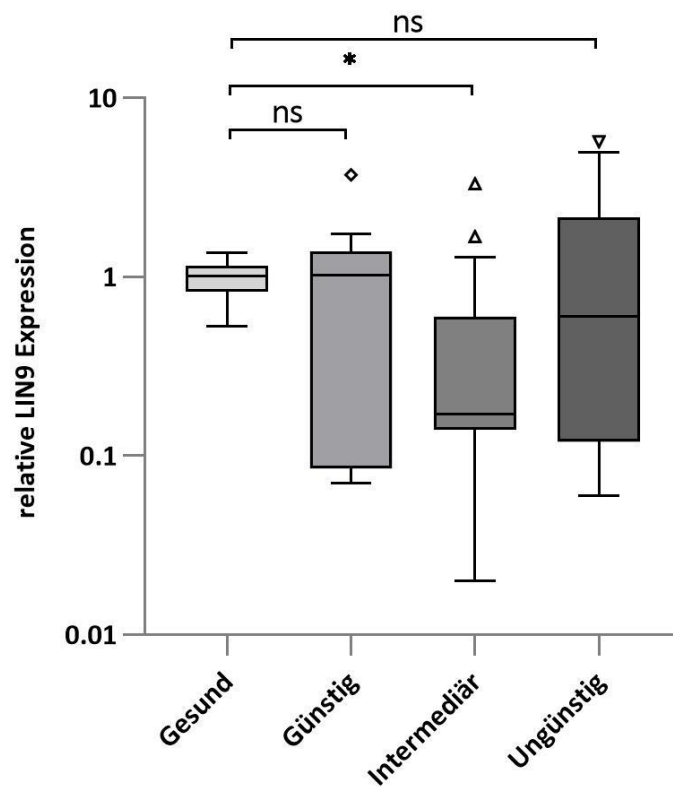


Abbildung 4: Mittlere LIN9 Expression bei Unterscheidung nach Prognose der AML.

Die Einteilung der akuten myeloischen Leukämien anhand ihrer Prognose zeigt in der Gruppe mit der intermediären Prognose (n = 15) eine Herabregulation der mittleren LIN9 Expression im Vergleich zu der gesunden Kohorte (n = 19). Darstellung mittels Box-Whisker Plot nach Tukey. * p < 0,05, ns = nicht signifikant.

Tabelle 16: Auflistung der statistischen Parameter der LIN9 Expression von Gesunden und AML Risikosubgruppen.

	Gesund (n = 19)	Günstig (n = 9)	Intermediär (n = 15)	Ungünstig (n = 11)
Minimum	0,53	0,07	0,02	0,06
Maximum	1,36	3,72	3,32	5,69
Median	1,01	1,02	0,17	0,6
IQR	0,32	1,3	0,46	2,03
95 %-CI	[0,83; 1,15]	[0,08; 1,73]	[0,14; 0,6]	[0,11; 4,99]

4.1.4 Kein Unterschied in der LIN9 Expression bei Unterteilung nach Therapieansprechen

Im Weiteren wurde untersucht, wie die LIN9 Expression zwischen Patienten mit gutem Therapieansprechen und einer zweiten Gruppe ohne Ansprechen auf Therapie verteilt ist. Beide Gruppen wurden mit der Kohorte der gesunden Knochenmarkspender verglichen. Ein Ansprechen auf Therapie wurde dann angenommen, wenn nach Abschluss der Induktionstherapie eine komplette Remission erreicht werden konnte (Dohner et al., 2010). Diese Subgruppe wurde daher als Responder (R, engl. Ansprechergruppe) bezeichnet. Non-Responder (NR, engl. Nicht-Ansprechergruppe) bezeichneten die Patienten, bei denen die Induktionstherapie kein ausreichendes Ansprechen zeigte oder nicht abgeschlossen werden konnte. Neben den Respondern (n = 10) und den Non-Respondern (n = 12) konnten 15 Patienten nicht in diese Subgruppenanalyse eingeschlossen werden, da die Voraussetzungen für eine intensive Chemotherapie aufgrund hohen Alters oder Komorbiditäten nicht gegeben waren.

Wie in *Abbildung 5* dargestellt, zeigte sich bei den Non-Respondern im Median eine verminderte LIN9 Expression im Vergleich zur gesunden und Responder Subgruppe – wobei formal keine Signifikanz vorlag. Die Signifikanz-Testung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test. Zahlenwerte sind in *Tabelle 17* dargestellt.

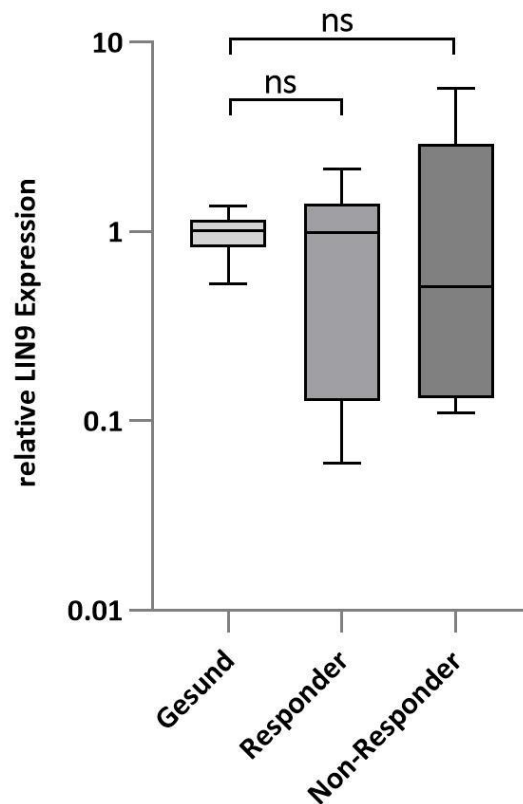


Abbildung 5: Mittlere LIN9 Expression bei Unterscheidung nach Therapieansprechen.

Die Subgruppen Responder (R) und Non-Responder (NR) zeigen im Mittel untereinander und auch im Vergleich zur gesunden Kohorte keinen signifikanten Unterschied in der LIN9 Expression. Auch hier erfolgt die Darstellung mittels Box-Whisker Plot nach Tukey. ns = nicht signifikant.

Tabelle 17: Auflistung der statistischen Parameter der LIN9 Expression von Gesunden und Responder bzw. Non-Responder.

	Gesund (n = 19)	Responder (n = 10)	Non-Responder (n = 12)
Minimum	0,53	0,06	0,11
Maximum	1,36	2,15	5,69
Median	1,01	0,985	0,51
IQR	0,32	1,27	2,78
95 %-CI	[0,83; 1,15]	[0,09; 1,73]	[0,13; 3,32]

4.1.5 Keine Korrelation zwischen LIN9 Expression und Alter oder Leukozytenzahl

Neben der Einteilung der Leukämien anhand der ELN-Risikostratifizierung sind auch das Alter und die Leukozytenzahl bei Diagnosestellung wichtige Parameter, die einen Vorhersagewert über die Prognose besitzen. Ein hohes Alter, sowie erhöhte Leukozytenwerte besitzen einen negativen Vorhersagewert über die Prognose (Papaemmanuil et al., 2016). Aus diesem Grund wurde im Folgenden untersucht, ob eine Korrelation zwischen dem Alter (Jahre) der Patienten oder der Anzahl der Leukozyten (Zellen/ μ l) bei Diagnosestellung und der LIN9 Expression zu erkennen ist.

Der Gruppenvergleich erfolgte mittels Spearman-Rang Korrelation. Der Spearman-Rang Korrelationskoeffizient r_s zeigt eine negative Korrelation bei Werten $r_s < 0$ und eine positive Korrelation bei Werten $r_s > 0$ an. Ein $r_s = 0$ zeigt eine fehlende Korrelation zwischen den Gruppen an (Sedgwick, 2014). In den hier untersuchten Gruppenvergleichen zeigte sich keine signifikante Korrelation. Der Vergleich von Alter und LIN9 Expression ergab einen $r_s = -0,31$. Bei der Leukozytenzahl verglichen mit der LIN9 Expression resultierte ein $r_s = -0,28$ – beide Korrelationen mit einem p-Wert $> 0,05$. In *Abbildung 6* sind in *A* die einzelnen Messwerte für das Alter ($n = 37$) und in *B* die Leukozytenzahl ($n = 36$) dargestellt.

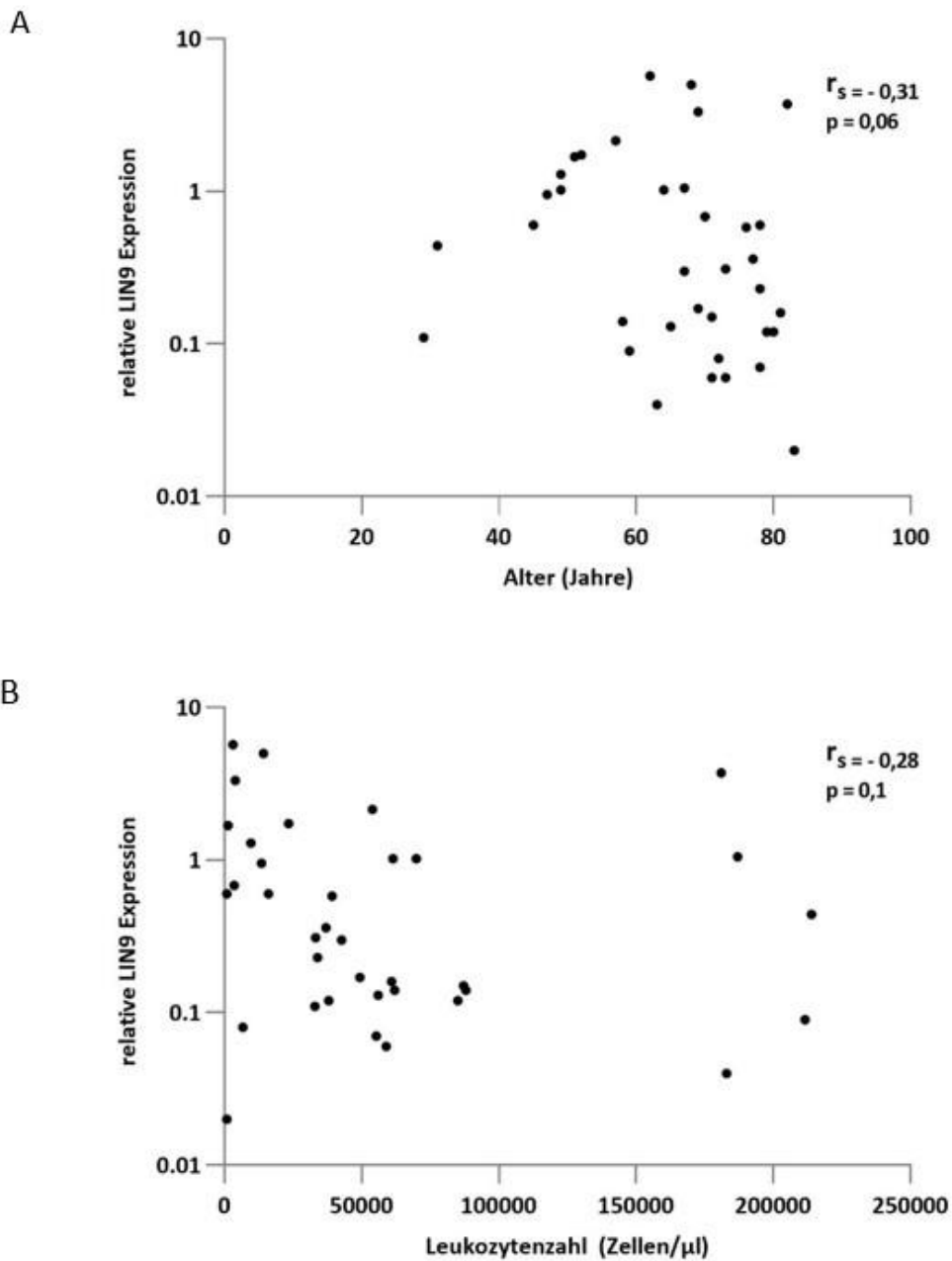


Abbildung 6: Korrelation zwischen Alter bzw. Leukozytenzahl und mittlerer LIN9 Expression.

(A) Alter (Jahre) und LIN9 Expression. Eine Auswertung mittels Spearman-Rang-Korrelation ergibt einen $r_s = -0,31$ und einen p -Wert von $0,06$. Es zeigt sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Alter der Patienten und der mittleren LIN9 Expression in AML.

(B) Leukozytenzahl (Zellen/ μ l) und LIN9 Expression. Die Leukozytenzahl bei Diagnosestellung korreliert nicht mit der mittleren LIN9 Expression in AML. ($r_s = -0,28$; $p = 0,1$)

4.2 Funktionelle Untersuchung von LIN9

Wir konnten bisher zeigen, dass die LIN9 Expression in AML stark variiert und gehäuft vermindert exprimiert wird. Der große IQR in einigen Messungen zeigte allerdings die häufig große Streuung der Expressionslevel von LIN9 in AML auf. Eine formal signifikant geringere mittlere LIN9 Expression ließ sich im Besonderen bei sAML und in der AML Kohorte mit intermediärer Prognose nach ELN nachweisen.

Um genauere Einblicke in die Funktion von LIN9 in akuten myeloischen Leukämien zu erhalten, wurde ein LIN9 knock-down (KD) und knock-in (KI) Modell in der AML Zelllinie Molm-14 etabliert (siehe 3.5).

Für translatorische Zwecke wurde zudem eine akute lymphatische Leukämiezelllinie (Jurkat, T-ALL) verwendet, um den prinzipiellen Beweis eines funktionellen Einflusses von LIN9 in lymphatischen Leukämien zu führen.

An beiden Zellmodellen wurde das Proliferationsverhalten der Zellen in Abhängigkeit von LIN9 ermittelt. Zudem wurde die Fähigkeit zur Apoptoseinduktion nach Anthrazyklinexposition untersucht.

4.2.1 Molm-14 LIN9 KD Zellmodell

Das Molm-14 Zellmodell zum LIN9 KD wurde mithilfe der lentiviralen Transduktionsmethode (siehe 3.5.1) etabliert. Der Transduktionserfolg wurde durch eine GFP Messung mittels Durchflusszytometer dargestellt (Abbildung 7).

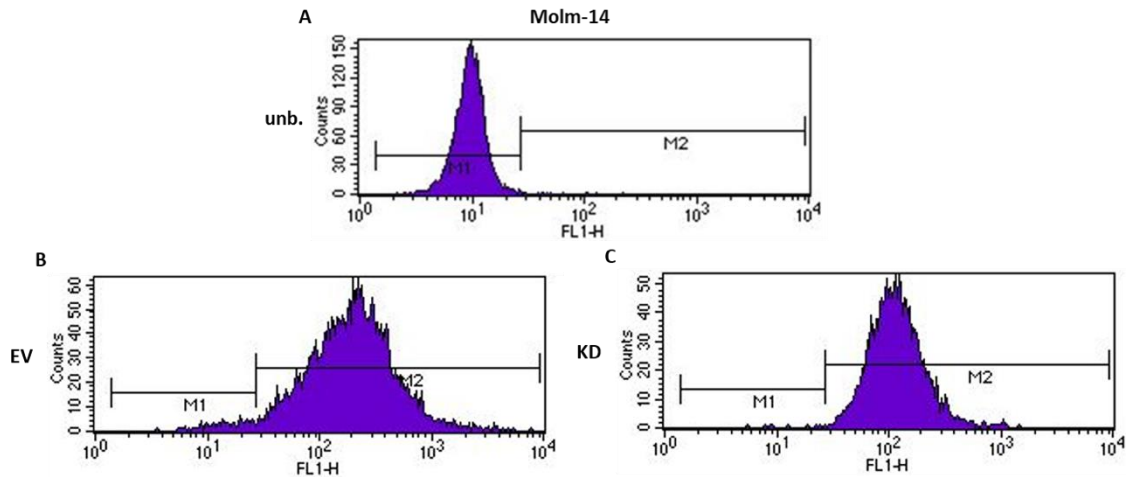


Abbildung 7: Durchflusszytometrische Quantifizierung der GFP-positiven Zellpopulationen der transduzierten Molm-14 Zellen.

Die x-Achse gibt die Intensität der GFP-Fluoreszenz an. Zellen innerhalb der M2-Spanne zeigen eine GFP-Positivität. Die y-Achse stellt die absolute Anzahl der gezählten Counts dar.

In (A) – (C) ist die GFP Expression der Zelllinie Molm-14 zu sehen. (A) zeigt eine unbehandelte Negativkontrolle ohne GFP-Expression. (B) zeigt die Molm-14 EV Zellen mit einer GFP-positiven Zellfraktion von 97,78 %. (C) zeigt die Molm-14 LIN9 KD Zellen mit einer GFP-positiven Zellfraktion von 99,76 %.

4.2.1.1 Verifikation des LIN9 KD Zellmodells

Zur Verifikation einer erfolgreichen Transduktion und somit der Zellmodelletablierung wurde neben der Überprüfung der vektorspezifischen GFP Expression eine Reduktion der LIN9 Expression auf RNA Ebene mittels q-PCR, sowie auf Proteinebene mittels eines Western Blots (WB) untersucht.

Für die q-PCR erfolgte die Berechnung der ermittelten LIN9 Expressionen im KD Zellmodell, wie auch bei den Patientenexpressionen, mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Hierbei wurde als Referenzgen GAPDH verwendet und die ermittelten LIN9 Expressionen auf das LIN9 Expressionslevel der EV-Kontrolle (Relative LIN9 Expression des Molm-14-EV-Zellmodell = 1) normiert.

Wie in *Abbildung 8 A* zu sehen, zeigte der KD eine Reduktion der LIN9 Expression von ca. 80 %.

Im Weiteren erfolgte der Nachweis auf Proteinebene mittels Western Blot. In *Abbildung 8 B* sind die Proteinbanden der drei Isoformen von LIN9, die bei 58, 62 und 64 kDa liegen, erkennbar. Diese sind im Vergleich zur EV-Kontrolle im LIN9 KD mit einer geringeren Intensität zu erkennen. Als Ladekontrolle wurde Tubulin in beiden Zellmodellen verwendet, das bei 52 kDa zu sehen ist. Unter *Abbildung 8 C* sind die quantifizierten und auf die Kontrolle normalisierten Intensitäten der Banden als Säulen-Diagramm dargestellt. Hier konnte eine Reduktion des LIN9 Proteins um 65 % festgestellt werden.

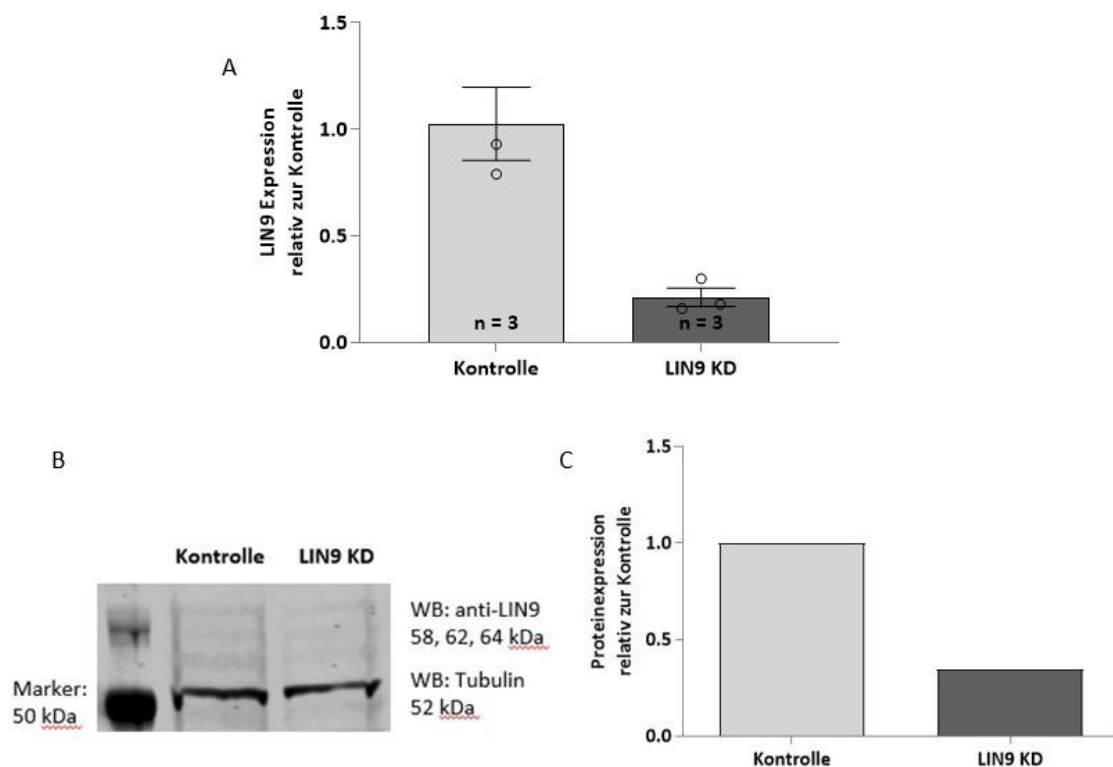


Abbildung 8: LIN9 Expression auf RNA Ebene und Proteinebene im Molm-14 LIN9 KD Zellmodell.

A) In der q-PCR zeigte sich eine Suppression der LIN9 RNA im Molm-14 LIN9 KD Zellmodell im Vergleich zu der Molm-14 EV-Kontrolle. Referenzgen war GAPDH. n gibt die Anzahl der technischen Replikate an. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwertes an.

(B) Mittels Western Blot konnte eine verminderte Proteinexpression von LIN9 im KD Zellmodell gezeigt werden. Die relativen Intensitäten der detektierten Proteinbanden von der Molm-14 EV-Kontrolle und vom Molm-14 LIN9 KD sind in (C) dargestellt. Als Ladekontrolle diente Tubulin. Original Western Blot ist im Anhang (Abbildung 21) abgebildet.

4.2.1.2 Suppression der LIN9 Expression in Molm-14 zeigt geringen Einfluss auf die Proliferation

Die Proliferationsaktivität von malignen Zellen ist ein wichtiger Parameter, der eine Aussage über die Aggressivität der Zellen erlaubt. Der Transkriptionsfaktor LIN9 spielt

eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellzyklus, in dem er wiederum kontextabhängig in unterschiedlichen Komplexen Proliferation aktivieren oder inhibieren kann (Iness et al., 2019). Mit einem Proliferationsassay wurde festgestellt, ob die Repression von LIN9 in der AML Zelllinie Molm-14 Auswirkungen auf deren Proliferationsverhalten zeigt. Hierzu wurden zum Zeitpunkt $t = 0$, 5×10^5 Zellen in 10 ml Kulturmedium ausgesät und über 4 Tage mithilfe der Phasenkontrastmikroskopie alle 24 h gezählt (siehe 3.8). *Abbildung 9* stellt das nahezu gleiche Wachstumsverhalten von Molm-14 EV-Kontrolle und LIN9 KD Zellmodell dar. Zu den Zeitpunkten 24 und 48 h zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Wachstumsverhalten der beiden Zellmodelle. Nach 72 h zeigte sich ein formal signifikant schnelleres Wachstum der Kontrolle gegenüber dem KD Zellmodell ($p = 0,0319$), was jedoch nach 96 h nicht mehr nachzuweisen war. Die Verdopplungszeit (t_d) betrug bei der EV-Kontrolle 23,9 h und beim LIN9 KD 24,8 h (*Tabelle 18*). Zur Testung der Signifikanz wurde der t-Test verwendet.

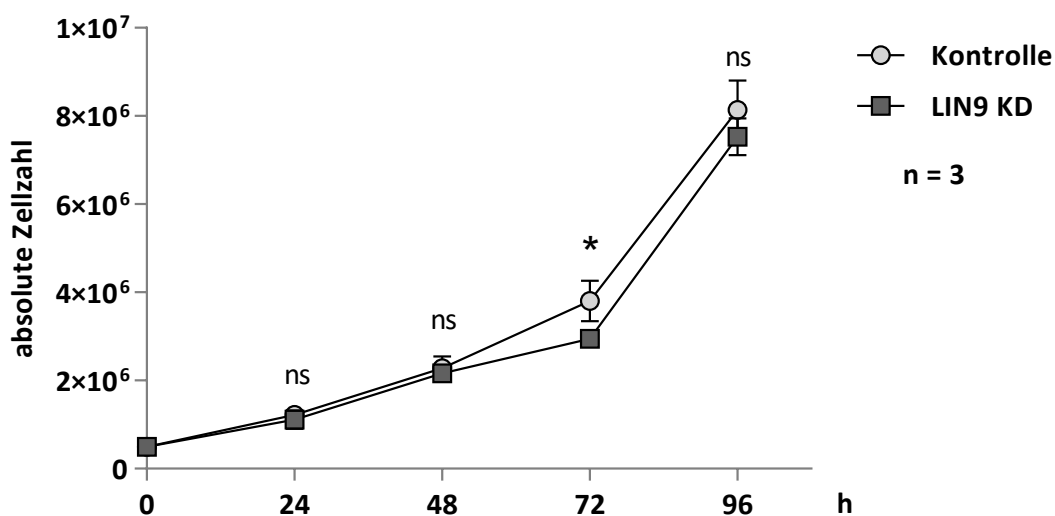


Abbildung 9: Proliferation von Molm-14 LIN9 KD Zellen im Vergleich zur Kontrolle.

Die AML Zelllinie zeigt in der Kontrolle und im LIN9 KD ein nahezu gleiches Proliferationsverhalten. Bei 24, 48 und 96 h zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Zellzahl. Zum Zeitpunkt 72 h ließ sich ein signifikanter Unterschied im Wachstum von $* p < 0,05$ feststellen. n gibt die Anzahl der technischen Replikate an. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwertes an. ns = nicht signifikant.

Tabelle 18: Verdopplungszeit im Molm-14 LIN9 KD Zellmodell.

Zelllinie	Wachstumskonstante λ (h^{-1})	Verdopplungszeit t_d (h)
Molm-14 Kontrolle	0,029	23,9
Molm-14 LIN9 KD	0,028	24,8

4.2.1.3 Verminderte LIN9 Expression resultiert in einer erhöhten Apoptoserate

Als weitere Untersuchung wurde ein Apoptoseassay durchgeführt. Hierbei wurde das Ansprechen der Leukämiezellen auf das Chemotherapeutikum Daunorubicin in Dosis-Wirkungskurven gemessen. Daunorubicin, ein Anthrazyklin, wird zur Behandlung von akuten Leukämien im Rahmen der Induktionschemotherapie eingesetzt und fördert als potenter Apoptosestimulator die Einleitung von Apoptoseprozessen in malignen Zellen (Jaffrezou et al., 1996).

In der Tat konnte gezeigt werden, dass die Herabregulation von LIN9 in der Molm-14 KD Zelllinie den Anteil apoptotischer Zellen (%) signifikant erhöht. Die Kontrolle zeigte bei einer Daunorubicin Konzentration von 50 nM 34,5 % apoptotische Zellen – wobei im LIN9 KD mit 65,3 % bereits nahezu doppelt so viele Zellen in Apoptose waren (*Abbildung 10*). Der resultierende IC_{50} des LIN9 KD betrug dabei 38,61 nM – im Vergleich zu 47,77 nM der Kontroll (EV) Zelllinie (*Tabelle 19*).

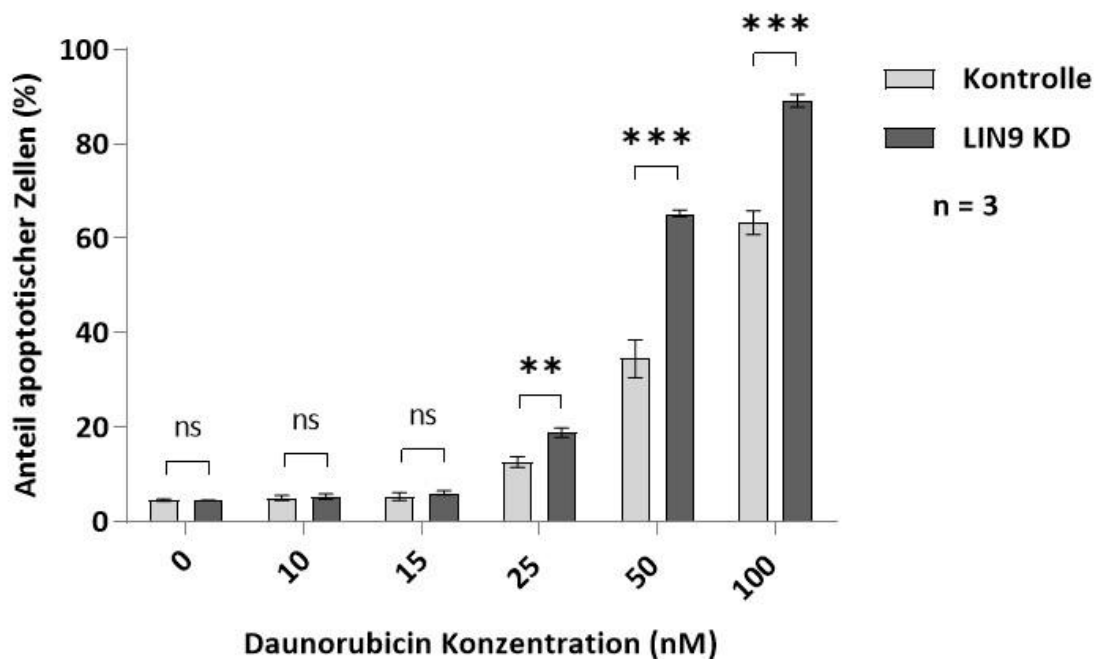


Abbildung 10: Apoptoseinduktion im Molm-14 KD Zellmodell.

Eine Suppression von LIN9 in der Zelllinie Molm-14 resultiert in einer erhöhten Apoptoserate nach Stimulation mit Daunorubicin. Ab Daunorubicin Konzentrationen von 25 nM zeigt sich eine signifikant höhere Apoptoserate im LIN9 KD Zellmodell. n gibt die Anzahl der technischen Replikate an. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwertes an. ** $p < 0,005$ und *** $p < 0,0005$, ns = nicht signifikant.

Tabelle 19: Ermittelte IC_{50} Werte für die Behandlung mit Daunorubicin.

Zelllinie	Molm-14 Kontrolle	Molm-14 LIN9 KD
IC_{50} Daunorubicin (nM)	47,77	38,61

4.2.2 Molm-14 LIN9 KI Zellmodell

Ergänzend zu den Untersuchungen am LIN9 KD Zellmodell wurden die bereits beschriebenen Versuche zu Proliferation und Apoptose an einem verifizierten LIN9 KI Zellmodell der Zelllinie Molm-14 durchgeführt. Der KI wurde, wie in Abschnitt 3.5.2 genauer beschrieben, mit einem 3 Plasmid System transfiziert, das über eine Mutante des CRISPR/Cas9 Proteins eine Aktivierung der LIN9 Expression verursacht.

4.2.2.1 Verifikation des LIN9 KI Zellmodells

Die erfolgreiche Transfektion konnte durch eine q-PCR verifiziert werden. Wie in *Abbildung 11* gezeigt, wurde für das KI Zellmodell mit einer relativen Expression von 1,91 eine Steigerung der LIN9 RNA-Expression um 91 % gemessen.

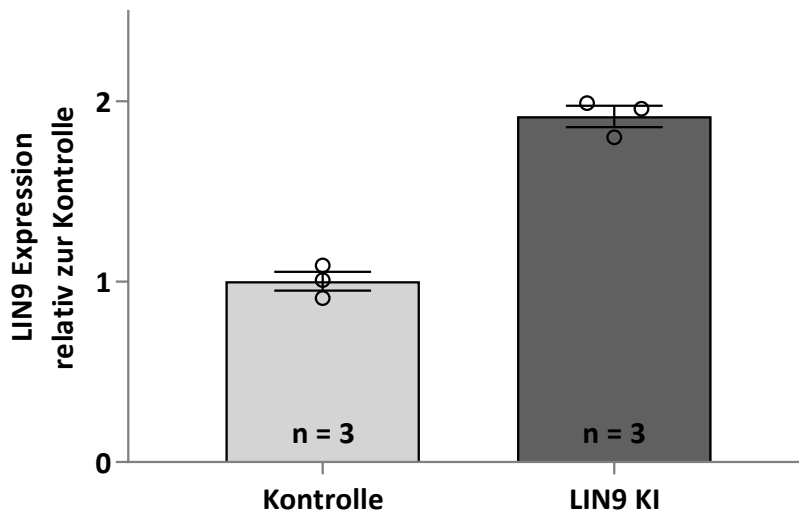


Abbildung 11: **LIN9 Expression im Molm-14 KI Zellmodell.**

In der q-PCR konnte eine erfolgreiche Steigerung der LIN9 Expression auf RNA Ebene im LIN9 KI Zellmodell der Zelllinie Molm-14 im Vergleich zur EV-Kontrolle gezeigt werden. Als Referenzgen diente GAPDH. n gibt die Anzahl der technischen Replikate an. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwertes an.

4.2.2.2 Erhöhte LIN9 Expression zeigt in Molm-14 keine veränderte Proliferation

Der Versuchsaufbau für das KI Zellmodell zur Proliferationsbestimmung entspricht in den wesentlichen Punkten, dem des KD Modells (siehe 3.8). Die Zellzahl zum Zeitpunkt $t = 0$ wurde mit $2,5 \times 10^5$ Zellen jedoch geringer gewählt. Im Molm-14 LIN9 KI Zellmodell zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied in der Wachstumsgeschwindigkeit im Vergleich zur Kontrolle.

Diese Analysen bestätigten somit die Ergebnisse des LIN9 KD Zellmodells – und argumentieren für keinen signifikanten funktionellen Effekt von LIN9 auf die Proliferation im getesteten Molm-14 Leukämiemodell.

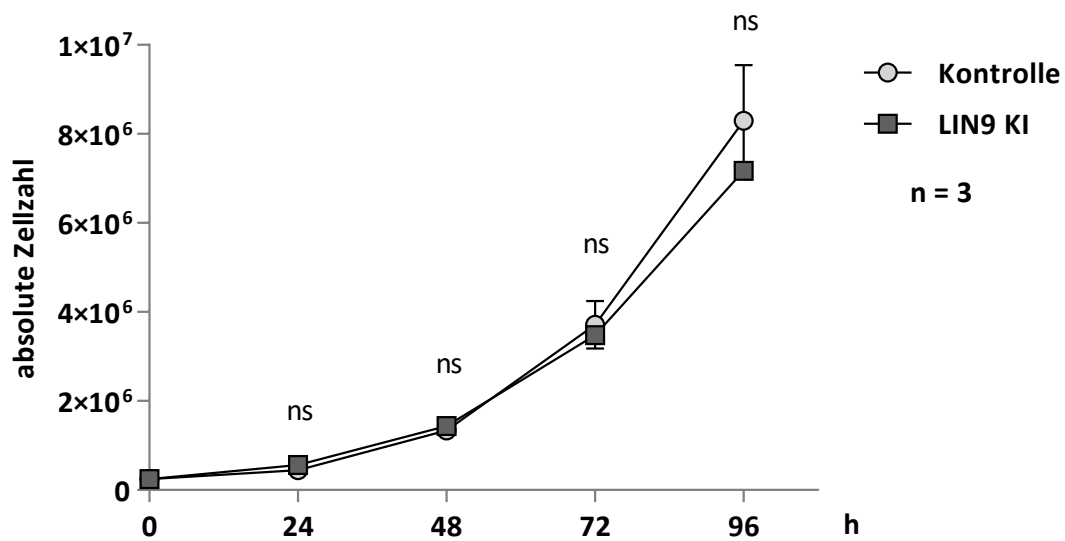


Abbildung 12: **Proliferation von Molm-14 LIN9 KI Zellen im Vergleich zur Kontrolle.** Zu keinem Zeitpunkt der Zellzählung zeigt sich ein signifikanter Unterschied in der Proliferation zwischen Kontrolle und LIN9 KI. *n* gibt die Anzahl der technischen Replikate an. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwertes an. Die Signifikanztestung erfolgte mittels t-Test, ns = nicht signifikant.

Tabelle 20: Nahezu identische Verdopplungszeit für Molm-14 EV und Molm-14 LIN9 KI Zellen.

Zelllinie	Wachstumskonstante λ (h^{-1})	Verdopplungszeit t_d (h)
Molm-14 Kontrolle	0,036	19,3
Molm-14 LIN9 KI	0,035	19,8

4.2.2.3 Geringe Steigerung der Apoptoseinduktion durch Daunorubicin im KI Zellmodell
 Die Untersuchung der Apoptosekapazität durch forcierte LIN9 Expression entsprach methodisch dem Vorgehen beim KD Modell. Die Apoptoseraten nach Daunorubicinexposition wurden in einer Dosis-Wirkungskurve ermittelt. Bei niedrigeren Dosen (10 und 25 nM) zeigte sich formal eine signifikante Steigerung der Apoptose. Bei 15 nM, sowie den höheren Dosen (50 nM und 100 nM) Daunorubicin Konzentration zeigte sich jedoch keine signifikante Änderung der Apoptoseinduktionsfähigkeit im LIN9 KI Zellmodell (Abbildung 13). Entsprechend betrug der IC₅₀ der Kontrolle 20,86 nM – der IC₅₀ im KI Modell war annähernd gleich bei 18 nM (Tabelle 21). Die Signifikanz-Testung erfolgte mit einem t-Test.

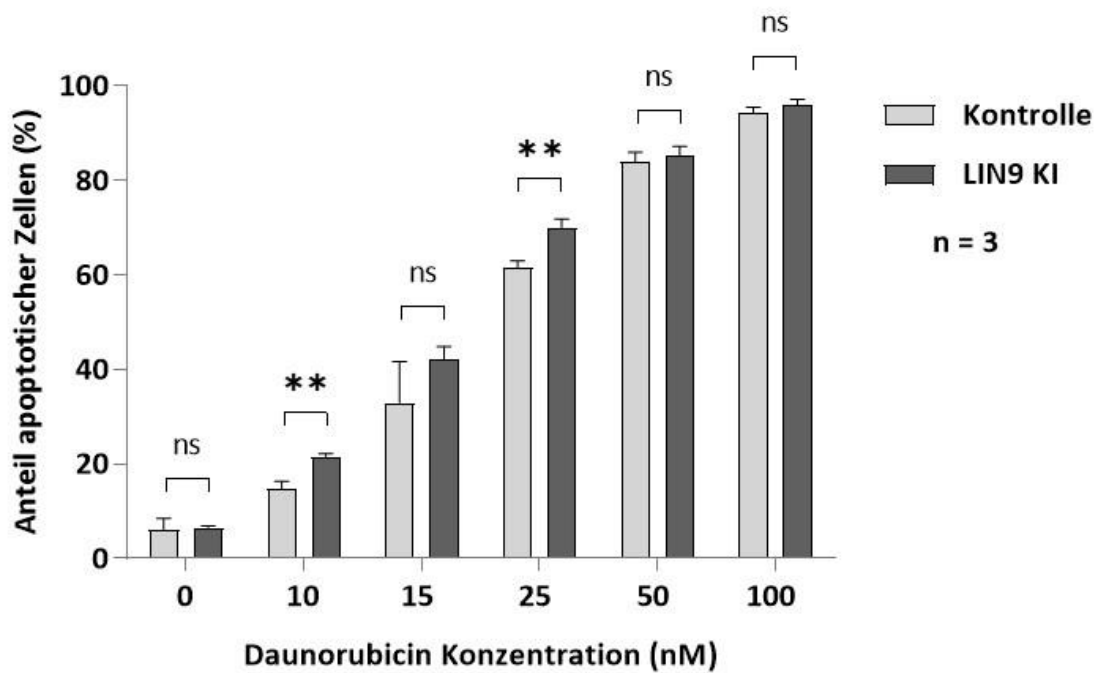


Abbildung 13: Apoptoseinduktion im Molm-14 KI Zellmodell.

Bei 10 nM und 25 nM Daunorubicin Konzentration zeigt sich eine signifikante Steigerung der Apoptoserate mit $** p < 0,005$. n gibt die Anzahl der technischen Replikate an. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwertes an. Die Signifikanztestung erfolgte mittels t-Test, ns = nicht signifikant.

Tabelle 21: Ermittelte IC_{50} -Werte für die Behandlung mit Daunorubicin.

Zelllinie	Molm-14 Kontrolle	Molm-14 LIN9 KI
IC_{50} Daunorubicin (nM)	20,86	18

4.2.3 Jurkat LIN9 KD Zellmodell

Um die Untersuchungen translational auf weitere Leukämieentitäten zu übertragen wurden außerdem ein LIN9 KD und KI Zellmodell der ALL Zelllinie Jurkat etabliert. Das Jurkat LIN9 KD Zellmodell wurde mittels einem lentiviralen Verfahren hergestellt. Die GFP Messung in der Durchflusszytometrie konnte die Integration der Lentivirus-RNA in die Zellen in einem ersten Schritt bestätigen (*Abbildung 14*).

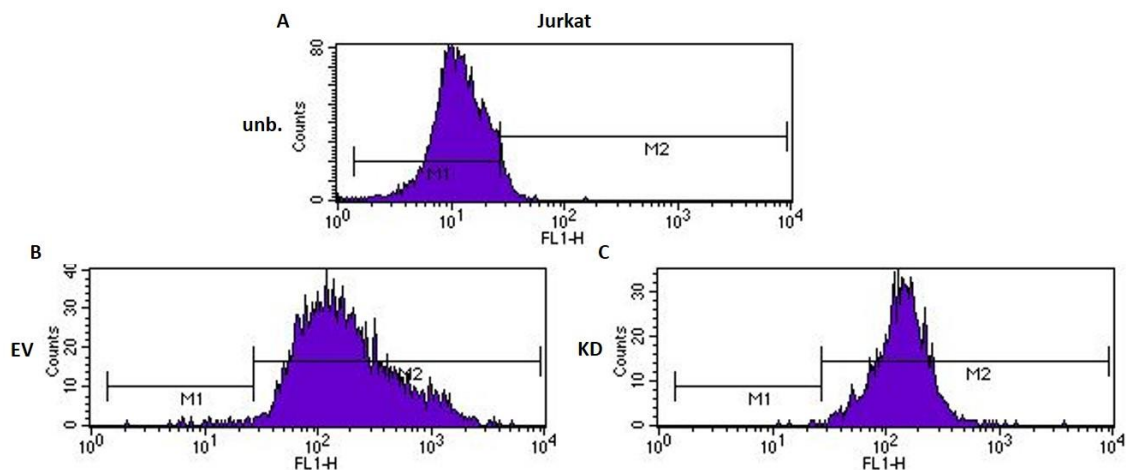


Abbildung 14: Durchflusszytometrische Quantifizierung der GFP-positiven Zellpopulationen der transduzierten Jurkat Zellen.

Die x-Achse gibt die Intensität der GFP-Fluoreszenz an. Zellen innerhalb der M2-Spanne zeigen eine GFP-Positivität. Die y-Achse stellt die absolute Anzahl der gezählten Counts dar.

In (A) – (C) ist die GFP Expression der Zelllinie Jurkat zu sehen. (A) zeigt eine unbehandelte Negativkontrolle ohne GFP-Expression. (B) zeigt die Jurkat EV Zellen mit einer GFP-positiven Zellfraktion von 98,6 %. (C) zeigt die Jurkat LIN9 KD Zellen mit einer GFP-positiven Zellfraktion von 99,37 %.

4.2.3.1 Verifikation des LIN9 KD Zellmodells

Der endgültige Nachweis für die erfolgreiche Transduktion konnte auf RNA Ebene in der q-PCR, sowie auf Proteinebene mittels Western Blot gezeigt werden.

Abbildung 15 A zeigt eine Suppression der LIN9 Expression auf RNA Ebene im Vergleich zu der EV-Kontrolle von 66 %.

Auch im Western Blot konnte eine Reduktion des LIN9 Proteins um 62 % im Jurkat Zellmodell gemessen werden. *Abbildung 15 B* zeigt die Proteinbanden der drei Isoformen von LIN9 (bei 58, 62 und 64 kDa) mit einer geringeren Intensität im LIN9 KD. In *Abbildung 15 C* sind die, auf die Kontrolle normalisierten, Intensitäten der Banden als Säulen-Diagramm dargestellt.

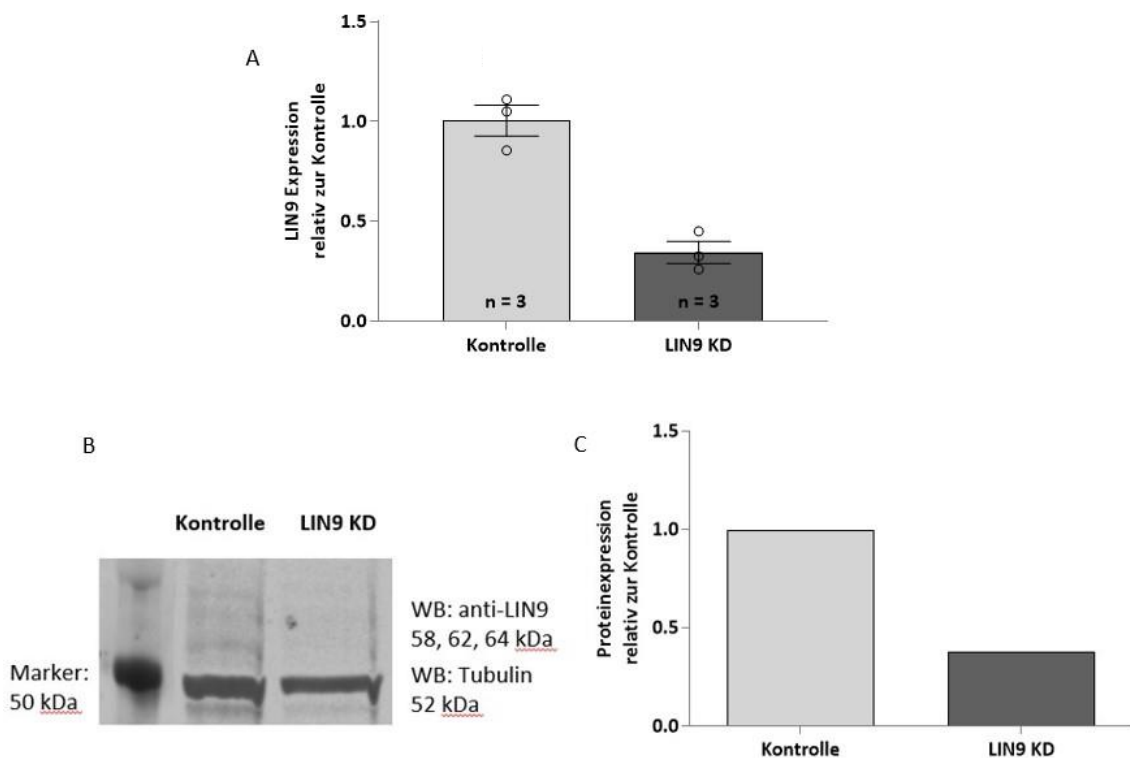


Abbildung 15: LIN9 Expression auf RNA Ebene und Proteinebene im Jurkat LIN9 KD Zellmodell.

(A) In der q-PCR zeigte sich eine Herabregulation der LIN9 RNA im Jurkat LIN9 KD Zellmodell im Vergleich zu der Jurkat EV-Kontrolle. Referenzgen war GAPDH. n gibt die Anzahl der technischen Replikate an. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwertes an.

(B) Mittels Western Blot konnte eine verminderte Proteinexpression von LIN9 im KD Zellmodell gezeigt werden. Die relativen Intensitäten der detektierten Proteinbanden der Jurkat EV-Kontrolle und des Jurkat LIN9 KD sind in (C) dargestellt. Als Ladekontrolle diente Tubulin. Original Western Blot ist im Anhang (Abbildung 22) abgebildet.

4.2.3.2 Suppression von LIN9 im ALL KD Zellmodell führt zu einer verminderten Proliferation

Das Proliferationsassay mit der ALL Zelllinie Jurkat ergab im LIN9 KD eine deutlich langsamere Wachstumsgeschwindigkeit als in der EV-Kontrolle. Die Zellzahl zum Zeitpunkt $t = 0$ wurde, wie in der *Abbildung 16* zu sehen, bei 5×10^5 Zellen festgelegt. Eine deutliche Separierung der Wachstumskurven konnte ermittelt werden. Nach 96 h war zwischen den beiden Populationen die größte Differenz im Wachstum zu erkennen. Bei 48 h und 96 h zeigten sich signifikante Unterschiede, die mit Hilfe eines t-Tests geprüft wurden. Für 48 h lag der p-Wert bei 0,0291 und für 96 h bei 0,0008. *Tabelle 22* zeigt den Unterschied in der Verdopplungszeit (h) zwischen der Kontrolle und dem LIN9 KD Modell. Die Verdopplungszeit des KD lag mit 33 h über der Kontrolle mit 25,7 h.

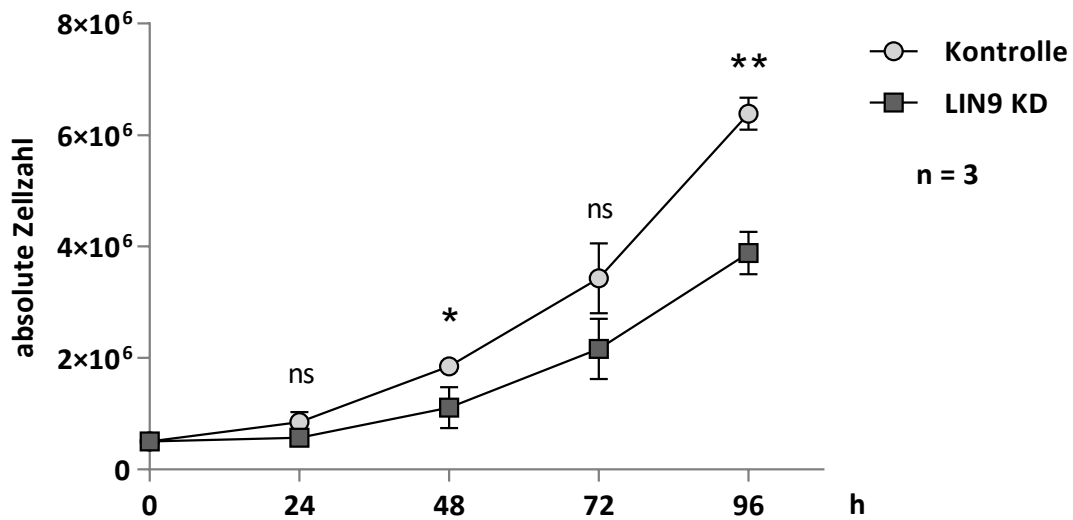


Abbildung 16: **Proliferation von Jurkat LIN9 KD Zellen im Vergleich zur Kontrolle.**

Die ALL Zelllinie Jurkat zeigt im LIN9 KD Modell eine Suppression der Proliferationsgeschwindigkeit im Vergleich zu der EV-Kontrolle. *n* gibt die Anzahl der technischen Replikate an. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwertes an. Die Signifikanztestung erfolgte mittels t-Test. Bei 48 h * $p < 0,05$, bei 96 h ** $p < 0,001$, ns = nicht signifikant.

Tabelle 22: Verlangsamtes Wachstum in den Jurkat LIN9 KD Zellen.

Zelllinie	Wachstumskonstante λ (h ⁻¹)	Verdopplungszeit t_d (h)
Jurkat Kontrolle	0,027	25,7
Jurkat LIN9 KD	0,021	33

4.2.3.3 Herabregulation von LIN9 verursacht eine erhöhte Sensitivität gegenüber

Apoptoseinduktion in Jurkat Zellen

Ob und wenn ja, inwiefern LIN9 das Ansprechen von lymphatischen Leukämien auf das Anthrazyklin-Chemotherapeutikum Daunorubicin beeinflusst, sollte mit diesem Versuch untersucht werden.

Wie auch im AML Zellmodell war hier eine erhöhte Apoptoserate im ALL LIN9 KD Zellmodell im Vergleich zur Kontrolle zu sehen. Bei einer Daunorubicin Konzentration von 50 nM zeigte sich eine Apoptoserate im Mittel von 56,5 % und bei der Kontrolle von 43,7 %. Bei 100 nM lag der Anteil apoptotischer Zellen beim LIN9 KD bereits bei 82,2 %, die Kontrolle zeigte im Vergleich eine Apoptoserate von 66,8 % (Abbildung 17). Die Signifikanzniveaus lagen für beide Daunorubicin Konzentrationen bei ** $p < 0,05$. Die

IC₅₀ Werte unterschieden sich mit 43,83 nM (Kontrolle) und 43 nM (KD) allerdings nicht signifikant (Tabelle 23). Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mit Hilfe des t-Tests.

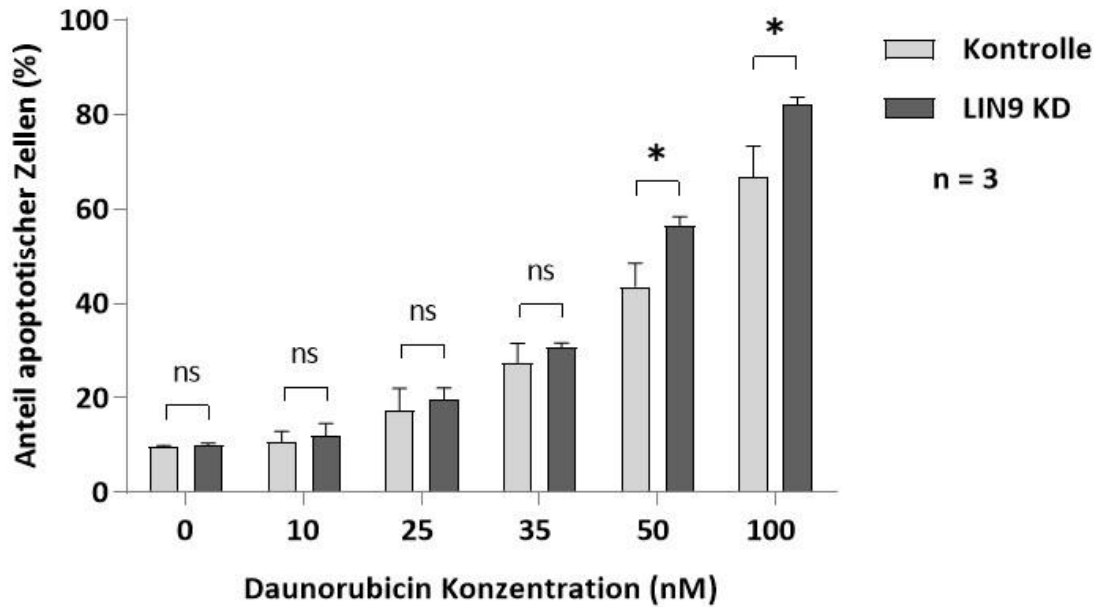


Abbildung 17: **Apoptoseinduktion im Jurkat KD Zellmodell.**

Eine Daunorubicin Exposition zeigt bei Konzentrationen von 50 nM und 100 nM eine signifikant höhere Apoptoserate im KD Zellmodell. *n* gibt die Anzahl der technischen Replikate an. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwertes an. Die Signifikanztestung erfolgte mittels t-Test. Bei 50 nM liegt der *p*-Wert bei 0,013 und bei 100 nM ist *p* = 0,016.

Tabelle 23: Ermittelte IC₅₀-Werte für die Behandlung mit Daunorubicin.

Zelllinie	Jurkat Kontrolle	Jurkat LIN9 KD
IC ₅₀ Daunorubicin (nM)	43,83	43

4.2.4 Jurkat LIN9 KI Zellmodell

Auch für die ALL Zelllinie Jurkat sollten die Versuche zu Proliferation und Apoptose an einem LIN9 knock-in Zellmodell durchgeführt werden. Der KI wurde, wie auch der AML LIN9 KI, mit einem CRISPR/Cas9 System etabliert (siehe 3.5.2).

4.2.4.1 Verifikation des LIN9 KI Zellmodells

Die q-PCR zeigte eine Erhöhung der relativen LIN9 Expression im Jurkat KI Zellmodell auf 2,5 (Abbildung 18). Damit wurde die LIN9 Expression auf RNA Ebene mehr als doppelt so hoch gemessen wie in der zugehörigen Kontrolle.

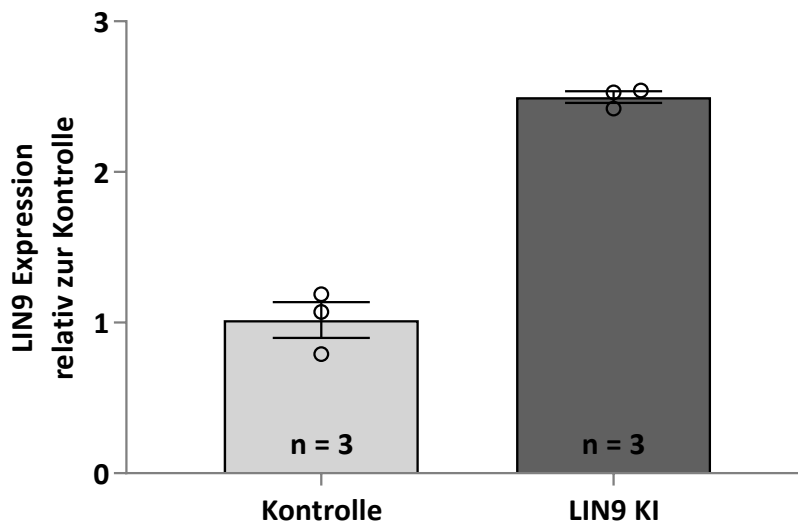


Abbildung 18: LIN9 Expression im Jurkat KI Zellmodell.

In der q-PCR konnte eine erfolgreiche Steigerung der LIN9 Expression auf RNA Ebene im LIN9 KI Zellmodell im Vergleich zur EV-Kontrolle gezeigt werden. Als Referenzgen diente GAPDH. n gibt die Anzahl der technischen Replikate an. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwertes an.

4.2.4.2 Überexpression von LIN9 zeigt geringe Änderung in der Proliferation

Bei diesem Versuch wurde, wie auch in den vorherigen Proliferationsassays, die Zellzahl über 4 Tage alle 24 h bestimmt. Die Zellzahl zum Zeitpunkt $t = 0$ wurde bei $2,5 \times 10^5$ gewählt. Die Signifikanz-Testung erfolgte mittels t-Test. Das LIN9 KI Zellmodell der ALL Zelllinie Jurkat zeigte in der Tendenz ein etwas schnelleres Wachstum als seine Kontrolle. Der Unterschied im Wachstum von KI und Kontrolle erreichte nach 72 h einen signifikanten Unterschied von $p = 0,034$. Dieser war nach 96 h jedoch nicht mehr nachweisbar (Abbildung 19).

Im Gegensatz zur Suppression von LIN9, die die Proliferation signifikant zu reduzieren vermag, bringt die forcierte LIN9 Expression also keinen funktionellen Mehrgewinn.

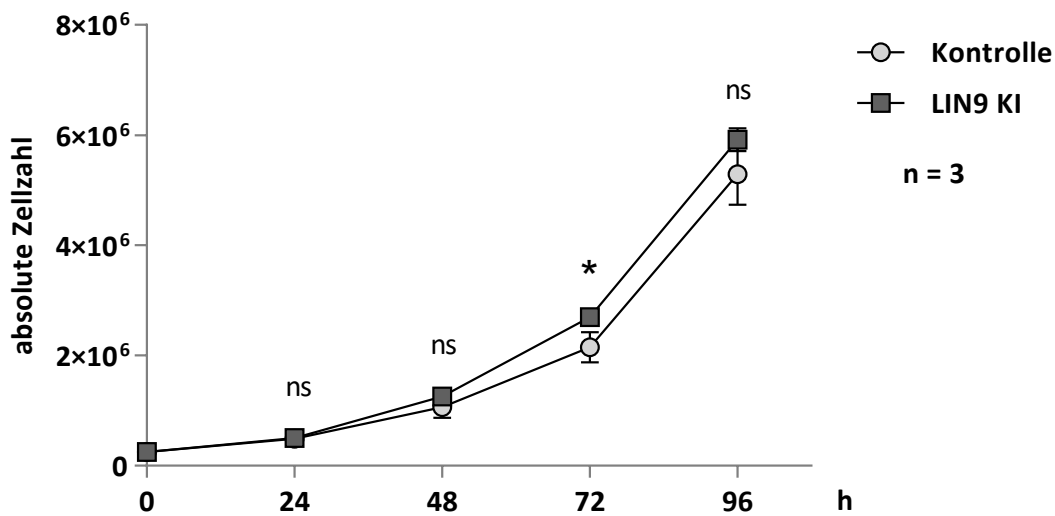


Abbildung 19: Proliferation von Jurkat LIN9 KI Zellen im Vergleich zur Kontrolle.

Die ALL Zelllinie zeigt in der Kontrolle und im LIN9 KI ein nahezu gleiches Proliferationsverhalten. Bei 24, 48 und 96 h zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Zellzahl. Zum Zeitpunkt 72 h ließ sich ein signifikanter Unterschied im Wachstum von * $p < 0,05$ feststellen. n gibt die Anzahl der technischen Replikate an. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwertes an. Die Signifikanztestung erfolgte mittels t-Test, ns = nicht signifikant.

Tabelle 24: Nahezu identische Verdopplungszeit für Jurkat EV und LIN9 KI Zellen.

Zelllinie	Wachstumskonstante λ (h^{-1})	Verdopplungszeit t_d (h)
Jurkat Kontrolle	0,032	21,7
Jurkat LIN9 KI	0,033	21

4.2.4.3 Überexpression von LIN9 resultiert tendenziell in einer verminderten Sensitivität gegenüber Apoptoseinduktion

Das LIN9 KI Zellmodell hatte bei zwei Daunorubicin Konzentrationen eine signifikant geringere Apoptoserate als seine Kontrolle. Bei 35 nM gingen im KI Zellmodell 49,9 % der Zellen in Apoptose, in der Kontrolle waren es 56,1 %. Bei 100 nM Daunorubicin zeigte das LIN9 KI Zellmodell eine Apoptoserate von 88,3 %, während die Kontrolle mit 92,9 % eine etwas höhere Anzahl apoptotischer Zellen aufwies (Abbildung 20). Bei drei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen ergab sich für die Konzentration 35 nM mit 0,0006 eine Signifikanz von ** $p < 0,001$ und für 100 nM mit 0,016 eine Signifikanz von * $p < 0,05$. Der IC_{50} der Kontrolle betrug 31,26 nM und der LIN9 KI wies einen IC_{50} von 32,65 nM auf (Tabelle 25).

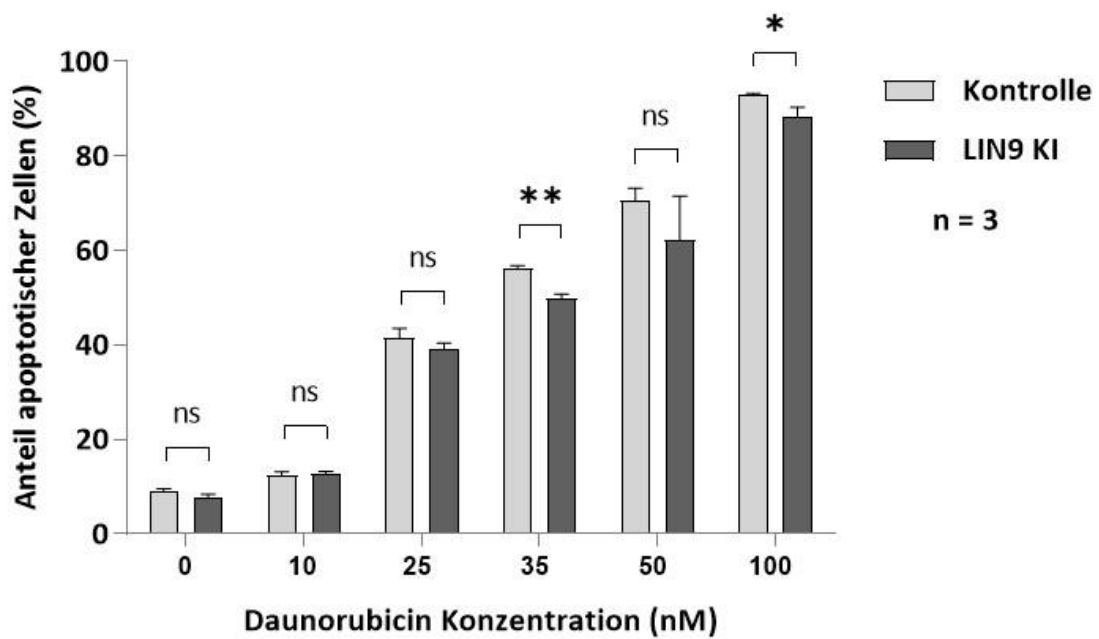


Abbildung 20: Apoptoseinduktion im Jurkat KI Zellmodell.

Bei 35 nM und 100 nM zeigt sich eine signifikant verminderte Apoptoserate im LIN9 KI Zellmodell. Bei 35 nM wurde ein Unterschied mit $** p < 0,001$ und bei 100 nM mit $** p < 0,05$ berechnet. n gibt die Anzahl der technischen Replikate an. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwertes an. Die Signifikanztestung erfolgte mittels t -Test, ns = nicht signifikant.

Tabelle 25: Ermittelte IC_{50} -Werte für die Behandlung mit Daunorubicin.

Zelllinie	Jurkat Kontrolle	Jurkat LIN9 KI
IC_{50} Daunorubicin (nM)	31,26	32,65

5 Diskussion

Verschiedene mitotische Proteine wie Checkpoint-Proteine und Kinasen nehmen häufig eine wichtige Stellung in der Entstehung von malignen Erkrankungen ein. Sie sind in malignen Zellen oft fehlreguliert oder in ihrer Expression verändert (Iltzsche et al., 2017). Auch in der Leukämieentstehung spielen Fehlregulationen im Zellzyklus eine wichtige Rolle.

LIN9, das durch jeweilige Kooperationen im MMB und DREAM Komplex unterschiedliche Auswirkung auf den Zellzyklus hat, wurde in verschiedenen malignen Tumorentitäten in veränderter Expression und Funktion vorgefunden. In proliferierenden Zellen bildet LIN9 bevorzugt einen Komplex mit B-Myb (MMB Komplex) und fördert die Expression mitotischer Gene. Im DREAM Komplex hingegen wird die Expression von Zellzyklusgenen während der G0/G1 Phase durch LIN9 gehemmt (Iness et al., 2019).

Da es zur Rolle von LIN9 in akuten Leukämien bisher keine bekannten Untersuchungen gibt, beschäftigte sich diese Arbeit mit der Frage, ob LIN9 in AML verändert exprimiert wird und ob sich eine Veränderung in der LIN9 Expression auf Proliferation und Überleben leukämischer Blasten auswirkt.

5.1 Vergleich der LIN9 Expression in Gesunden und AML Patienten

5.1.1 Verminderte LIN9 Expression in AML Patienten

Um diese Frage zu untersuchen wurden zunächst Expressionsanalysen durchgeführt, in der die LIN9 Expression in einer AML Patienten Kohorte mit der einer gesunden Kontrollkohorte aus Knochenmarkspendern verglichen wurde. Interessanterweise zeigte die AML Kohorte eine im Mittel signifikante Herunterregulation von LIN9 im Vergleich zur Kontrolle – wobei große individuelle Expressionsunterschiede nachgewiesen wurden (*Abbildung 2*).

Dieses Ergebnis lieferte erste Hinweise, dass LIN9 eine Rolle in der Leukämogenese von myeloischen Leukämien spielen könnte.

Passende Beobachtungen hierzu wurden auch von weiteren Arbeitsgruppen gemacht, die die Funktion von LIN9 im Zellzyklus und anderen malignen Erkrankungen analysierten (Reichert et al., 2010, Hauser et al., 2012).

So konnte in einem LIN9 heterozygoten Mausmodell für nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome ein mehr als doppelt so hohes Auftreten von Lungenkarzinomen im Vergleich zu LIN9 Wildtyp Mäusen nachgewiesen werden. Von den LIN9 Wildtyp Mäusen waren nach 370 Tagen etwa 10 % gestorben. Von den Mäusen, die eine heterozygote Deletion von LIN9 trugen, waren im Vergleich hierzu über 50 % der Mäuse gestorben. Histologische Untersuchungen nach 4 - 5 Monaten zeigten in den LIN9 heterozygoten Mäusen eine erhöhte Anzahl an Tumoren und eine größere Ausbreitung der tumorösen Fläche. Reichert et al. vermuten als Ursache für diese Unterschiede eine, durch die LIN9 Heterozygotie hervorgerufene, genomische Instabilität (Reichert et al., 2010).

Auch in humanen und murinen Fibroblastenzellkulturen zeigte der knock-out von LIN9 eine erhöhte chromosomale Instabilität (Hauser et al., 2012).

5.1.2 Verminderte LIN9 Expression in sAML

In den von Hanahan und Weinberg beschriebenen „Hallmarks of cancer“ werden zu den Grundeigenschaften maligner Tumore die genomische Instabilität gezählt (Hanahan and Weinberg, 2000). Sie fördert die Tumorentstehung, indem sie zur Aktivierung von Onkogenen und Deaktivierung von Tumorsuppressorgenen führt und spielt auch in der Genese von (myeloischen) Leukämien eine wichtige Rolle (Pikor et al., 2013). So führt beispielsweise eine Mutation in der Tyrosinkinase FLT3 (die auch die in dieser Arbeit untersuchte AML Zelllinie Molm-14 besitzt) zu einer erhöhten genomischen Instabilität. Diese beschriebene Mutation ist eine der häufigsten in akuten myeloischen Leukämien und tritt bei 20 - 30 % der diagnostizierten Fälle auf (Quentmeier et al., 2003, Rebechi and Pratz, 2017). Interessanterweise weisen im Besonderen auch sAML häufig Mutationen auf, die eine genomische Instabilität zur Folge haben (Pratz et al., 2016). Wie in 1.1.1 bereits beschrieben, entwickeln sich sekundäre Leukämien häufig aus Vorerkrankungen des hämatologischen Systems (Larson, 2007).

Bei der Betrachtung der einzelnen LIN9 Expressionen in der AML Patientenkohorte fiel auf, dass die Werte einer weiten Streuung unterliegen. Um ein besseres Verständnis für die Streuung der Expressionswerte und mögliche Anhaltspunkte zu finden, was einen Einfluss hierauf haben könnte, wurde anhand verschiedener Kriterien eine weitere Einteilung in Subgruppen unternommen.

Eine Unterteilung nach der Ätiologie in de novo und sekundäre AML ergab interessanterweise eine präferentielle Herabregulation von LIN9 in sAML verglichen mit der Kontrollkohorte mononukleärer Zellen gesunder Knochenmarkspender (*Abbildung 3*). Die Subgruppe der de novo AML war mit $n = 26$ mehr als doppelt so groß wie die sAML Subgruppe ($n = 11$). Die sAML, in der hier untersuchten Subgruppe, entwickelten sich aus dem myelodysplastischen Syndrom (MDS) ($n = 7$), der primären Myelofibrose (PMF) ($n = 1$), einer chronischen myelomonozytären Leukämie (CMML) ($n = 1$) und nicht näher bestimmten myeloproliferativen Neoplasien (MPN) ($n = 2$).

Die verminderte mittlere Expression von LIN9 in AML könnte dafürsprechen, dass LIN9 in Leukozyten tendenziell tumorsuppressive Eigenschaften besitzt. Möglicherweise führt eine verminderte LIN9 Expression auch in Leukozyten zu einer erhöhten genomischen Instabilität, was die präferentielle Reduktion der mittleren LIN9 Expression in sAML erklären könnte. Eine Herabregulation von LIN9 könnte demnach durch eine verminderte tumorsuppressive Wirkung und erhöhte genomische Instabilität die Entstehung von malignen Klonen begünstigen.

5.1.3 Verminderte LIN9 Expression in AML Subgruppe mit intermediärer Prognose

Bei der Unterteilung der AML Kohorte anhand von prognostischen Risikoprofilen zeigte sich eine tendenzielle Suppression der mittleren LIN9 Expression in allen Subgruppen. Aufgrund der großen Streuung der Werte war die Suppression im Vergleich zur Kontrollkohorte formal nur in der Gruppe mit intermediärer Prognose ($n = 15$) signifikant. In der Gruppe mit günstigem ($n = 9$) bzw. ungünstigem ($n = 11$) Risikoprofil wurde keine signifikante Suppression gemessen (*Abbildung 4*). Insgesamt ergaben sich nach der Unterteilung in Subgruppen sehr kleine Populationen, weswegen dieses Ergebnis mit reduziertem Gewicht zu werten ist.

In anderen Tumorentitäten konnte ebenfalls ein Zusammenhang zwischen LIN9 Level und Prognosewerten gefunden werden, dieser allerdings in divergenter Aussage im Vergleich zu akuten Leukämien (Sahni et al., 2017).

Die vermehrte Expression von LIN9 scheint beim Mamma Karzinom mit einer schlechteren Prognose und vermindertem Therapieansprechen einherzugehen. Triple-negativer Brustkrebs (TNBC) gehört zu den Brustkrebs Entitäten mit der schlechtesten Prognose. TNBC macht 20 % aller Brustkrebsdiagnosen aus und ist charakterisiert durch ein schlechtes Therapieansprechen und eine hohe Rückfallquote (Rastelli et al., 2010, Torre et al., 2015). Interessanterweise konnte bei TNBC mit schlechtem Verlauf durch die Analyse von mehreren Datensätzen eine hohe Expression von LIN9 gefunden werden (Lai et al., 2019, Sahni et al., 2017).

BET (Bromodomain and extraterminal protein) Inhibitoren zeigten in vitro und in vivo eine Wirksamkeit gegen TNBC, da diese in den Zellzyklus der malignen Zellen eingreifen (Shu et al., 2016).

Sahni et al. stellten über Genexpressionsanalysen eine verminderte LIN9 Expression unter der Behandlung mit BET-Inhibitoren in TNBC Zellen fest. Untersuchungen ließen hierbei vermuten, dass die Therapie durch eine fehlerhafte Mitose zum Zelltod führt. Eine Herunterregulation von LIN9 in den Zellen zeigte ähnliche Ergebnisse wie die Behandlung mit BET-Inhibitoren. Diese Untersuchungen gaben erste Hinweise auf die Relevanz von LIN9 im Zellzyklus von malignen Brustkrebszellen mit schlechter Prognose (Sahni et al., 2017).

Die, im Gegensatz zu Brustkrebs, signifikant verminderte Expression von LIN9 könnte darauf hindeuten, dass LIN9 in Leukämien eine andere Funktion übernimmt. Diese Überlegung würde zu den in 1.3 bereits aufgeführten Beobachtungen verschiedener Arbeitsgruppen passen, dass LIN9 abhängig davon, in welchem der beiden Proteinkomplexe es seine Funktion im Zellzyklus ausübt, eher tumorsuppressiv oder onkogen wirkt.

Weitere Korrelationen mit Therapieansprechen, Alter oder Leukozytenzahl zeigten keinen relativen Unterschied.

5.2 Modellierung der LIN9 Expression in AML Zellmodell

5.2.1 Suppression der LIN9 Expression zeigt keinen wesentlichen Einfluss auf die Proliferation im AML Zellmodell

Um zu evaluieren, ob LIN9 einen funktionellen Effekt auf Leukämiezellen ausübt, wurden im Weiteren ergänzende in vitro Studien an einem AML Leukämie Zellmodell durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde jeweils ein LIN9 KD und KI Modell in der FLT3 mutierten Molm-14 Zelllinie etabliert und in einem ersten Schritt der Einfluss von LIN9 auf die Proliferation der leukämischen Blasten untersucht (Quentmeier et al., 2003).

Die Analyse des Einflusses von LIN9 auf die Proliferation ergab dabei im KD, wie auch im KI Modell, keine wesentliche Änderung im Proliferationsverhalten.

Dieses Ergebnis zeigt wenig Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten zu LIN9 in anderen Neoplasien. Hier zeigte das Zellzyklusprotein LIN9 häufig einen Einfluss auf die Proliferation der malignen Zellen. Beispielsweise konnten in Ovarialkarzinomzellen spektralphotometrisch verminderte Proliferationseigenschaften bei erhöhten hTRM9L Level gemessen werden. Chen et al. stellten eine positive Korrelation zwischen hTRM9L und LIN9 Expressionslevel in Ovarialkarzinomzellen fest, sodass sie eine Wirkung von hTRM9L auf die Proliferation über Regulierung von LIN9 vermuteten (Chen et al., 2017). Übereinstimmende Beobachtungen hierzu konnten auch für das kolorektale Karzinom gemacht werden (Begley et al., 2013).

In dem, in 5.1.1 bereits genauer beschriebenen, LIN9 heterozygoten Mausmodell für nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome konnte mithilfe der Messung des Proliferationsmarkers Ki-67 keine Veränderung in der Proliferation gezeigt werden. Jedoch in homozygot LIN9-deletierten primären Fibroblasten der Maus wurde eine deutlich verringerte Proliferationskapazität gemessen. In vivo wiesen ausgewachsene Mäuse mit deletiertem LIN9 nach wenigen Tage eine Atrophie von intestinalem Epithel auf und starben kurz darauf. Hier konnte, ebenfalls durch Messung von Ki-67, eine verringerte Proliferation der, sich auch im Erwachsenenalter noch teilenden, Epithelzellen festgestellt werden. (Reichert et al., 2010).

Auch in TNBC Zellen konnte ein Einfluss von LIN9 auf die Zellteilung gezeigt werden. Mittels der „Live-Cell Imaging“ Methode, bei der lebende Zellen mikroskopisch

untersucht werden können, wurde hier bei LIN9 supprimierten TNBC Zellen eine Verlängerung der Mitosedauer festgestellt (Jensen, 2013). Des Weiteren wiesen eine erhöhte Anzahl dieser Zellen einen verlängerten Verbleib in der Interphase auf – wobei nach erfolgreichem Durchlauf eines Mitosezyklus keine weiteren Zellteilungen beobachtet werden konnten (Roberts et al., 2020).

In menschlichen Leberkrebszellen, aus hepatozellulären Karzinomen mit schlechter Prognose, konnten hohe Level von LIN9 im Komplex mit B-Myb auf Proteinebene im Western Blot dargestellt werden. In weiteren Untersuchungen konnte außerdem eine Korrelation zwischen hohen B-Myb Leveln und einer gesteigerten Proliferation durch eine Ki-67 markierende Färbung demonstriert werden (Calvisi et al., 2011).

Die Daten zu LIN9 und Proliferation in AML Zellen geben erste Hinweise darauf, dass LIN9 auf die Proliferation myeloischer Blasten wenig bis keinen Einfluss hat. Da LIN9 allerdings in den AML Patienten signifikant vermindert ist, könnten andere Faktoren, die für die Entstehung von Malignomen charakteristisch sind, größere Bedeutung haben. Hierbei ist beispielsweise die Fähigkeit zur Apoptose zu nennen, die ebenfalls untersucht wurde.

5.2.2 Suppression der LIN9 Expression resultiert in einer gesteigerten Apoptoserate im AML Zellmodell

Ein Charakteristikum maligner Zellen ist das Umgehen apoptotischer Prozesse, welche normalerweise im physiologischen Zustand geschädigte Zellen eliminieren sollen (Hanahan and Weinberg, 2000). Die Behandlung der myeloischen Zelllinie Molm-14 zeigte im LIN9 KD eine signifikant gesteigerte Apoptoserate im Vergleich zu dem EV-Kontroll Modell (*Abbildung 10*). Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zeigten in weiteren Tumorentitäten ebenfalls einen Einfluss von LIN9 auf die Überlebensfähigkeit von malignen Zellen. So konnten Untersuchungen mit TNBC Zellen bei durch small-interfering-Ribonukleinsäure (siRNA) herunterreguliertem LIN9 ebenfalls eine verstärkte Apoptoseinduktion nach Paclitaxel Behandlung nachweisen (Lai et al., 2020). In Ovarialkarzinomen wurden gegensätzliche Wirkungen beobachtet. Hier waren erhöhte LIN9 Level mit einer vermehrten Apoptoserate in den Zellen assoziiert (Chen et al., 2017).

Auch im Molm-14 LIN9 KI Zellmodell wurden höhere Apoptosewerte als in der Kontrolle gemessen, welche allerdings allenfalls tendenziell erhöht waren (*Abbildung 13*). Dies suggeriert, dass LIN9 einen gewissen protektiven Effekt für die Apoptoseinduktion ausübt – ohne, dass dieser durch LIN9 Überexpression gesteigert werden kann.

Inwiefern sich die ähnlichen Tendenzen im AML LIN9 KD und KI Zellmodell bestätigen oder widerlegen ließen, müssten weitere Versuche zeigen.

Wie in 1.3 bereits beschrieben, scheint LIN9 in Abhängigkeit von seinen Bindungspartnern tumorsuppressive oder onkogene Eigenschaften zu besitzen.

Die Untersuchungen im AML Zellmodell legen die Vermutung nahe, dass LIN9 in AML bezüglich Apoptose eher onkogene Eigenschaften aufweist, da eine Herabregulation in signifikant höheren Apoptosezahlen resultiert. Diese Beobachtungen könnten ein Hinweis dafür sein, dass LIN9 in AML eher im Komplex mit B-Myb vorliegt. Auch für Lungenkarzinome konnte im Mausmodell die Wichtigkeit des Komplexes aus B-Myb und MuvB (MMB Komplex) für das Überleben der Tumorzellen gezeigt werden (Iltzsche et al., 2017).

Eine mögliche Theorie zu Apoptose in AML in Abhängigkeit von LIN9 wäre somit, dass durch verminderte LIN9 Level die Bildung des MuvB Proteinkomplexes gestört wäre. Hieraus resultierend könnten weniger MMB Komplexe gebildet werden, was schließlich zu apoptotischen Zellen führen würde.

5.3 Translation in ALL Zellmodell

Ergänzend zu den Versuchen mit der AML Zelllinie Molm-14 wurden die funktionellen Untersuchungen in der ALL Zelllinie Jurkat durchgeführt, um die Translation in eine weitere Entität einer akuten Leukämie zu ermöglichen. Auch hier wurde die Auswirkung der Expressionsänderung von LIN9 im Hinblick auf Proliferation und Apoptose untersucht. So konnte die Rolle von LIN9 in myeloischen und lymphatischen Leukämien verglichen werden.

5.3.1 Suppression der LIN9 Expression resultiert in einer verminderten Proliferation und tendenziell gesteigerten Apoptoserate

Im Jurkat Zellmodell resultierte eine Herabregulation von LIN9, im Unterschied zu Molm-14, in einer deutlich verminderten Proliferation (*Abbildung 16*).

Woher dieser Unterschied zwischen Molm-14 (AML) und Jurkat (ALL) kommt, lässt sich zu diesem Zeitpunkt nicht beantworten. Interessant ist allerdings, dass wie in 5.2.1 bereits aufgeführt, die Auswirkung von LIN9 auf die Proliferation in verschiedenen Tumorentitäten ebenfalls variiert. So führte beispielsweise eine verminderte LIN9 Expression in TNBC Zellen zu einer verlängerten Mitosedauer (Roberts et al., 2020). Auch LIN9-deletierte primäre Fibroblasten der Maus zeigten eine, mithilfe von Ki-67 gemessene, geringere Proliferation, die zu einer Atrophie von intestinalem Epithel führte (Reichert et al., 2010). Dem gegenüber stehen unter anderem Untersuchungen in Zellen des kolorektalen Karzinoms, bei denen eine verminderte Expression von LIN9 in hTRM9L exprimierenden Zellen zu einem Anstieg in der Proliferation führte (Begley et al., 2013).

Eine gesteigerte LIN9 Expression in Jurkat Zellen zeigte nur zu einem Zeitpunkt eine signifikante Steigerung im Wachstum. Zu den übrigen Zeitpunkten war die Proliferation von Jurkat LIN9 KI Zellen und Kontrolle nicht signifikant verändert (*Abbildung 19*).

Eine Erklärung warum eine Überexpression von LIN9 im ALL Zellmodell (genauso im AML Zellmodell) keine relevanten Auswirkungen auf das Wachstum hatte, könnte sein, dass LIN9 seine Wirkung auf den Zellzyklus innerhalb von Komplexen ausübt. Eine erhöhte LIN9 Expression wie hier im KI Modell könnte nach dieser Überlegung ab einer gewissen Konzentration von LIN9 keine zusätzliche Wirkung mehr zeigen, da alle Komplexe bereits mit LIN9 gesättigt wären. Dies würde erklären, warum die Überexpression von LIN9, im Gegensatz zur Suppression, keinen Zusatzeffekt auf die Proliferation ausübt.

Das Apoptoseverhalten der Jurkat LIN9 KD Zellen zeigte sich, wie im AML KD Modell, mit einer erhöhten Anzahl apoptotischer Zellen nach Daunorubicin Behandlung (*Abbildung 17*). Insgesamt waren die Unterschiede in der ALL weniger eindeutig als in der AML. Bei den Jurkat LIN9 KI Zellen war die Apoptoserate tendenziell vermindert. Jedoch zeigte

sich auch hier, dass durch eine Überexpression von LIN9 der protektive Effekt nur wenig gesteigert werden konnte (*Abbildung 20*).

Andere Ergebnisse konnten in hTRM9L exprimierenden Ovarialkarzinomzellen beobachtet werden. Hier wurde in qPCR und Western Blot Verfahren eine gesteigerte Expression von LIN9, gemeinsam mit einer Überexpression des proapoptotischen Bax und einer Suppression des antiapoptotischen Bcl-2 gemessen. Mittels Durchflusszytometrie konnte außerdem eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen gemessen werden. Chen et al. stellten die Hypothese auf, dass hTRM9L exprimierende Ovarialkarzinomzellen über Aktivierung von LIN9 eine gesteigerte Apoptose induzieren könnten (Chen et al., 2017).

6 Zusammenfassung

Akute Leukämien im Erwachsenenalter gehören zu den malignen Erkrankungen mit einer zumeist schlechten Prognose. Zudem erkranken überdurchschnittlich häufig Menschen im hohen Lebensalter (> 60 Jahre), die eine notwendige, intensive Chemotherapie aufgrund einer Vielzahl an Komorbiditäten nicht ausreichend erhalten können. Aus diesem Grund ist die Forschung an neuen, besser verträglichen Therapien ein wichtiger Teil der aktuellen Leukämie Forschung.

Dem Zellzyklusprotein LIN9 konnte in verschiedenen Tumorentitäten bereits eine Rolle in der Steuerung von Proliferation und Apoptose zugeschrieben werden, was es zukünftig zu einem attraktiven Therapieziel machen könnte.

Vorarbeiten zu akuten Leukämien lassen ebenfalls eine funktionelle Bedeutung von LIN9 in der Leukämogenese vermuten. Die vorliegende Arbeit beinhaltet eine erste Charakterisierung der Rolle von LIN9 in akuten Leukämien.

Hierzu wurden in einem ersten Schritt Expressionsanalysen mittels qPCR durchgeführt, welche eine signifikante Herabregulation der mittleren LIN9 Expression in akuten myeloischen Leukämien (AML) im Vergleich zu gesunden Knochenmarkspendern zeigte. Eine geringere mittlere LIN9 Expression in AML war nach ELN Risikostratifizierung formal mit einem intermediären Risikoprofil assoziiert – wobei diese Beobachtung eine Verifikation an größeren Patientenkohorten bedarf.

Weiter war eine verminderte LIN9 Expression formal mit sekundären AML assoziiert, was allerdings auch einer Bestätigung in unabhängigen Studien erfordert.

In einem zweiten Schritt wurden mit der AML Zelllinie Molm-14 und der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) Zelllinie Jurkat funktionelle Analysen in LIN9 knock-down (KD) und knock-in (KI) Zellmodellen durchgeführt. Mittels Phasenkontrastmikroskopie wurde die Proliferation der Zellen und mittels Durchflusszytometrie die Apoptoseinduktion nach Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Daunorubicin gemessen.

In den Molm-14 Zellen stellte sich hierbei keine wesentliche Beeinflussung des Proliferationsverhaltens bei Expressionsänderung von LIN9 heraus. Die Apoptoserate war in LIN9 supprimierten Molm-14 signifikant gesteigert.

Die LIN9 KD Zellen der Jurkats zeigten ein verringertes Wachstum im Vergleich zu der Kontrolle. Die Apoptoseinduktion war, wie auch in den Molm-14, erhöht.

Eine Überexpression von LIN9 hatte in beiden Zellmodellen zusammenfassend keine bzw. kaum einen Einfluss auf Proliferation und Apoptose.

Insgesamt zeigt sich bei verminderter LIN9 Expression eine geringere Proliferation sowie eine erhöhte Apoptoseinduktion in akuten Leukämie Zellmodellen, so dass – zusammen mit dem Nachweis von Expressionsunterschieden im Vergleich zu gesunden Knochenmarkspendern – eine Rolle von LIN9 in der Leukämogenese und Therapieresistenz vermutet werden kann. Wie auch die, teils konträren, Daten zu anderen Tumorentitäten (wie z.B. dem Mamma- oder Ovarialkarzinom (Sahni et al., 2017, Chen et al., 2017)) gezeigt haben, scheint die Regulation des Zellzyklus durch LIN9 im MMB oder DREAM Komplex allerdings höchst komplex und je nachdem welcher Komplex in seiner Funktion dominiert gegenläufig.

Unsere Daten bilden ein „Proof of Principle“ einer Fehlregulation von LIN9 in akuten Leukämien, der genaue Kontext und die resultierende Relevanz bleiben aber spekulativ und bedürfen weiterer Untersuchungen. Die vorliegende Arbeit bietet hierfür die Grundlage.

7 Literaturverzeichnis

- AL-TUBULY, A. A. 2000. SDS-PAGE and Western Blotting. *Methods Mol Med*, 40, 391-405.
- ARBER, D. A., ORAZI, A., HASSERJIAN, R., THIELE, J., BOROWITZ, M. J., LE BEAU, M. M., BLOOMFIELD, C. D., CAZZOLA, M. & VARDIMAN, J. W. 2016. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127, 2391-405.
- BASSAN, R., GATTA, G., TONDINI, C. & WILLEMZE, R. 2004. Adult acute lymphoblastic leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol*, 50, 223-61.
- BEGLEY, U., SOSA, M. S., AVIVAR-VALDERAS, A., PATIL, A., ENDRES, L., ESTRADA, Y., CHAN, C. T., SU, D., DEDON, P. C., AGUIRRE-GHISO, J. A. & BEGLEY, T. 2013. A human tRNA methyltransferase 9-like protein prevents tumour growth by regulating LIN9 and HIF1-alpha. *EMBO Mol Med*, 5, 366-83.
- BENE, M. C., CASTOLDI, G., KNAPP, W., LUDWIG, W. D., MATUTES, E., ORFAO, A. & VAN'T VEER, M. B. 1995. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*, 9, 1783-6.
- BENNETT, J. M., CATOVSKY, D., DANIEL, M. T., FLANDRIN, G., GALTON, D. A., GRALNICK, H. R. & SULTAN, C. 1976. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*, 33, 451-8.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- BUTTARAZZI, D., PANDOLFO, G. & PORZIO, G. C. 2018. A boxplot for circular data. *Biometrics*, 74, 1492-1501.
- CALDWELL, J. T., GE, Y. & TAUB, J. W. 2014. Prognosis and management of acute myeloid leukemia in patients with Down syndrome. *Expert Rev Hematol*, 7, 831-40.
- CALVISI, D. F., SIMILE, M. M., LADU, S., FRAU, M., EVERT, M., TOMASI, M. L., DEMARTIS, M. I., DAINO, L., SEDDAIU, M. A., BROZZETTI, S., FEO, F. & PASCALE, R. M. 2011. Activation of v-Myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog-like2 (MYBL2)-LIN9 complex contributes to human hepatocarcinogenesis and identifies a subset of hepatocellular carcinoma with mutant p53. *Hepatology*, 53, 1226-36.
- CHEN, H. M., WANG, J., ZHANG, Y. F. & GAO, Y. H. 2017. Ovarian cancer proliferation and apoptosis are regulated by human transfer RNA methyltransferase 9-like via LIN9. *Oncol Lett*, 14, 4461-4466.
- CHIARETTI, S., ZINI, G. & BASSAN, R. 2014. Diagnosis and subclassification of acute lymphoblastic leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 6, e2014073.
- CHRISTIANSEN, D. H., ANDERSEN, M. K. & PEDERSEN-BJERGAARD, J. 2001. Mutations with loss of heterozygosity of p53 are common in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after exposure to alkylating agents

- and significantly associated with deletion or loss of 5q, a complex karyotype, and a poor prognosis. *J Clin Oncol*, 19, 1405-13.
- COMPTON, S. J. & JONES, C. G. 1985. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem*, 151, 369-74.
- DE LA LUNA, S., SORIA, I., PULIDO, D., ORTIN, J. & JIMENEZ, A. 1988. Efficient transformation of mammalian cells with constructs containing a puromycin-resistance marker. *Gene*, 62, 121-6.
- DELLA RAGIONE, F., MERCURIO, C. & IOLASCON, A. 1995. Cell cycle regulation and human leukemias: the role of p16INK4 gene inactivation in the development of human acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 80, 557-68.
- DOHNER, H., ESTEY, E., GRIMWADE, D., AMADORI, S., APPELBAUM, F. R., BUCHNER, T., DOMBRET, H., EBERT, B. L., FENAUX, P., LARSON, R. A., LEVINE, R. L., LO-COCO, F., NAOE, T., NIEDERWIESER, D., OSSENKOPPELE, G. J., SANZ, M., SIERRA, J., TALLMAN, M. S., TIEN, H. F., WEI, A. H., LOWENBERG, B. & BLOOMFIELD, C. D. 2017. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*, 129, 424-447.
- DOHNER, H., ESTEY, E. H., AMADORI, S., APPELBAUM, F. R., BUCHNER, T., BURNETT, A. K., DOMBRET, H., FENAUX, P., GRIMWADE, D., LARSON, R. A., LO-COCO, F., NAOE, T., NIEDERWIESER, D., OSSENKOPPELE, G. J., SANZ, M. A., SIERRA, J., TALLMAN, M. S., LOWENBERG, B., BLOOMFIELD, C. D. & EUROPEAN, L. 2010. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, 115, 453-74.
- DOUDNA, J. A. & CHARPENTIER, E. 2014. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346, 1258096.
- ECKERDT, F., PEREZ-NEUT, M. & COLAMONICI, O. R. 2014. LIN-9 phosphorylation on threonine-96 is required for transcriptional activation of LIN-9 target genes and promotes cell cycle progression. *PLoS One*, 9, e87620.
- ESTERLECHNER, J., REICHERT, N., ILTZSCHE, F., KRAUSE, M., FINKERNAGEL, F. & GAUBATZ, S. 2013. LIN9, a subunit of the DREAM complex, regulates mitotic gene expression and proliferation of embryonic stem cells. *PLoS One*, 8, e62882.
- ESTEY, E. & DOHNER, H. 2006. Acute myeloid leukaemia. *Lancet*, 368, 1894-907.
- FERRARA, F. & SCHIFFER, C. A. 2013. Acute myeloid leukaemia in adults. *Lancet*, 381, 484-95.
- FIGUEROA, M. E., LUGTHART, S., LI, Y., ERPELINCK-VERSCHUEREN, C., DENG, X., CHRISTOS, P. J., SCHIFANO, E., BOOTH, J., VAN PUTTEN, W., SKRABANEK, L., CAMPAGNE, F., MAZUMDAR, M., GREALLY, J. M., VALK, P. J., LOWENBERG, B., DELWEL, R. & MELNICK, A. 2010. DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*, 17, 13-27.
- FIRCANIS, S., MERRIAM, P., KHAN, N. & CASTILLO, J. J. 2014. The relation between cigarette smoking and risk of acute myeloid leukemia: an updated meta-analysis of epidemiological studies. *Am J Hematol*, 89, E125-32.

- FUSS, I. J., KANOF, M. E., SMITH, P. D. & ZOLA, H. 2009. Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 7, Unit 7 1.
- GAGRICA, S., HAUSER, S., KOLFSCHOTEN, I., OSTERLOH, L., AGAMI, R. & GAUBATZ, S. 2004. Inhibition of oncogenic transformation by mammalian Lin-9, a pRB-associated protein. *EMBO J*, 23, 4627-38.
- GALBRAITH, D. W., ANDERSON, M. T. & HERZENBERG, L. A. 1999. Flow cytometric analysis and FACS sorting of cells based on GFP accumulation. *Methods in Cell Biology*, Vol 58, 58, 315-341.
- GAYLE, S. S., SAHNI, J. M. & KERI, R. A. 2017. BETi induction of mitotic catastrophe: towing the LIN9. *Oncoscience*, 4, 128-130.
- GEORGIU, C. D., GRINTZALIS, K., ZERVOUDAKIS, G. & PAPAPOSTOLOU, I. 2008. Mechanism of Coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: a hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins. *Anal Bioanal Chem*, 391, 391-403.
- GILLILAND, D. G., JORDAN, C. T. & FELIX, C. A. 2004. The molecular basis of leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 80-97.
- GLASEL, J. A. 1995. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *Biotechniques*, 18, 62-3.
- GREAVES, M. F. & WIEMELS, J. 2003. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer*, 3, 639-49.
- GRIGNANI, F., FERRUCCI, P. F., TESTA, U., TALAMO, G., FAGIOLI, M., ALCALAY, M., MENCARELLI, A., GRIGNANI, F., PESCHLE, C., NICOLETTI, I. & ET AL. 1993. The acute promyelocytic leukemia-specific PML-RAR alpha fusion protein inhibits differentiation and promotes survival of myeloid precursor cells. *Cell*, 74, 423-31.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- HAUSER, S., ULRICH, T., WURSTER, S., SCHMITT, K., REICHERT, N. & GAUBATZ, S. 2012. Loss of LIN9, a member of the DREAM complex, cooperates with SV40 large T antigen to induce genomic instability and anchorage-independent growth. *Oncogene*, 31, 1859-68.
- HAYES, R. B., YIN, S. N., DOSEMECI, M., LI, G. L., WACHOLDER, S., TRAVIS, L. B., LI, C. Y., ROTHMAN, N., HOOVER, R. N. & LINET, M. S. 1997. Benzene and the dose-related incidence of hematologic neoplasms in China. Chinese Academy of Preventive Medicine--National Cancer Institute Benzene Study Group. *J Natl Cancer Inst*, 89, 1065-71.
- HEID, C. A., STEVENS, J., LIVAK, K. J. & WILLIAMS, P. M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 6, 986-94.
- HOELZER, D. & GOKBUGET, N. 2012. Change in prognostic factors. *Leuk Suppl*, 1, S1-2.
- HOELZER, D., THIEL, E., LOFFLER, H., BUCHNER, T., GANSER, A., HEIL, G., KOCH, P., FREUND, M., DIEDRICH, H., RUHL, H. & ET AL. 1988. Prognostic factors in a multicenter study for treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. *Blood*, 71, 123-31.
- ICHIMARU, M., ISHIMARU, T. & BELSKY, J. L. 1978. Incidence of leukemia in atomic bomb survivors belonging to a fixed cohort in Hiroshima and Nagasaki, 1950--

71. Radiation dose, years after exposure, age at exposure, and type of leukemia. *J Radiat Res*, 19, 262-82.
- ILTZSCHE, F., SIMON, K., STOPP, S., PATTSCHULL, G., FRANCKE, S., WOLTER, P., HAUSER, S., MURPHY, D. J., GARCIA, P., ROSENWALD, A. & GAUBATZ, S. 2017. An important role for Myb-MuvB and its target gene KIF23 in a mouse model of lung adenocarcinoma. *Oncogene*, 36, 110-121.
- INABA, H., GREAVES, M. & MULLIGHAN, C. G. 2013. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, 381, 1943-55.
- INESS, A. N., FELTHOUSEN, J., ANANTHAPADMANABHAN, V., SESAY, F., SAINI, S., GUILLEY, K. Z., RUBIN, S. M., DOZMOROV, M. & LITOVCHICK, L. 2019. The cell cycle regulatory DREAM complex is disrupted by high expression of oncogenic B-Myb. *Oncogene*, 38, 1080-1092.
- JAFFREZOU, J. P., LEVADE, T., BETTAIEB, A., ANDRIEU, N., BEZOMBES, C., MAESTRE, N., VERMEERSCH, S., ROUSSE, A. & LAURENT, G. 1996. Daunorubicin-induced apoptosis: triggering of ceramide generation through sphingomyelin hydrolysis. *EMBO J*, 15, 2417-24.
- JAN, M. & MAJETI, R. 2013. Clonal evolution of acute leukemia genomes. *Oncogene*, 32, 135-40.
- JENSEN, E. C. 2013. Overview of live-cell imaging: requirements and methods used. *Anat Rec (Hoboken)*, 296, 1-8.
- JINEK, M., CHYLINSKI, K., FONFARA, I., HAUER, M., DOUDNA, J. A. & CHARPENTIER, E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337, 816-21.
- KAMPA-SCHITTENHELM, K. M., HAVERKAMP, T., BONIN, M., TSINTARI, V., BUHRING, H. J., HAEUSSER, L., BLUMENSTOCK, G., DREHER, S. T., GANIEF, T., AKMUT, F., ILLING, B., MAU-HOLZMANN, U. A., BONZHEIM, I., SCHLEICHER, E., VOGEL, W. & SCHITTENHELM, M. M. 2020. Epigenetic activation of O-linked beta-N-acetylglucosamine transferase overrides the differentiation blockage in acute leukemia. *EBioMedicine*, 54, 102678.
- KARLEN, Y., MCNAIR, A., PERSEGUERS, S., MAZZA, C. & MERMOD, N. 2007. Statistical significance of quantitative PCR. *BMC Bioinformatics*, 8, 131.
- KNIGHT, A. S., NOTARIDOU, M. & WATSON, R. J. 2009. A Lin-9 complex is recruited by B-Myb to activate transcription of G2/M genes in undifferentiated embryonal carcinoma cells. *Oncogene*, 28, 1737-47.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LAI, H., WANG, R., LI, S., SHI, Q., CAI, Z., LI, Y. & LIU, Y. 2019. LIN9 confers paclitaxel resistance in triple negative breast cancer cells by upregulating CCSAP. *Sci China Life Sci*.
- LAI, H., WANG, R., LI, S., SHI, Q., CAI, Z., LI, Y. & LIU, Y. 2020. LIN9 confers paclitaxel resistance in triple negative breast cancer cells by upregulating CCSAP. *Sci China Life Sci*, 63, 419-428.
- LARSON, R. A. 2007. Is secondary leukemia an independent poor prognostic factor in acute myeloid leukemia? *Best Pract Res Clin Haematol*, 20, 29-37.

- LITOVCHICK, L., SADASIVAM, S., FLORENS, L., ZHU, X., SWANSON, S. K., VELMURUGAN, S., CHEN, R., WASHBURN, M. P., LIU, X. S. & DECAPRIO, J. A. 2007. Evolutionarily conserved multisubunit RBL2/p130 and E2F4 protein complex represses human cell cycle-dependent genes in quiescence. *Mol Cell*, 26, 539-51.
- LIU-DUMLAO, T., KANTARJIAN, H., THOMAS, D. A., O'BRIEN, S. & RAVANDI, F. 2012. Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia: current treatment options. *Curr Oncol Rep*, 14, 387-94.
- LOWENBERG, B., DOWNING, J. R. & BURNETT, A. 1999. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 341, 1051-62.
- MCKINNON, K. M. 2018. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*, 120, 5 1 1-5 1 11.
- MUSA, J., AYNAUD, M. M., MIRABEAU, O., DELATTRE, O. & GRUNEWALD, T. G. 2017. MYBL2 (B-Myb): a central regulator of cell proliferation, cell survival and differentiation involved in tumorigenesis. *Cell Death Dis*, 8, e2895.
- NAGEL, G., WEBER, D., FROMM, E., ERHARDT, S., LUBBERT, M., FIEDLER, W., KINDLER, T., KRAUTER, J., BROSSART, P., KUNDGEN, A., SALIH, H. R., WESTERMANN, J., WULF, G., HERTENSTEIN, B., WATTAD, M., GOTZE, K., KRAEMER, D., HEINICKE, T., GIRSCHIKOFSKY, M., DERIGS, H. G., HORST, H. A., RUDOLPH, C., HEUSER, M., GOHRING, G., TELEANU, V., BULLINGER, L., THOL, F., GAIDZIK, V. I., PASCHKA, P., DOHNER, K., GANSER, A., DOHNER, H., SCHLENK, R. F. & GERMAN-AUSTRIAN, A. M. L. S. G. 2017. Epidemiological, genetic, and clinical characterization by age of newly diagnosed acute myeloid leukemia based on an academic population-based registry study (AMLSG BiO). *Ann Hematol*, 96, 1993-2003.
- NATHANS, D. 1964. Puromycin Inhibition of Protein Synthesis: Incorporation of Puromycin into Peptide Chains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 51, 585-92.
- NIE, X., LI, C., HU, S., XUE, F., KANG, Y. J. & ZHANG, W. 2017. An appropriate loading control for western blot analysis in animal models of myocardial ischemic infarction. *Biochem Biophys Res*, 12, 108-113.
- NOR RASHID, N., YUSOF, R. & WATSON, R. J. 2011. Disruption of repressive p130-DREAM complexes by human papillomavirus 16 E6/E7 oncoproteins is required for cell-cycle progression in cervical cancer cells. *J Gen Virol*, 92, 2620-7.
- OSTERLOH, L., VON EYSS, B., SCHMIT, F., REIN, L., HUBNER, D., SAMANS, B., HAUSER, S. & GAUBATZ, S. 2007. The human synMuv-like protein LIN-9 is required for transcription of G2/M genes and for entry into mitosis. *EMBO J*, 26, 144-57.
- PAPAEMMANUIL, E., GERSTUNG, M., BULLINGER, L., GAIDZIK, V. I., PASCHKA, P., ROBERTS, N. D., POTTER, N. E., HEUSER, M., THOL, F., BOLLI, N., GUNDEM, G., VAN LOO, P., MARTINCORENA, I., GANLY, P., MUDIE, L., MCLAREN, S., O'MEARA, S., RAINE, K., JONES, D. R., TEAGUE, J. W., BUTLER, A. P., GREAVES, M. F., GANSER, A., DOHNER, K., SCHLENK, R. F., DOHNER, H. & CAMPBELL, P. J. 2016. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*, 374, 2209-2221.
- PENDLETON, M., LINDSEY, R. H., JR., FELIX, C. A., GRIMWADE, D. & OSHEROFF, N. 2014. Topoisomerase II and leukemia. *Ann N Y Acad Sci*, 1310, 98-110.

- PIETKIEWICZ, S., SCHMIDT, J. H. & LAVRIK, I. N. 2015. Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of Imaging Flow Cytometry with classical Annexin V/propidium iodide staining. *J Immunol Methods*, 423, 99-103.
- PIKOR, L., THU, K., VUCIC, E. & LAM, W. 2013. The detection and implication of genome instability in cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 32, 341-52.
- PILKINTON, M., SANDOVAL, R., BARRETT, K., TIAN, X. & COLAMONICI, O. R. 2007. Mip/LIN-9 can inhibit cell proliferation independent of the pocket proteins. *Blood Cells Mol Dis*, 39, 272-7.
- PORCU, P., CRIPE, L. D., NG, E. W., BHATIA, S., DANIELSON, C. M., ORAZI, A. & MCCARTHY, L. J. 2000. Hyperleukocytic leukemias and leukostasis: a review of pathophysiology, clinical presentation and management. *Leuk Lymphoma*, 39, 1-18.
- PRATZ, K. W., KOH, B. D., PATEL, A. G., FLATTEN, K. S., POH, W., HERMAN, J. G., DILLEY, R., HARRELL, M. I., SMITH, B. D., KARP, J. E., SWISHER, E. M., MCDEVITT, M. A. & KAUFMANN, S. H. 2016. Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibitor Hypersensitivity in Aggressive Myeloproliferative Neoplasms. *Clin Cancer Res*, 22, 3894-902.
- PULTE, D., JANSEN, L., CASTRO, F. A., KRILAVICIUTE, A., KATALINIC, A., BARNES, B., RESSING, M., HOLLECZEK, B., LUTTMANN, S., BRENNER, H. & GROUP, G. C. S. W. 2016. Survival in patients with acute myeloblastic leukemia in Germany and the United States: Major differences in survival in young adults. *Int J Cancer*, 139, 1289-96.
- QUENTMEIER, H., REINHARDT, J., ZABORSKI, M. & DREXLER, H. G. 2003. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia cell lines. *Leukemia*, 17, 120-4.
- RAO, X., HUANG, X., ZHOU, Z. & LIN, X. 2013. An improvement of the $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath*, 3, 71-85.
- RASTELLI, F., BIANCANELLI, S., FALZETTA, A., MARTIGNETTI, A., CASI, C., BASCIONI, R., GIUSTINI, L. & CRISPINO, S. 2010. Triple-negative breast cancer: current state of the art. *Tumori*, 96, 875-88.
- REBECHI, M. T. & PRATZ, K. W. 2017. Genomic instability is a principle pathologic feature of FLT3 ITD kinase activity in acute myeloid leukemia leading to clonal evolution and disease progression. *Leuk Lymphoma*, 58, 1-11.
- REICHERT, N., WURSTER, S., ULRICH, T., SCHMITT, K., HAUSER, S., PROBST, L., GOTZ, R., CETECI, F., MOLL, R., RAPP, U. & GAUBATZ, S. 2010. Lin9, a subunit of the mammalian DREAM complex, is essential for embryonic development, for survival of adult mice, and for tumor suppression. *Mol Cell Biol*, 30, 2896-908.
- RIBEIRO, A. F., PRATCORONA, M., ERPELINCK-VERSCHUEREN, C., ROCKOVA, V., SANDERS, M., ABBAS, S., FIGUEROA, M. E., ZEILEMAKER, A., MELNICK, A., LOWENBERG, B., VALK, P. J. & DELWEL, R. 2012. Mutant DNMT3A: a marker of poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood*, 119, 5824-31.
- ROBERTS, M. S., SAHNI, J. M., SCHROCK, M. S., PIEMONTE, K. M., WEBER-BONK, K. L., SEACHRIST, D. D., AVRIL, S., ANSTINE, L. J., SINGH, S., SIZEMORE, S. T., VARADAN, V., SUMMERS, M. K. & KERI, R. A. 2020. LIN9 and NEK2 are core

- regulators of mitotic fidelity that can be therapeutically targeted to overcome taxane resistance. *Cancer Res*.
- SADASIVAM, S. & DECAPRIO, J. A. 2013. The DREAM complex: master coordinator of cell cycle-dependent gene expression. *Nat Rev Cancer*, 13, 585-95.
- SAHNI, J. M., GAYLE, S. S., WEBB, B. M., WEBER-BONK, K. L., SEACHRIST, D. D., SINGH, S., SIZEMORE, S. T., RESTREPO, N. A., BEBEK, G., SCACHERI, P. C., VARADAN, V., SUMMERS, M. K. & KERI, R. A. 2017. Mitotic Vulnerability in Triple-Negative Breast Cancer Associated with LIN9 Is Targetable with BET Inhibitors. *Cancer Res*, 77, 5395-5408.
- SCHMIT, T., KLOMP, M. & KHAN, M. N. 2021. An Overview of Flow Cytometry: Its Principles and Applications in Allergic Disease Research. *Methods Mol Biol*, 2223, 169-182.
- SCHOCHETMAN, G., OU, C. Y. & JONES, W. K. 1988. Polymerase chain reaction. *J Infect Dis*, 158, 1154-7.
- SEDGWICK, P. 2014. Spearman's rank correlation coefficient. *BMJ*, 349, g7327.
- SHU, S., LIN, C. Y., HE, H. H., WITWICKI, R. M., TABASSUM, D. P., ROBERTS, J. M., JANISZEWSKA, M., HUH, S. J., LIANG, Y., RYAN, J., DOHERTY, E., MOHAMMED, H., GUO, H., STOVER, D. G., EKRAM, M. B., BROWN, J., D'SANTOS, C., KROP, I. E., DILLON, D., MCKEOWN, M., OTT, C., QI, J., NI, M., RAO, P. K., DUARTE, M., WU, S. Y., CHIANG, C. M., ANDERS, L., YOUNG, R. A., WINER, E., LETAI, A., BARRY, W. T., CARROLL, J. S., LONG, H., BROWN, M., LIU, X. S., MEYER, C. A., BRADNER, J. E. & POLYAK, K. 2016. Response and resistance to BET bromodomain inhibitors in triple-negative breast cancer. *Nature*, 529, 413-417.
- STONE, R. M., LARSON, R. A. & DOHNER, H. 2017. Midostaurin in FLT3-Mutated Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*, 377, 1903.
- SWEENEY, C. & VYAS, P. 2019. The Graft-Versus-Leukemia Effect in AML. *Front Oncol*, 9, 1217.
- SWERDLOW, S. H., CAMPO, E., PILERI, S. A., HARRIS, N. L., STEIN, H., SIEBERT, R., ADVANI, R., GHIELMINI, M., SALLES, G. A., ZELENETZ, A. D. & JAFFE, E. S. 2016. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*, 127, 2375-90.
- TALLMAN, M. S., ANDERSEN, J. W., SCHIFFER, C. A., APPELBAUM, F. R., FEUSNER, J. H., OGDEN, A., SHEPHERD, L., WILLMAN, C., BLOOMFIELD, C. D., ROWE, J. M. & WIERNIK, P. H. 1997. All-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med*, 337, 1021-8.
- TERWILLIGER, T. & ABDUL-HAY, M. 2017. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J*, 7, e577.
- THORNER, A. R., HOADLEY, K. A., PARKER, J. S., WINKEL, S., MILLIKAN, R. C. & PEROU, C. M. 2009. In vitro and in vivo analysis of B-Myb in basal-like breast cancer. *Oncogene*, 28, 742-51.
- TORRE, L. A., BRAY, F., SIEGEL, R. L., FERLAY, J., LORTET-TIEULENT, J. & JEMAL, A. 2015. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 65, 87-108.
- VERMES, I., HAANEN, C., STEFFENS-NAKKEN, H. & REUTELINGSPERGER, C. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine

- expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*, 184, 39-51.
- WEINBERG, O. K., SOHANI, A. R., BHARGAVA, P. & NARDI, V. 2017. Diagnostic work-up of acute myeloid leukemia. *Am J Hematol*, 92, 317-321.
- WHITLEY, E. & BALL, J. 2002. Statistics review 1: presenting and summarising data. *Crit Care*, 6, 66-71.
- WISEMAN, E. F., CHEN, X., HAN, N., WEBBER, A., JI, Z., SHARROCKS, A. D. & ANG, Y. S. 2015. Deregulation of the FOXM1 target gene network and its coregulatory partners in oesophageal adenocarcinoma. *Mol Cancer*, 14, 69.
- YANG, Y., TAKEUCHI, S., HOFMANN, W. K., IKEZOE, T., VAN DONGEN, J. J., SZCZEPANSKI, T., BARTRAM, C. R., YOSHINO, N., TAGUCHI, H. & KOEFFLER, H. P. 2006. Aberrant methylation in promoter-associated CpG islands of multiple genes in acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*, 30, 98-102.

8 Anhang

8.1 Western Blot Originale

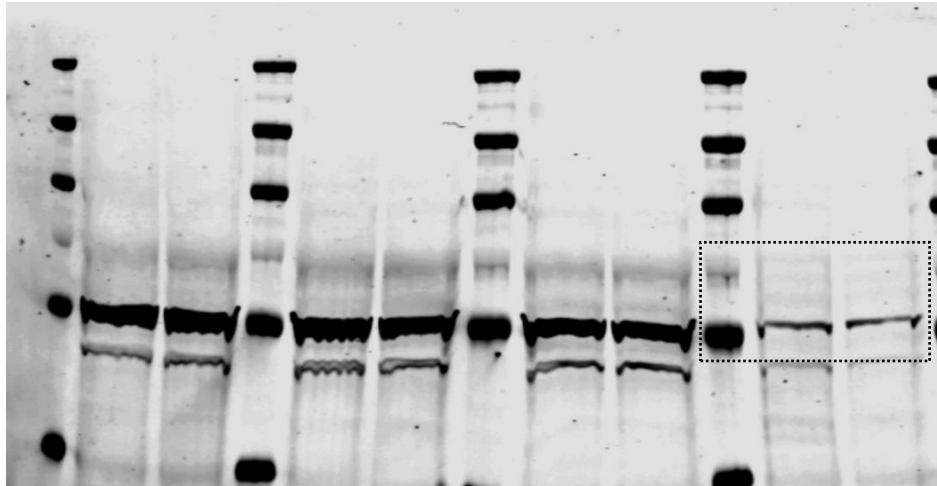


Abbildung 21: **Original Western Blot zu Abbildung 8 B.**

Taschen 2-3, 5-6 und 8-9 zeigen nicht relevante Versuche für die Dissertation. Tasche 10 wurde mit dem Marker beladen. Tasche 11 wurde mit der Molm-14 EV-Kontrolle und Tasche 12 mit dem Molm-14 LIN9 KD beladen. Im Ergebnisteil dargestellter Western Blot Ausschnitt wurde eingerahmt.

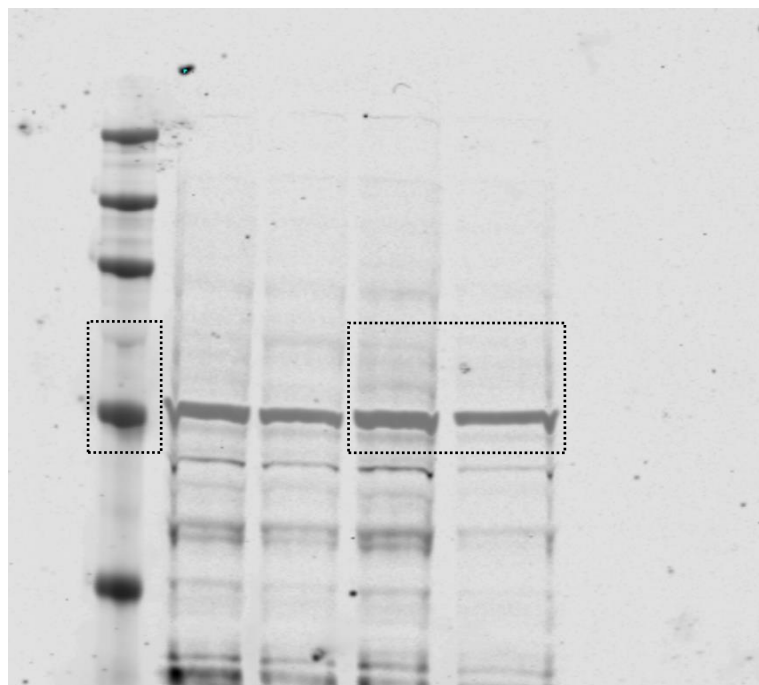


Abbildung 22: **Original Western Blot zu Abbildung 15 B.**

Tasche 1 wurde mit dem Marker beladen. Taschen 2-3 zeigen nicht relevante Versuche für die Dissertation. Tasche 4 wurde mit der Jurkat EV-Kontrolle und Tasche 5 mit dem Jurkat LIN9 KD beladen. Im Ergebnisteil dargestellte und zusammengefügte Western Blot Ausschnitte wurden eingerahmt.

9 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Inneren Medizin II der Universitätsklinik Tübingen unter Betreuung von Frau PD Dr. Kerstin Kampa-Schittenhelm durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. Kerstin Kampa-Schittenhelm.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau PD Dr. Kerstin Kampa-Schittenhelm und Frau M.Sc. Lara Häußler von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung und Literaturrecherche erfolgten eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig, nach Anleitung durch Frau PD Dr. Kerstin Kampa-Schittenhelm und Herr PD Dr. Marcus Schittenhelm, verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Freiburg, den 27.05.2023

Sara Tabea Orlich

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die das Entstehen dieser Arbeit ermöglicht und mich auf diesem Weg begleitet haben.

Zunächst möchte ich Frau PD Dr. Kerstin Kampa-Schittenhelm für die Möglichkeit zur Promotion in Ihrem Labor und für die freundliche Betreuung bei der Forschungsarbeit und Erstellung der Dissertationsschrift danken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau M.Sc. Lara Häußler für Ihre Unterstützung bei der Laborarbeit und das stets offene Ohr. Vielen Dank auch an die ganze Arbeitsgruppe für das gute Miteinander und die schöne Zeit in Wien.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Marcus Schittenhelm für die hilfreichen Korrekturen in der Dissertationsschrift bedanken.

Ein großer Dank geht auch an Dr. Michael Orlich, der mich immer wieder bestärkt und zuversichtlich gestimmt hat.

Zuletzt danke ich meiner Familie, die mich in all meinen Vorhaben ermutigt und begleitet.