

**Die Rolle verschiedener *GF11*-Expressionslevel in  
der Progression von MDS und AML**

**Inaugural-Dissertation**

**zur**

**Erlangung des Doktorgrades**

**Dr. rer. nat.**

**der Fakultät für**

**Biologie**

**an der**

**Universität Duisburg-Essen**

**vorgelegt von**

**Judith M. Hönes**

**aus Dorsten**

**Juni 2016**

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden in der Klinik für Hämatologie des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Opalka

2. Gutachter: Prof. `in Dr. S. Knauer

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. B. Horsthemke

Tag der mündlichen Prüfung: 12.09.2016

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	6
<b>2</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	9
<b>3</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	13
<b>4</b>	<b>Einleitung</b> .....	14
4.1	Hämatopoese.....	14
4.2	Myelodysplastisches Syndrom und akute myeloische Leukämie.....	16
4.3	Der Transkriptionsfaktor <i>Growth Faktor Independence 1</i> (GFI1).....	19
4.3.1	Struktur von GFI1/Gfi1.....	19
4.3.2	Funktion von GFI1/Gfi1.....	20
4.3.3	Die Rolle von GFI1/Gfi1 in der Neuropenie und der AML.....	21
4.4	Epigenetische Modifikationen und ihre Rolle in der Krebsentstehung.....	23
4.5	Vorinostat und CTK7a.....	25
<b>5</b>	<b>Zielsetzung</b> .....	26
<b>6</b>	<b>Materialien und Methoden</b> .....	27
6.1	Material.....	27
6.1.1	Chemikalien.....	27
6.1.2	Primer.....	29
6.1.3	Antikörper.....	29
6.1.4	Verbrauchsmaterialien.....	30
6.1.5	Puffer.....	31
6.1.6	Geräte.....	32
6.1.7	Kits.....	33
6.1.8	Zelllinien.....	33
6.1.9	EDV-Programme.....	33
6.2	Methoden.....	34
6.2.1	Mäuse.....	34
6.2.2	Haltung von Mäusen.....	37
6.2.3	Isolation von Knochenmark- und Milzzellen.....	37
6.2.4	Isolation von Lineage-negativen Zellen (Lin <sup>-</sup> -Zellen).....	37
6.2.5	Oberflächenmarkerfärbung von Knochenmark- und Milzzellen.....	38
6.2.6	Färbung von Granulozyten-Makrophagen-Vorläuferzellen ( <i>Granulocyte Macrophage Progenitors, GMPs</i> ).....	39

6.2.7	AnnexinV-Apoptose-Assay .....	40
6.2.8	Automatisiertes Differentialblutbild.....	41
6.2.9	Wright-Giemsa- und Pappenheim-Färbung von KM- bzw. Milzcytopspins und Blutaussstrichen.....	41
6.2.10	Kryokonservierung von primären Zellen und Zelllinien in Einfriermedium. ....	41
6.2.11	Bestimmung der Anzahl lebender Zellen mittels Trypanblau .....	42
6.2.12	DNA-Klonierung .....	42
6.2.13	Retrovirusproduktion .....	43
6.2.14	Bestimmung des Virustiters .....	44
6.2.15	Virale Transduktion .....	45
6.2.16	Durchflusszytometrische Analyse (FACS) .....	45
6.2.17	Flüssigkultur-Assay.....	46
6.2.18	Methylcellulose-Assay ( <i>CFU-Assay</i> ).....	46
6.2.19	Transplantation von frischen KM-Zellen in Mäuse .....	46
6.2.20	Sekundäre Transplantation von KM-Zellen in Mäuse .....	47
6.2.21	Blutabnahme bei Mäusen .....	48
6.2.22	Zellkultur .....	48
6.2.23	Behandlung von Zellen mit Inhibitoren.....	48
6.2.24	Bestimmung der <i>GFI1</i> -Expressionsleveln mittels Taq Man <i>Real-Time-PCR</i> .....	49
6.2.25	Bestrahlung von Mäusen und Zellen.....	50
6.2.26	Statistische Analysen.....	50
<b>7</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>51</b>
7.1	Geringe <i>GFI1</i> -Expression beeinflusst die Prognose von AML-Patienten ....	51
7.2	Der Knock-down von <i>GFI1</i> ist assoziiert mit spezifischen Alterationen des hämatopoietischen Systems .....	56
7.2.1	<i>GFI1</i> -KD und der Verlust vom <i>GFI1</i> -Gen beschleunigt die AML-Progression im MLL-AF9-Mausmodell.....	61
7.2.2	<i>GFI1</i> -KD und der Verlust eines <i>GFI1</i> -Allels beschleunigt die AML-Progression im <i>NUP98/HOXD13</i> -Mausmodell.....	70
7.2.3	Geringe <i>GFI1</i> -Expression korreliert mit verminderter Apoptose, veränderter Genexpression und veränderten Histon-Acetylierungsmustern .....	78
7.2.4	Epigenetische Therapie als neuer Therapieansatz für leukämische Zellen mit geringer <i>GFI1</i> -Expression .....	82

7.2.5	Hochregulation der <i>GFI1</i> -Expression führte zu terminaler Differenzierung und erhöhter Apoptose im <i>MLL-AF9</i> -Mausmodell.....	91
7.2.6	<i>GFI1</i> ist essentiell für die AML-Entwicklung in <i>AML1-ETO9a</i> transduzierten Zellen.....	94
7.2.7	<i>GFI1</i> ist essentiell für die AML-Progression <i>in vivo</i> .....	98
7.2.8	Die Deletion von <i>GFI1</i> implizierte eine Verzögerung in der AML-Progression.....	103
7.2.9	Der <i>Gfi1</i> -KO verzögerte die AML-Progression im <i>CBFB-MYH11-MxCre</i> -Mausmodell.....	105
<b>8</b>	<b>Diskussion</b> .....	107
8.1	Geringe <i>GFI1</i> -Expression beeinflusst die Prognose von AML-Patienten ..	107
8.2	Der <i>Knock-down</i> von <i>GFI1</i> führte zu einer Blockade in der myeloiden Differenzierungsreihe .....	109
8.3	<i>GFI1</i> -KD und der Verlust des <i>Gfi1</i> -Gens beschleunigten die AML-Progression im <i>MLL-AF9</i> -Mausmodell .....	110
8.4	<i>GFI1</i> -KD und der Verlust eines <i>GFI1</i> -Allels beschleunigte die AML-Progression im <i>NUP98/HOXD13</i> -Mausmodell .....	112
8.5	Eine geringe <i>GFI1</i> -Expression korrelierte mit verminderter Apoptose, veränderter Genexpression und veränderten Histon-Acetylierungsmustern .....	113
8.6	Epigenetische Therapie als neuer Therapieansatz für leukämische Zellen mit geringer <i>GFI1</i> -Expression .....	115
8.7	Hochregulation der <i>GFI1</i> -Expression führte zur terminaler Differenzierung und erhöhter Apoptose im <i>MLL-AF9</i> -Mausmodell.....	116
8.8	<i>GFI1</i> ist essentiell für die AML-Entwicklung in <i>AML1-ETO9a</i> transduzierten Zellen .....	117
8.9	<i>GFI1</i> ist essentiell für die AML-Progression <i>in vivo</i> .....	117
8.10	Der <i>Gfi1</i> -KO verzögert die AML-Progression im <i>CBFB-MYH11</i> -Mausmodell.. .....	118
<b>9</b>	<b>Ausblick</b> .....	120
<b>10</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	122
<b>11</b>	<b>Summary</b> .....	124
<b>12</b>	<b>Anhang</b> .....	125
12.1	Tabellen.....	125
12.2	Abbildungen .....	127
12.3	Referenzen.....	130
<b>13</b>	<b>Danksagung</b> .....	140
<b>14</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	141

<b>15</b>	<b>Eigene Publikationen aus dieser Arbeit</b> .....	142
15.1	Publiziert.....	142
15.2	Eingereicht .....	142
<b>16</b>	<b>Erklärungen</b> .....	143

**1 Abkürzungsverzeichnis**

ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
BSA	Bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	complementary DNA
CFU	Colony forming unit
CMP	Common myeloid progenitor
CLP	Common lymphoid progenitor
CT	Threshold cycle
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ETP	Early T-cell precursor
FAB-Klassifikation	Französisch-Amerikanisch-Britische-Klassifikation
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSC	Forward scatter
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GF11/Gfi1	Growth factor independence-1
GFP	Green fluorescent protein
GMP	Granulocyte macrophage progenitor
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
Gy	Gray
H3K4me2	Dimethylation at lysine 4 of histone 3
H3K9ac	Acetylation at lysine 9 of histone 3
HAT	Histon-Acetyl-Transferase
HATi	Histone-Acetyl-Transferase-Inhibitor
HDAC	Histon-Deacetylase
HDACi	Histon-Deacetylase-Inhibitor

HDM	Histon-Demethylase
HMT	Histon-Methyltransferase
HEBS	HEPES-buffered saline
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HGB	Hämoglobin
HSC	Hematopoietic stem cell
IL-3	Interleukin-3
IL-6	Interleukin-6
IMDM	Iscove's modified Dulbecco's medium
IVC	Individuell ventilierte Käfige
KD	Knock-down
kDa	Kilodalton
KI	Knock-in
KM	Knochenmark
KO	Knock-out
Lin <sup>-</sup>	Lineage-negativ
LMPP	Lymphoid primed multipotent progenitor
LSC	Leukemic stem cell
LSD	Lysine demethylase
LT-HSC	Long-term HSC
MACS	Magnetic cell sorting
MEP	Megakaryocyte erythrocyte progenitor
MDS	Myelodysplastic syndrome
ml	Milliliter
mM	Milimolar
MPP	Multipotent progenitor
mRNA	messenger RNA
PB	Peripheres Blut
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
pIpC	Poly(deoxyinosinic-deoxycytidylic) acid sodium salt
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PLT	Platelets;Thrombozyten
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluoride
RNA	Ribonucleic acid



rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
SAHA	Suberoylanilide hydroxamic acid
SCF	Stem cell factor
SCM	Stem cell medium
SCN	Severe congenital neutropenia
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SNAG	SNAIL/Gfi-1
SPF	Specific pathogen free
SSC	Side scatter
ST-HSC	Short-term HSC
tg	transgen
U.K.	United Kingdom
U.S.A.	United States of America
WBC	White blood cells, Weiße Blutzellen
WT	Wild-type
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
ZTL	Zentrales Tierlaboratorium

**2 Abbildungsverzeichnis**

**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Hämatopoese..... 16

**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des Transkriptionsfaktors GFI1. .... 20

**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der biochemischen Funktion von Gfi1. .... 21

**Abbildung 4:** Schematische Darstellung des *GFI1*-KD Maus-Modells. .... 35

**Abbildung 5:** Gatingstrategie für transfizierte Knochenmarkzellen. .... 47

**Abbildung 6** Schematische Darstellung des Prinzips der quantitativen *Real-Time*-PCR mittels TaqMan-Sonden. .... 50

**Abbildung 7:** MDS-Patienten mit geringerem *GFI1*-Expressionslevel weisen mehr Blasten im KM auf.. .... 51

**Abbildung 8:** AML Patienten mit geringem *GFI1*-Expressionslevel haben eine schlechtere Prognose..... 52

**Abbildung 9:** Korrelation zwischen *GFI1*-Expression und AML-Prognose. .... 53

**Abbildung 10:** Mutationsfrequenz der Patientenkohorte von Verhaak et al. (2009). 54

**Abbildung 11:** Hohe *GFI1*-Expressionslevel korrelieren mit einer guten Prognose bei AML-Patienten..... 55

**Abbildung 12:** *Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)* von humanen leukämischen Zellen mit geringen *GFI1*-Expressionslevel zeigen Expressionsmuster wie *LSCs* und *HSCs*. .... 56

**Abbildung 13:** Verwendete Mausmodelle. Schematische Darstellung des *GFI1*-/*Gfi1*-Locus der in dieser Arbeit verwendeten Mausstämme. .... 57

**Abbildung 14:** Einfluss der verschiedenen *GFI1*-Expressionslevel auf die Hämatopoese. .... 58

**Abbildung 15:** *GFI1*-KD- und *Gfi1*-KO-Mäuse generieren mehr *GMPs*.. .... 59

**Abbildung 16:** *CFU*-Assay von *Lin*<sup>-</sup>-Zellen der Mäuse mit verschiedenen Genotypen. .... 60

**Abbildung 17:** Schematische Darstellung des *MLL-AF9* in vitro-Experiments. .... 61

**Abbildung 18:** Schematische Darstellung der Isolation von *Lin*<sup>-</sup>-Zellen der jeweiligen Mausstämme und Transduktion der Zellen mit einem *MLL-AF9*-exprimierenden Retrovirus. .... 62

**Abbildung 19:** Schematische Darstellung des *MLL-AF9*-Transplantationsexperiments..... 63

**Abbildung 20:** *GFI1*-KD- und *Gfi1*-KO-Zellen zeigen eine erhöhte AML-Induktion im *MLL-AF9*-Transplantationsmodell..... 63

**Abbildung 21:** Transplantierte *GFI1*-KD-*MLL-AF9*-Mäuse zeigten einen höheren Anteil an Blasten im KM und peripheren Blut als *GFI1*-KI- und *Gfi1*-KO-*MLL-AF9*-Mäuse..... 64

**Abbildung 22:** Analyse des PBs der *MLL-AF9*-transplantierten Mäuse.. ..... 65

**Abbildung 23:** Erhöhung der Blastenanzahl in *MLL-AF9* transplantierten Mäusen. 66

**Abbildung 24:** *MLL-AF9*-transplantierte Mäuse entwickelten eine Splenomegalie. 66

**Abbildung 25:** Prozentualer Anteil GFP<sup>+</sup>-Zellen im KM der *MLL-AF9*-transplantierten Mäuse..... 67

**Abbildung 26:** GF11-Proteinexpressionslevel im KM der transplantierten *MLL-AF9*-Mäuse..... 67

**Abbildung 27:** Graphische Darstellung der cKit<sup>+</sup>-Zellen im KM der *MLL-AF9* transplantierten Mäuse.. ..... 68

**Abbildung 28:** Der *GFI1*-KD-Genotyp zeigte eine beschleunigte AML-Progression im *MLL-AF9*-Mausmodell.. ..... 69

**Abbildung 29:** *GFI1*-KI- und *GFI1*-KD-*MLL-AF9*-transgene Mäuse zeigen keinen Unterschied bezüglich der Anzahl an Mac-1<sup>+</sup>- und Gr-1<sup>+</sup>-Zellen. .... 70

**Abbildung 30:** Schematische Darstellung der Kreuzung zwischen den verschiedenen *GFI1*-Mausstämmen mit den *NUP98/HOXD13*-Mäusen. .... 70

**Abbildung 31:** *GFI1*-KD beschleunigte die AML-Entwicklung in *NUP98/HOXD13*-transgenen Mäusen..... 71

**Abbildung 32:** Analyse des PBs der transgenen *NUP98/HOXD13*-Mäuse..... 72

**Abbildung 33:** Transgene *NUP98/HOXD13*-Mäuse zeigten eine Splenomegalie ... 73

**Abbildung 34:** *GFI1*-KD-*NUP98/HOXD13* transgene Mäuse zeigten eine erhöhte Anzahl an Mac1<sup>+</sup>- und Gr1<sup>+</sup>-Zellen im KM..... 74

**Abbildung 35:** *Gfi1*-WT/EGFP-KI Mäuse exprimieren weniger GF11.. ..... 75

**Abbildung 36:** Die *Gfi1*-WT/EGFP-KI-*Nup98/HOXD13* transgenen Mäuse entwickelten schneller eine AML als *Gfi1*-WT-*NUP98/HOXD13* Mäuse..... 75

**Abbildung 37:** Analyse des peripheren Bluts der *Gfi1*-WT/EGFP-KI- und *Gfi1*-WT - *NUP98/HOXD13* transgenen Mäuse..... 76

**Abbildung 38:** Mäuse mit geringerem *Gfi1*-Expressionslevel starben schneller an einer AML.. ..... 77

**Abbildung 39:** Deletionen im *GFI1*-Locus sind häufig bei MDS-Patienten..... 78

<b>Abbildung 40:</b> Die Verminderung des <i>GFI1</i> -Expressionslevels resultierte in verminderter Apoptose, wohingegen die Deletion von <i>GFI1</i> mit erhöhter Apoptose einherging.....	79
<b>Abbildung 41:</b> <i>Gene Set Enrichment Analyse</i> (GSEA) von KM-Zellen der <i>GFI1</i> -KD- <i>NUP98/HOXD13</i> -Mäusen.....	80
<b>Abbildung 42:</b> Der KD der <i>GFI1</i> -Expression führte zu einer Anreicherung von H3K9-Acetylierung in leukämischen Zellen. ....	81
<b>Abbildung 43:</b> Modell der pathophysiologischen Funktion von geringer <i>GFI1</i> -Expression in der AML und mögliche therapeutischen Intervention.. ....	82
<b>Abbildung 44:</b> CTK7a zeigt keine toxische Wirkung auf gesunde Zellen.....	83
<b>Abbildung 45:</b> Behandlung von transduzierten <i>MLL-AF9</i> -Mauszellen mit Inhibitoren .....	84
<b>Abbildung 46:</b> Leukämische <i>GFI1</i> -KD-Zellen reagierten besser auf CTK7a.....	85
<b>Abbildung 47:</b> Versuchsaufbau: Behandlung von Lin- Zellen von transgenen <i>NUP98/HOXD13</i> -Mäusen mit Inhibitoren. ....	85
<b>Abbildung 48:</b> <i>NUP98/HOXD13</i> exprimierende <i>GFI1</i> -KD-Zellen reagierten besser auf CTK7a. ....	86
<b>Abbildung 49:</b> Kasumi 1-Zellen exprimieren mehr <i>GFI1</i> -mRNA als K562-Zellen....	87
<b>Abbildung 50:</b> Humane AML-Zellen mit geringem <i>GFI1</i> -Expressionslevel reagierten besser auf CTK7a.....	87
<b>Abbildung 51:</b> Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Behandlung von primären humanen AML-Zellen mit CTK7a und Vorinostat. ....	88
<b>Abbildung 52:</b> Primäre humane AML-Zellen mit niedrigem <i>GFI1</i> -Expressionslevel reagieren besser auf CTK7a.....	89
<b>Abbildung 53:</b> Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Behandlung transplanteder Mäuse mit CTK7a (HATi) und Vorinostat (HDACi). ....	90
<b>Abbildung 54:</b> Die Behandlung transplanteder <i>MLL-AF9</i> -Mäuse mit CTK7a verzögerte die AML-Progression. ....	90
<b>Abbildung 55:</b> Schematische Darstellung des <i>GFI1</i> -KD-Mxcre- <i>MLL-AF9</i> Transplantationsexperiments.....	91
<b>Abbildung 56:</b> Die Hochregulation von <i>GFI1</i> in vivo führt zu einer Ausdifferenzierung von unreifen KM-Zellen.....	93
<b>Abbildung 57:</b> Mäuse bei denen die <i>GFI1</i> -Expression hochreguliert wurde, wiesen einen höheren Anteil an AnnexinV <sup>+</sup> Zellen auf. ....	94

<b>Abbildung 58:</b> Schematische Darstellung der Isolation von Lin <sup>-</sup> -Zellen der jeweiligen Mausgenotypen und Transduktion der Zellen mit einem <i>AML-ETO9a</i> exprimierenden Retrovirus. ....	95
<b>Abbildung 59:</b> Anwesenheit des Onkofusionsproteins AML1-ETO9a verstärkte die Proliferation von Lin <sup>-</sup> -Zellen der <i>Gfi1</i> -WT-Mäuse.....	96
<b>Abbildung 60:</b> Verminderte <i>GFI1</i> -Expression inhibiert die Koloniebildung von Lin <sup>-</sup> -Zellen in Anwesenheit des Onkofusionsprotein <i>AML1-ETO9a</i> . ....	97
<b>Abbildung 61:</b> Verschiedene <i>Gfi1</i> -Expressionslevel beeinflussen die AML-Progression in Mäusen.....	98
<b>Abbildung 62:</b> Verschiedene <i>GFI1</i> -Expressionslevel beeinflussen die Manifestation und Progression einer AML in vivo. ....	99
<b>Abbildung 63:</b> <i>Gfi1</i> -WT Mäuse zeigten einen signifikant höheren Anteil an Blasten im peripheren Blut (PB) als Mäuse mit geringeem <i>Gfi1</i> -Expressionslevel.....	99
<b>Abbildung 64:</b> Graphische Darstellung der GFP <sup>+</sup> - und cKit <sup>+</sup> -Zellen im KM und in der Milz der transplantierten Mäuse mit <i>AML1-ETO9a</i> . ....	101
<b>Abbildung 65:</b> Höhere <i>GFI1</i> -Expressionslevel führten zu einer Erhöhung an Blasten im peripheren Blut.. ....	102
<b>Abbildung 66:</b> Überleben der sekundär transplantierten <i>AML1-ETO9a</i> -Mäuse....	103
<b>Abbildung 67:</b> Schematische Darstellung des <i>Gfi1</i> -flox-Mxcre- <i>AML1-ETO9a</i> -Transplantationsmodells.....	104
<b>Abbildung 68:</b> Die Deletion des <i>Gfi1</i> -Gens verzögerte die AML-Progression im <i>AML1-ETO9a</i> -Mausmodell. ....	104
<b>Abbildung 69:</b> Der <i>Gfi1</i> -KO verzögerte die AML-Progression im <i>CBFB-MYH11</i> -Mausmodell. ....	106
<b>Abbildung 70:</b> Western Blot des nuklearen Extrakts aus KM-Zellen von <i>GFI1</i> -KI- und <i>GFI1</i> -KD- <i>NUP98/HOXD13</i> -Mäusen. ....	127
<b>Abbildung 71:</b> Durchflusszytometrische Analyse und Cytospinns von <i>Gfi1</i> -EGFP- <i>NUP98/HOXD13</i> -Mäusen.....	128
<b>Abbildung 72:</b> Der <i>GFI1</i> -KD in <i>NUP98/HOXD13</i> -Mäusen beeinflusst Gene der Chromosomen- und Chromatinorganisation und der Transkriptionsregulation.....	128
<b>Abbildung 73:</b> Der <i>GFI1</i> -KD in <i>NUP98/HOXD13</i> -Mäusen beeinflusst Gene, die eine Rolle in der Leukämieentwicklung spielen. ....	129
<b>Abbildung 74:</b> IC50-Konzentration von Vorinostat ist höher bei AML-Zellen mit geringer <i>GFI1</i> -Expression.....	129

### 3 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> TaqMan Sonden für <i>Real-Time</i> -PCR .....	29
<b>Tabelle 2:</b> Liste der verwendeten Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse .....	29
<b>Tabelle 3:</b> Antikörper für WesternBlot Analyse .....	30
<b>Tabelle 4:</b> Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien .....	30
<b>Tabelle 5:</b> Liste der verwendeten Geräte .....	32
<b>Tabelle 6:</b> Liste der verwendeten Kits .....	33
<b>Tabelle 7:</b> Verwendete Zelllinien .....	33
<b>Tabelle 8:</b> Kombination verwendeter Antikörper zur Färbung der Oberflächenmarker von KM- und Milzzellen .....	39
<b>Tabelle 9:</b> Antikörper für <i>GMP</i> -Färbung .....	40
<b>Tabelle 10:</b> Patienten der Kohorte aus dem Universitätsklinikum Essen. ....	125
<b>Tabelle 11:</b> Patienten der Kohorte von Verhaak et al. (2009) (Verhaak et al., 2009). .....	126
<b>Tabelle 12:</b> Cox-Regressionstabelle der prognostischen Faktoren der Kohorte von Verhhaak et al. (2009). ....	127

## 4 Einleitung

### 4.1 Hämatopoese

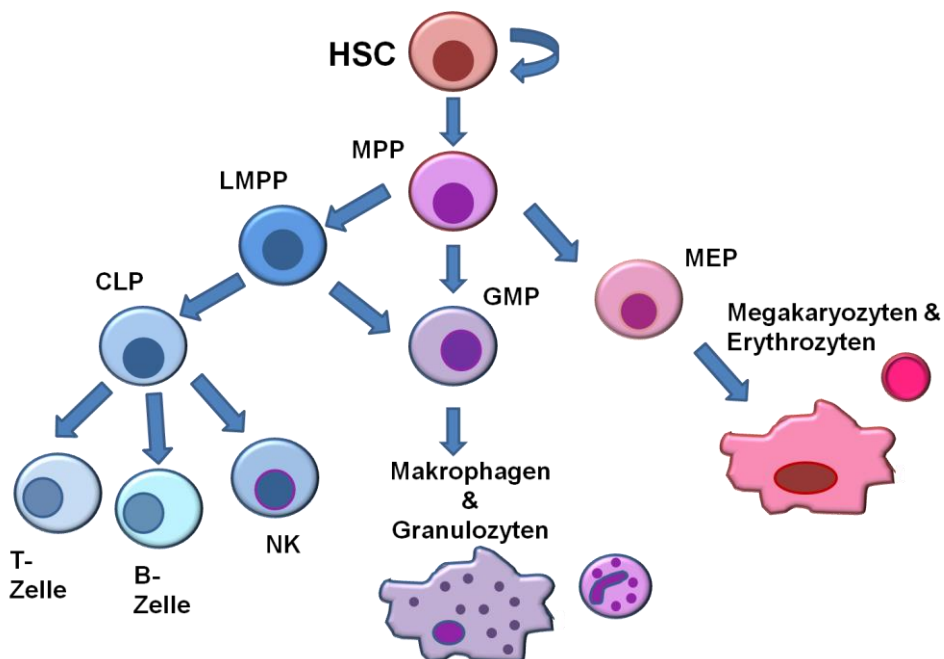
Als Hämatopoese wird die Bildung von differenzierten Blutzellen, ausgehend von der hämatopoetischen Stammzelle (*hematopoietic stem cell, HSC*) im Knochenmark (KM), bezeichnet. Das humane KM produziert täglich  $10^{12}$  Zellen (Kosan and Godmann, 2016). *HSCs* sind in der Lage in jede Art von Blutzelle auszdifferenzieren, aber sie können auch ihre Selbsterneuerung aufrecht erhalten (Doulatov *et al.*, 2012). Bei Erwachsenen findet die Hämatopoese vorwiegend im KM von Wirbelsäule, Schädelknochen, Hüfte, Schulter und Brustbein statt. Dort befinden sich die *HSCs* in der sogenannten Stammzellnische. Diese Nische sorgt über die Bereitstellung verschiedener Signale zur Aufrechterhaltung der Stammzeleigenschaften. Durch verschiedene intrinsische Mechanismen, wie epigenetische Regulationen oder die Aktivität von Transkriptionsfaktoren, wird die Balance zwischen Differenzierung und Selbsterneuerung der *HSCs* gewährleistet (Wilson *et al.*, 2009).

Das hämatopoetische System kann grob in zwei Linien eingeteilt werden: Erstens die myeloische Linie und zweitens die lymphatische Linie. Die Differenzierung einer *HSC* hin zu einer reifen lymphatischen oder myeloischen Blutzelle folgt einer hierarchischen Struktur (Seita and Weissman, 2010). Die hämatopoetische Stammzelle ist in der Lage sich zu teilen um eine weitere multipotente Stammzelle oder eine Vorläuferzelle zu bilden. Vorläuferzellen sind in ihrer Teilungsfähigkeit limitiert, bevor sie zu reifen Blutzellen differenzieren. Differenzierte myeloische oder lymphatische Zellen entwickeln sich demnach über ihre verschiedenen Vorläuferzellen (Abbildung 1).

Genauer betrachtet, lassen sich *HSCs* in zwei verschiedene Gruppen einteilen: Zum Einen in die *Quiescent longterm HSCs (LT-HSC)* und zum Anderen in die *Shortterm HSC (ST-HSC)*. Die *LT-HSCs* befinden sich in bestimmten Arealen des KMs (der Stammzellnische) (Trumpp *et al.*, 2010). Kommt es über verschiedenste intrinsische Faktoren zur Aktivierung der *LT-HSC*, so verlässt diese die Stammzellnische, wandert zu den Blutgefäßen und beginnt mit der Teilung. Bei dieser asymmetrischen Teilung entsteht eine neue *LT-HSC* und eine *ST-HSC*. Die *ST-HSC* ist in der Lage über die Differenzierung einer multipotenten Vorläuferzelle (*multipotent progenitor, MPP*) in jede reife Zelle der verschiedenen hämatopoetischen Linien

auszudifferenzieren. Jedoch verliert die *ST-HSC* in diesem Prozess die Fähigkeit sich selbst zu erneuern (Morrison and Weissman, 1994). Daraufhin folgt ein schrittweiser Prozess über verschiedene Vorläuferzellen bis hin zu den reifen Blutzellen. In der myeloiden Reihe entsteht zunächst ein allgemeiner myeloider Vorläufer (*common myeloid progenitor, CMP*), aus diesem kann sich ein Granulozyt-Monozyt-Vorläufer (*granulocyte monocyte progenitor, GMP*) oder ein Megakaryozyt-Erythrozyt-Vorläufer (*megakaryocyte erythrocyte progenitor, MEP*) entwickeln. Diese Vorläuferzellen differenzieren entweder zu Erythrozyten, Thrombozyten oder Makrophagen und Granulozyten. In der lymphatischen Reihe entwickelt sich zuerst ein lymphatischer multipotenter Vorläufer (*lymphoid multipotent progenitor, LMPP*). Aus diesem kann ein allgemeiner lymphatischer Vorläufer (*common lymphoid progenitor, CLP*) entstehen, aus dem wiederum die Vorläuferzellen der lymphatischen Zellen (B- und T-Zellen) und der natürlichen Killerzellen hervorgehen. Die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass auch LMPPs in der Lage sind sich in *GMPs* zu differenzieren, allerdings kommt es hierbei zu einer verminderten Kapazität, Megakaryozyten oder Erythrozyten zu bilden (Kondo *et al.*, 1997; Akashi *et al.*, 2000; Christensen and Weissman, 2001; Adolfsson *et al.*, 2005; Pronk *et al.*, 2007). Wie bereits erwähnt, ist die Stammzellnische mit ihren Stromazellen der Dreh- und Angelpunkt, der über das Gleichgewicht und die Balance zwischen Differenzierung, Proliferation und Selbsterneuerung der *HSCs* bestimmt (Trumpp *et al.*, 2010). Die Stammzellnische mit den Osteoblasten und Osteoklasten ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Funktion der *HSCs* und steuert über Zytokine, Wachstumsfaktoren, Sauerstoffversorgung und Nährstoffe die Aufrechterhaltung ihrer Stammzeleigenschaften (Wilson and Trumpp, 2006; Suda *et al.*, 2011; Smith and Calvi, 2013).





**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Hämatopoese.** Die hämatopoetische Stammzelle (HSC) teilt sich. Nach der Teilung differenziert eine Tochterzelle zur multipotenten Vorläuferzelle (MPP) aus. Die MPP kann in jede Vorläuferzelle der verschiedenen Linien ausdifferenzieren. Sie kann über die multipotente lymphatische Vorläuferzelle (LMPP) über die allgemeine lymphatische Vorläuferzelle (CLP) hin zu T-Zellen, B-Zellen und natürlichen Killerzellen (NK) ausdifferenzieren. Über den Granulozyten-Monozyten-Vorläufer (GMP) können sich Makrophagen und Granulozyten entwickeln. Des Weiteren kann die multipotenten Vorläuferzelle (MPP) sich auch über den Megakaryozyt-Erythrozyt-Vorläufer (MEP) zu Megakaryozyten und Erythrozyten entwickeln. Abbildung modifiziert nach Welinder et al. 2011 (Welinder and Murre, 2011). (Abkürzungen siehe Text oder Abkürzungsverzeichnis).

#### 4.2 Myelodysplastisches Syndrom und akute myeloische Leukämie

Beim myelodysplastischen Syndrom (MDS) handelt es sich um eine Erkrankung des KMs, der eine Funktionsstörung der hämatopoetischen Stammzelle zu Grunde liegt (Aul *et al.*, 2010). Demnach werden weniger reife Blutzellen gebildet. Patienten leiden an einer Anämie, Thrombozytopenie, seltener auch an einer Leukopenie oder aber an einer Panzytopenie (Hamblin, 1992). Das MDS kann in vielen Fällen (33%) eine Vorstufe einer malignen Erkrankung, der akuten myeloischen Leukämie, darstellen (Barzi and Sekeres, 2010).

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist die häufigst auftretende myeloische Leukämie bei Erwachsenen (80-90%) (Ehninger *et al.*, 2008). Die Anzahl der Neuerkrankungen in Deutschland liegt bei ca. 3600 Fällen pro Jahr (Hellenbrecht *et al.*, 2003). Für Männer beträgt die Inzidenz der AML ca. 4,3/100000 und für Frauen 2,9/100000. Das mediane Alter bei der Diagnose der Patienten liegt bei 67 Jahren und die AML-Inzidenz steigt mit zunehmendem Alter (Horner *et al.*, 2009). Obwohl es

in den letzten Jahren viele diagnostische und therapeutische Fortschritte gab, ist die AML in vielen Fällen immer noch unheilbar. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt aktuell bei 20-40% (Ries *et al.*, 1975; Roumier and Cheok, 2009). Das Alter der Patienten spielt eine wesentliche Rolle bei der Überlebensrate. Bei jüngeren Patienten beträgt die 5-Jahre-Überlebensrate noch 45-50% (Gatta *et al.*, 2005; Roumier and Cheok, 2009) (Smith *et al.*, 2004) bei 45-54-Jährigen sinkt diese bereits auf 26% ab und bei über 75-Jährigen beträgt diese nur noch 2% (Ries *et al.*, 1975). Grund für die schlechtere Überlebensrate älterer Patienten ist unter anderem die größere Anzahl an genetischen Aberrationen aber vor allem auch die Tatsache, dass ältere Patienten aufgrund ihres oft schlechteren Allgemeinzustandes eine nicht so intensive Therapie erhalten können, wie jüngere Patienten (Smith *et al.*, 2004). Diese Gegebenheit verdeutlicht die Notwendigkeit neuer diagnostischer und therapeutischer Strategien in der AML.

Bei der AML handelt es sich um eine heterogene, maligne Erkrankung des blutbildenden Systems. Die hämatopoetischen Vorläuferzellen der myeloiden Reihe verlieren die Fähigkeit in reife Blutzellen auszudifferenzieren und in Folge dessen kommt es zu einem Differenzierungsblock (Estey and Dohner, 2006; Dohner *et al.*, 2010). Des Weiteren kommt es zu einer Ansammlung unreifer und funktionsunfähiger Vorläuferzellen im KM, den sogenannten "Blasten" (Lowenberg *et al.*, 1999). Blasten entwickeln sich aus der sogenannten leukämischen Stammzelle (*leucemic stem cell* = LSC). LSCs können durch maligne Transformationen aus HSCs, LMPPs, CMPs oder GMPs hervorgehen (Goardon *et al.*, 2011). Charakterisiert wird eine AML durch das Vorhandensein von mindestens 20% Blasten im KM (Dohner *et al.*, 2010). Durch den Differenzierungsblock und die leukämischen Infiltrationen entwickeln die Patienten Anämien, Thrombopenien und Granulozytopenien. Diese Zytopenien beeinträchtigen das Immunsystem, den Sauerstofftransport im Blut und den Gerinnungsapparat. Dabei kommt es zu Symptomen wie Müdigkeit, Kurzatmigkeit, vermehrten Blutungen (Hämatomen), Infektionen und Fieber. Darüber hinaus kann es zur Infiltration von Blasten in andere Organe wie der Leber (Hepatomegalie), der Milz (Splénomegalie), der Haut, des Zahnfleisches, des zentralen Nervensystems und der Lymphknoten (Lymphadenopathie) kommen. In manchen Fällen kommt es auch zu einer Hyperleukozytose (mehr als 100000 Leukozyten/ $\mu$ l) und dies führt zu einer Leukostase, was wiederum weitere Symptome nach sich zieht (Lowenberg *et al.*, 1999; Gong *et al.*, 2014).

Um eine möglichst effiziente Therapie zu veranlassen, muss die AML von anderen Leukämien wie der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) oder dem MDS abgegrenzt werden. Hier zu ist eine genaue Klassifikation der vorliegenden Erkrankung, sowie der vorliegenden genetischen Veränderungen zwingend notwendig. Die meist genutzte Klassifikation ist die *French-American-British* (FAB)-Klassifikation. Diese Klassifikation unterteilt die AML in neun verschiedene Subtypen, welche anhand von histochemischen Färbungen, Morphologie, Gentranslokationen und Chromosomenabberationen in den Blasten erstellt wurden (Bennett *et al.*, 1985; Bennett *et al.*, 1991). Ursächlich für die maligne Transformation von *HSCs* oder anderen Vorläuferzellen hin zu den *LSCs* und den Blasten ist eine genetische Alteration, gefolgt von klonaler Proliferation. Eben dies kann zu einer veränderten Proliferation der Blutzellen oder Blasten oder auch zu einer Veränderung der Differenzierung und der Apoptoserate führen.

Bei den Mutationen lassen sich zwei Klassen unterscheiden. Die erste Klasse beschreibt die Aktivierung von Signaltransduktionswegen, die in den hämatopoetischen Zellen zu einem Proliferationsvorteil führen. Dazu gehören die Rezeptortyrosinkinasen *cKIT* und *FLT3* oder *RAS* (Gilliland and Griffin, 2002). Die zweite Klasse wird definiert über das Vorhandensein von chromosomalen Abberationen wie *inv(16)*, *t(8;21)* oder *t(15;17)* was zu der Translation von Onkofusionsproteinen wie *CEBPβ/MYH11*, *AML1/ETO* oder *PML/RARα* führt und die Differenzierung der hämatopoetischen Zellen inhibiert. Auch die Überexpression von *HOX*-Genen kann dieser Klasse II zugeordnet werden (Rubnitz *et al.*, 2010). Verschiedene Publikationen zeigen, dass oft beide Mutationsklassen für die Entstehung und Progression einer AML vorliegen müssen (Kelly and Gilliland, 2002; Care *et al.*, 2003; Valk *et al.*, 2004; Cammenga *et al.*, 2005; Frohling *et al.*, 2005; Schnittger *et al.*, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass der Ursprung einer *t(8;21)* oder *inv(16)*-AML häufig mit Mutationen im *c-KIT*-Gen oder mit *FLT3*-Aberrationen einhergehen (Yokota *et al.*, 1997; Valk *et al.*, 2004; Schnittger *et al.*, 2006).

Außerdem stellte sich in den letzten Jahren heraus, dass auch epigenetische Veränderungen (Steidl *et al.*, 2007; Bejar *et al.*, 2011) und Mutationen oder veränderte Expressionslevel von Transkriptionsfaktoren (Rosenbauer *et al.*, 2004; Steidl *et al.*, 2007; Celton *et al.*, 2014; van Riel and Rosenbauer, 2014) wie *RUNX1*, *PU.1*, *BMI-1*, *CEBPA* und *GFI1* (Lessard and Sauvageau, 2003; Bullinger *et al.*, 2004; Steidl *et al.*, 2007; Kuo *et al.*, 2009; Hones *et al.*, 2016) zur Entstehung und Progression einer AML führen können.

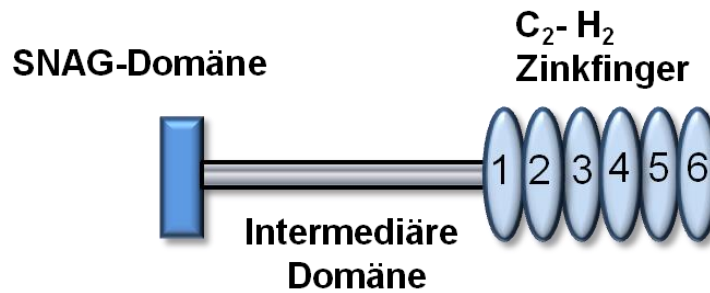
### **4.3 Der Transkriptionsfaktor *Growth Faktor Independence 1 (GFI1)***

Wie oben beschrieben, ist die Hämatopoese ein vielschrittiger und hochregulierter Prozess. Unter anderem sorgen Transkriptionsfaktoren für das Gleichgewicht zwischen Differenzierung, Proliferation und Selbsterneuerung der HSCs (Shivdasani and Orkin, 1996; Trumpp *et al.*, 2010). Der Transkriptionsfaktor Growth Factor Independence 1 (GFI1) spielt eine bedeutende Rolle in der Hämatopoese. GFI1 ist ein Zinkfingerprotein und wurde bereits 1993 von Gilks *et al.* beschrieben. Gfi1 wurde als Zielgen des *Moloney murine leukemia virus*, das die Progression der T-Zellleukämie beeinflusst, identifiziert (Gilks *et al.*, 1993). Wenige Jahre später wurde das *Gfi1*-Gen als eines der meist frequentierten aktivierten Gene in T-Zelllymphomen von retroviral infizierten *Pim-1*- oder *Myc*-transgenen Mäusen identifiziert (Schmidt *et al.*, 1996; Zornig *et al.*, 1996; Scheijen *et al.*, 1997).

GFI1 spielt nicht nur eine Rolle in hämatopoetischen Geweben. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Gfi1 essentiell für die Entwicklung von Haarzellen im Innenohr ist (Fiolka *et al.*, 2006; Kazanjian *et al.*, 2006). Weiterhin spielt GFI1 eine wesentliche Rolle bei der Kontrolle der Differenzierung sekretorischer Zellen im Darm (Shroyer *et al.*, 2005). Kazanjian *et al.* zeigten, dass eine Überexpression von GFI1 in Lungenkarzinomzellen zur Tumorbildung in Mäusen führt (Kazanjian *et al.*, 2004)

#### **4.3.1 Struktur von GFI1/Gfi1**

Das *Gfi1*-Gen kodiert ein 422 Aminosäuren großes Protein mit einer Molekularenmasse von 55 kDa (Zeng *et al.*, 2004; van der Meer *et al.*, 2010). Das GFI1-Protein lässt sich in drei Abschnitte unterteilen. Am N-Terminus befindet sich eine kleine konservierte Domäne, die sogenannte SNAG-Domäne (Snail/Gfi1) (Grimes *et al.*, 1996; Zweidler-Mckay *et al.*, 1996). Diese Domäne ist wichtig für die Repressorfunktion von Gfi1, denn sie rekrutiert histonmodifizierende Enzyme (Saleque *et al.*, 2007). Am C-Terminus befinden sich sechs C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger, wobei die Zinkfinger 3-5 wichtig für die DNA-Bindung sind (Gilks *et al.*, 1993; Zweidler-Mckay *et al.*, 1996). Zwischen diesen beiden Domänen befindet sich eine intermediale Domäne, welche Bindungen mit anderen Proteinen eingehen kann (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des Transkriptionsfaktors GFI1.** GFI1 ist ein 422 Aminosäuren großes Protein und lässt sich in drei verschiedene Domänen unterteilen. Am N-Terminus befindet sich die SNAG-Domäne, welche essentiell für die Rekrutierung von histonmodifizierenden Enzymen ist. Am C-Terminus befinden sich sechs C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger, wobei die Zinkfinger 3-5 wichtig für die DNA-Bindung sind. Zwischen den beiden Domänen befindet sich eine intermediäre Domäne, welche ebenfalls für die Interaktion mit weiteren Proteinen verantwortlich ist.

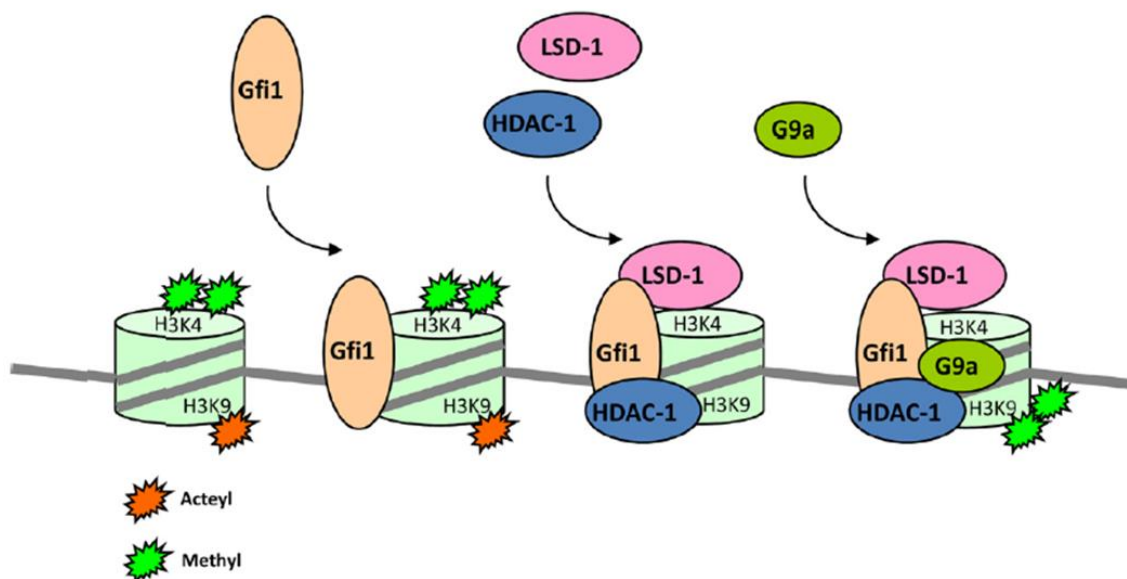
#### 4.3.2 Funktion von GFI1/Gfi1

Das GFI1-Protein agiert als Transkriptionsrepressor indem es mit histonmodifizierenden Enzymen interagiert (Zweidler-Mckay *et al.*, 1996; Duan *et al.*, 2005). GFI1 und die histonmodifizierenden Enzyme binden aneinander und bilden einen Proteinkomplex. Durch definierte Bindungsstellen kommt es zur Bindung dieses Proteinkomplexes an definierte Zielgenpromotoren, was dann zu einer Inhibierung der Transkription führt. Zwei histonmodifizierende Enzyme, die von GFI1 rekrutiert werden, sind der Histondemethylase-Komplex LSD-1/CoRest und der Histondeacetylase-Komplex HDAC-1, -2, und -3 (Zweidler-Mckay *et al.*, 1996; Duan *et al.*, 2005).

LSD-1/CoRest entfernt Methylgruppen vom N-Terminus des Lysins 4 des Histons 3 (H3K4). HDAC-1, -2, -3 hingegen entfernt Acetylgruppen am Lysin 9 des Histons 3 (H3K9). Diese chemischen Veränderungen an den Histonen führen zu einer Transkriptionsrepression (Zweidler-Mckay *et al.*, 1996; Duan *et al.*, 2005; Saleque *et al.*, 2007). Des Weiteren ist bekannt, dass Gfi1 auch mit der Methyltransferase G9a interagiert. G9a dimethyliert das Histon 3 an Lysin 9 (H3K9), was zu einer Rekrutierung des Proteins HP-1 und somit zur Entstehung von Heterochromatin führt (Duan *et al.*, 2005; Saleque *et al.*, 2007) (Abbildung 3).

Es ist bekannt, dass Gfi1 in HSCs und multipotenten Vorläuferzellen exprimiert wird (Hock *et al.*, 2004; Zeng *et al.*, 2004). Gfi1 hält die Quieszenz der Stammzellen

aufrecht, hemmt deren Proliferation und schützt diese vor stressinduzierter Apoptose, indem es mit p53 interagiert (Hock *et al.*, 2004; Zeng *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2009). Die *Gfi1*-Expression nimmt schrittweise in der Differenzierung von den HSCs hin zu den Vorläuferzellen zu (Khandanpour *et al.*, 2010). *Gfi1* wird unter anderem auch in den *GMPs*, in Monozyten und Granulozyten, aber auch in den *CLPs* und *ETPs* (*early T-cell precursor*) exprimiert (Yucel *et al.*, 2004). Somit übernimmt *Gfi1* eine wichtige Rolle in der Entstehung/Bildung von B- und T-Lymphozyten und in der Entstehung von Granulozyten. *GFI1* interagiert auch mit dem Protein *PIAS3*. *PIAS3* bindet an die aktivierte Form von *STAT3* und steigert dadurch die *STAT3*-Aktivität. *Gfi1* ist in der Lage *STAT3* von *PIAS3* zu lösen, was in einer verbesserten *STAT3*-Antwort resultiert (Rodel *et al.*, 2000). Da *STAT3* durch Cytokine wie *IL-2*, *IL-6*, *IL-10* oder dem *granulocyte-colony stimulating factor* (*G-CSF*) aktiviert wird, spielt *GFI1/Gfi1* eine wichtige Rolle in cytokin-medierten Signalwegen.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der biochemischen Funktion von *Gfi1*.** *Gfi1* rekrutiert histonmodifizierende Enzyme, wie *HDAC-1*, *LSD-1* und *G9a* zur DNA. Dies führt zur Demethylierung am Lysin 4 des Histons 3 (*H3K4*), zur Deacetylierung an Lysin 9 (*H3K9*) und zur Methylierung am Lysin 9 des Histons 3 (*H3K9*). (Moroy and Khandanpour, 2011).

#### 4.3.3 Die Rolle von *GFI1/Gfi1* in der Neutropenie und der AML

Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen von *GFI1/Gfi1* zu einer schweren kongenitalen Neutropenie (*severe congenital neutropenia*, *SCN*) führen (Person *et al.*, 2003). *Gfi1* reguliert die Entwicklung zwischen Granulozyten und

Monozyten/Makrophagen. Hierbei ist Gfi1 der Antagonist zum Transkriptionsfaktor PU.1. Während Gfi1 die Differenzierung von Granulozyten erhöht, steigert PU.1 die Entwicklung von Monozyten. Zum einen konkurrieren die Transkriptionsfaktoren um die Promotorstellen ihrer Zielgene und inhibieren sich so gegenseitig. Zum anderen ist Gfi1 aber auch in der Lage PU.1 direkt zu inhibieren. PU.1 hingegen steigert die Expression anderer Transkriptionsfaktoren, welche die Genexpression von *Gfi1* inhibieren (Laslo *et al.*, 2006; Spooner *et al.*, 2009). Somit erklärt der Verlust von GFI1 in SCN-Patienten die Neutropenie, da die Differenzierung der HSCs in Richtung der Monozyten und Makrophagen gelenkt wird.

Des Weiteren werden auch Gene exprimiert, die normalerweise durch die Anwesenheit von Gfi1 reprimiert werden. Hier wäre das Gen *ELA2* zu nennen. *ELA2* ist ein GFI1-Zielgen und kodiert für die Neutrophilelastase (Person *et al.*, 2003; Salipante *et al.*, 2009). Bei SCN-Patienten, die nicht die typische Mutation im *ELA2*-Gen aufwiesen, zeigten sich dennoch erhöhte Neutrophilelastaselevel im peripheren Blut. Auffällig war, dass diese Patienten eine Mutation im *GFI1*-Gen hatten (Person *et al.*, 2003). Ein weiteres GFI1-Zielgen ist Id2 (Inhibitor of DNA 2). Ein Verlust von GFI1 (GFI1-Knock out = GFI1-KO) führt zur Erhöhung von Id2 und resultiert in einer Expansion von unreifen myeloischen Zellen (Li *et al.*, 2010).

Weitere Publikationen zeigen, dass Gfi1 direkt *HOXA9*-Gene reprimieren kann. Demnach führt der Verlust von Gfi1 zu einer Überexpression von *HOXA9* und dies verstärkt die Progression myeloischer Krankheiten in Mäusen (Kroon *et al.*, 1998; Thorsteinsdottir *et al.*, 2002). Huh *et al.* (2009) untersuchten MDS Patienten hinsichtlich der *GFI1*-Expression im KM. Es konnte gezeigt werden, dass die *GFI1*-Expression bei Patienten mit Blasten und mit normalem Karyotyp im Gegensatz zu Patienten mit gutartigem Verlauf verringert war (Huh *et al.*, 2009). Verschiedene Expressionen von *GFI1* konnten auch in verschiedenen Subtypen der humanen AML detektiert werden (Valk *et al.*, 2004). Mäuse, die kein *Gfi1* exprimieren (*Gfi1*-KO-Mäuse) zeigen im KM eine starke Proliferationsrate von myeloiden Vorläuferzellen, die in ihrer Differenzierung geblockt sind. Dies sind typische Charakteristika für eine AML (Dohner *et al.*, 2010). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine Variante von *GFI1* (GFI1<sup>36N</sup>) für die Entstehung einer AML prädisponiert ist. Bei dieser Variante ist die Aminosäure Serin an der Position 36 durch ein Asparagin ausgetauscht. Dieser Einzelnukleotid-Polymorphismus und der dadurch bedingte Aminosäureaustausch verändert die Lokalisation des Proteins im Kern, wodurch GFI1<sup>36N</sup> nicht mehr in der Lage ist, an seine Zielgene zu binden. Dies führt zu epigenetischen Veränderungen

im HOXA9-Locus und zu einer Funktionsstörung im KM von Mäusen (Khandanpour *et al.*, 2010; Khandanpour *et al.*, 2012).

#### **4.4 Epigenetische Modifikationen und ihre Rolle in der Krebsentstehung**

Für die normale Entwicklung und Erhaltung der Genexpressionsmuster in Säugetieren sind epigenetische Mechanismen unabdingbar. Ein multizellulärer Organismus besteht aus vielen verschiedenen Zellarten, die verschiedenste Funktionen übernehmen. Obwohl alle diese Zellen die gleiche Erbinformation haben, differenzieren sie zu unterschiedlichen Arten von Zellen aus, da sie verschiedene RNA- und Proteinmoleküle synthetisieren. Dies wird unter anderem über die Veränderung der Chromatinstruktur der DNA und der daraus resultierenden Genexpression gesteuert. Epigenetische Modifikationen wie die Methylierung von Cytosinbasen, die posttranslationale Modifikation der Histone oder das Positionieren von Nukleosomen entlang der DNA spielen dabei eine wichtige Rolle. Erst das Zusammenspiel dieser komplexen Mechanismen ermöglicht eine solche Zelldiversität in einem multizellulären Organismus.

Defekte in der epigenetischen Modifikation des Chromatins können zur fehlerhaften Aktivierung oder aber zur Inhibierung von Signalwegen führen. Solche Abweichungen können zu nicht physiologischen Veränderungen und zu Krebs führen (Jones and Baylin, 2002; Egger *et al.*, 2004). Verschiedene Studien konnten bisher zeigen, dass es neben Mutationen und genetischen Veränderungen auch zahlreiche epigenetische Abnormalitäten in humanen Krebszellen gibt (Jones and Baylin, 2002; Jones and Baylin, 2007).

Im Folgenden sollen die DNA-Methylierung und die Histonmodifikation als zwei der epigenetischen Mechanismen und ihre Rolle in der Krebsentstehung genauer betrachtet werden. Die DNA bildet in den Zellen einen Komplex mit sogenannten Histonen. Dieser Komplex wird als Nukleosom bezeichnet. Ein Nukleosom besteht aus etwa 146 Basenpaaren der DNA, welche um einen Oktamer bestehend aus den vier Histonproteinen (H3, H4, H2A und H2B) gewickelt ist. Die Aufeinanderfolge mehrerer Nukleosomkomplexe wird als Chromatin bezeichnet (Luger *et al.*, 1997). Epigenetische Mechanismen führen zur Umstrukturierung der Chromatinstruktur und bewirken somit das "Stummschalten" von Genen oder deren Aktivierung. Bei der DNA-Methylierung handelt es sich um die Methylierung von Cytosinresten an



Cytosin- und Guanosin-reichen DNA-Abschnitten (Bird, 2002; Takai and Jones, 2002). Die DNA-Methylierung kann die Expression von Genen inhibieren, indem sie die Rekrutierung von regulatorischen Proteinen zur DNA verhindert oder begünstigt. Auf der einen Seite können zum Beispiel Transkriptionsfaktoren daran gehindert werden, an ihre Zielsequenzen zu binden (Watt and Molloy, 1988) auf der anderen Seite kann es zur Bereitstellung von Methylbindestellen für methylbindende Proteine führen. Diese können wiederum mit Histondeacetylasen (HDACs) interagieren und somit zur Repression eines Gens führen (Jones *et al.*, 1998).

Anders als bei der DNA-Methylierung, können Histonmodifikationen zur Aktivierung oder zur Reprimierung/Repression von Genen führen. Es ist bekannt, dass die Lysin-Acetylierung mit der transkriptionellen Aktivierung korreliert (Hebbes *et al.*, 1988; Kouzarides, 2007) und die Lysin-Methylierung entweder mit der Aktivierung oder der Reprimierung der Transkription einhergeht. Dies ist abhängig vom Methylierungsgrad und der Lokalisation der Methylierung (Liang *et al.*, 2004; Kouzarides, 2007). Histonmodifikationen werden von bestimmten Enzymen reguliert. Histon-Acetyltransferasen (HATs) und Histon-Methyltransferasen (HMTs) acetylieren oder methylieren die Histone, wobei Histondeacetylasen (HDACs) und Histon-Demethylasen (HDMs) Acetyl- oder Methylgruppen entfernen (Shi, 2007; Haberland *et al.*, 2009).

Es konnte gezeigt werden, dass epigenetische Veränderungen eine wichtige Rolle in der Krebsentstehung und Progression spielen (Jones *et al.*, 1998; Jones and Baylin, 2002). Die Dysregulation des genetischen Expressionsmusters kann zur Inhibierung der Expression von Tumorsuppressorgenen oder zur Aktivierung von Onkogenen führen. Wie bereits erwähnt führt die Deacetylierung durch HDACs zu einer Reprimierung von Genen. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass HDACs in verschiedenen Krebsarten überexprimiert werden (Halkidou *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2005). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass onkogene Fusionsgene durch chromosomale Translokationen von HAT und HAT-zugehörigen Genen eine Rolle in der Leukämieentwicklung spielen (Yang, 2004).

Da epigenetische Modifikationen durch die Gabe von betreffenden Inhibitoren reversibel gemacht werden können, eröffnet dies einen neuen therapeutischen Ansatz in der Krebsbehandlung.

#### 4.5 Vorinostat und CTK7a

Wie bereits oben beschrieben, spielen epigenetische Veränderungen eine wichtige Rolle in der Krebsentstehung und Manifestation (Sharma *et al.*, 2010). Deshalb gewinnt die gezielte Inhibierung von Genen, die solche epigenetischen Modifikationen beeinflussen und kontrollieren, immer mehr an Bedeutung (Egger *et al.*, 2004). Unter anderem identifizierten Duvic *et al.* (2007) Alterationen sowohl in HDACs, als auch in HATs in soliden und hämatologischen Tumoren (Duvic *et al.*, 2007). Eine gezielte Inhibierung der HDACs und HATs durch Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi) und Histonacetyltransferase-Inhibitoren (HATi) könnten die epigenetischen Veränderungen revertieren und somit die Heilungschancen erhöhen. Der HDACi Vorinostat (*superoylanilide hydroxamic acid*, SAHA) ist ein Klasse I, II HDACi und wird seit einigen Jahren in der Klinik zur Behandlung von MDS und kutanen T-Zell Lymphomen eingesetzt (Duvic *et al.*, 2007; Garcia-Manero, 2008). Des Weiteren wird Vorinostat in präklinischen Versuchen von Leukämien getestet (Garcia-Manero *et al.*, 2008). Vorinostat induziert einen Wachstumsarrest, die Differenzierung und die Apoptose in Tumorzellen. Gesunde Zellen sind weniger sensitiv für Vorinostat (Finnin *et al.*, 1999; Kelly and Marks, 2005).

Die Anwesenheit des HDACi führt zu einer Hyperacetylierung der Histone. Diese akkumulieren und die DNA-Kondensierung wird vermindert, was wiederum zu einer transkriptionellen Aktivierung verschiedener Gene führt (Grant *et al.*, 2007). Ein betroffenes Gen ist beispielsweise der Tumor-Suppressor p21<sup>WAF1</sup>, dessen Expression zur Inhibierung der Zellproliferation führt (Richon *et al.*, 2000). Unter anderem werden auch Gene, welche die Apoptose (wie zum Beispiel Bcl-2) oder Gene, welche die Proliferation und den Zelltod beeinflussen, aktiviert (Peart *et al.*, 2005; Marks, 2007).

CTK7a ist ein wasserlösliches Derivat von Curcumin und fungiert als HATi (Arif *et al.*, 2010). CTK7a inhibiert spezifisch die HAT-Aktivität von p300/CBP (*CREB-binding protein*). p300/CBP ist ein Transkriptionscoaktivator und spielt eine wichtige Rolle in der Zellproliferation, Apoptose, Zellzykluskontrolle und der Differenzierung (Giordano and Avantaggiati, 1999; Debes *et al.*, 2003). Eine Überexpression von p300/CBP konnte in einer Vielzahl von Krebsarten nachgewiesen werden. Demnach wird CTK7a derzeit zur Behandlung von Rachen-, Prostata-, Brust- und Leberkrebs eingesetzt und in weiteren Krebsarten getestet (Arif *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2015).

## **5 Zielsetzung**

Der Transkriptionsfaktor GFI1/Gfi1 spielt eine essentielle Rolle in der Hämatopoese. Er induziert die Differenzierung von B- und T-Lymphozyten und Granulozyten (Yucel *et al.*, 2004; Kazanjian *et al.*, 2006; Spooner *et al.*, 2009). Khandanpour *et al.* zeigten, dass Gfi1 als ein wichtiger Faktor in der Entstehung der ALL fungiert, indem der Transkriptionsfaktor der p53-medierte Apoptose entgegenwirkt (Khandanpour *et al.*, 2013). Erste unveröffentlichte Daten ließen darauf schließen, dass geringe *GFI1*-Expressionslevel eine AML-Entwicklung in MDS-Patienten begünstigen.

Demzufolge sollte in der vorliegenden Doktorarbeit die Rolle verschiedener *GFI1/Gfi1*-Expressionslevel und deren Auswirkung auf die normale Hämatopoese als auch auf die AML-Entwicklung und Manifestation untersucht werden. Dies sollte zum einen in verschiedenen AML-Patienten-Kohorten als auch in verschiedenen AML-Mausmodellen analysiert werden. Zusätzlich sollte versucht werden, den Mechanismus der zu eventuellen Unterschieden bezüglich der AML-Progression führt, auf epigenetischer Ebene genauer zu untersuchen.

Da bekannt ist, dass GFI1/Gfi1 histonmodifizierende Enzyme rekrutiert (Zweidler-Mckay *et al.*, 1996; Duan *et al.*, 2005), sollten HAT- und HDAC-Inhibitoren sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bei verschiedenen *GFI1/Gfi1*-Expressionsleveln getestet werden.

## 6 Materialien und Methoden

### 6.1 Material

#### 6.1.1 Chemikalien

**Tabelle 1: Liste der verwendeten Reagenzien und Chemikalien**

Reagenzien und Chemikalien	Herkunft
Agarose Nusieve	Lonza, Basel, Schweiz
Agarose Ultrapure	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Ampuwa	Braun, Ecotainer, Melsungen, Deutschland
10x Sample Reducing Agent	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
10x PBS	Ambion, Life technologies, Darmstadt, Deutschland
4-12% Bis-Tris NuPage Gels (#NP0326BOX)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
4x LDS Sample Buffer (#NP0008)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom (U.K.)
Amersham Hyperfilms	GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom (U.K.)
Ampicillin Sodium Salt	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.
Annexin V Binding Buffer	BD Biosciences, Franklin Lakes, United States of America (U.S.A.)
APC Annexin V antibody (#640920)	BioLegend, San Diego, U.S.A.
Baytril	Bayer, Leverkusen, Deutschland
BD Pharm Lyse™ lysing solution	BD Biosciences, Franklin Lakes, U.S.A.
BSA	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
CaCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.
Collagenase	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
cOmplete™ Mini EDTA-free protease inh. cocktail tablets	Roche, Basel, Schweiz
COULTER CLENZ® Cleaning Agent	Beckman Coulter, Pasadena, U.S.A.
CTK7a	Merck, Darmstadt, Deutschland
DMEM	Gibco Life Technologies, Carlsbad, U.S.A.
DMEM (1x) + GlutaMAX™-I	Gibco Life Technologies, Carlsbad, U.S.A.
DMSO	Sigma-Aldrich, U.S.A.
dNTPs	Promega, Mannheim, Deutschland
DPBS	Gibco Life Technologies, Carlsbad, U.S.A.
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
FACS Clean	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS Rinse	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FLT3-Ligand human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

## Material und Methoden

FCS	Pan-Biotech, Aidenbach, Deutschland
FORENE® 100%, active component: Isofluran	AbbVie, North Chicago, U.S.A.
Formaldehyde	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.
Gel Loading Solution	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
GoTaq® Hot Start Polymerase	Promega, Mannheim, Deutschland
Größenstandard N3026: φX174 DNAHaeIII Digest	NEB, Frankfurt am Main, Deutschland
Glycine	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.
HEPES	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.
IMDM	Gibco Life Technologies, Carlsbad, U.S.A.
Leupeptin hemisulfate salt	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.
LiCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.
Magnesiumchlorid	Promega, Mannheim, Deutschland
Marrow Max Bone Marrow Medium	Life Technologists, Carlsbad, Kalifornien, U.S.A.
Mercapthoethanol	BioRad, München, Deutschland
Methocult™ GF M3434 Methylcellulose medium	Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada
Murine IL-3	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Murine IL-6	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Murine SCF	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.
NaCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.
NaHCO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.
Non-fat dried milk powder	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
PCR-Puffer	Promega, Mannheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.
pIpC (Poly(deoxyinosinic-deoxycytidylic) acid	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.
PMSF ≥99%	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.
Polybrene	Merck Millipore, Billerica, U.S.A.
Protein G agarose	Roche, Basel, Switzerland
Proteinase K	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.
RetroNectin	Clonotech, Mountain View, U.S.A.
RLT Buffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
SCF human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
RPMI 1640	Gibco Life Technologies, Carlsbad, U.S.A.
SDS	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.
SeeBlue® Plus2 Protein Standard	Thermo Scientific, Waltham, U.S.A.
Sodium butyrate (NaBu)	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.
Sodium deoxycholate monohydrate	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.
SYBR green	Applied Biosystems, Carlsbad, U.S.A.
Taqman Gene Expression MasterMix	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Tergitol® solution (Type NP-40)	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.
TPO human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.
Trizma® Base (Tris)	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.

Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
TrypLE™ Express	Gibco Life Technologies, Carlsbad, U.S.A.
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.
Vorinostat	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.
Z-Pak™ Balanced Electrolyte Solution	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland

### 6.1.2 Primer

**Tabelle 1: TaqMan Sonden für Real-Time-PCR**

Symbol	Gen	Assay-ID	Hersteller
GFI1	GFI1 human	Hs00382207_m1	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
GAPDH	GAPDH human	Hs02758991_g1	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Gfi1	Gfi1 murin	Mm00515853_m1	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
GAPDH	GAPDH murin	Mm03302249_g1	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

### 6.1.3 Antikörper

**Tabelle 2: Liste der verwendeten Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse**

Spezifität	Konjugat	Clon	Hersteller
B220	PerCP	RA3-6B2	Biolegend
CD4	PerCP	GK1.5	Biolegend
CD8	PE	53-6.7	Biolegend
CD11b	PerCP	M1/70	Biolegend
CD34	PE	RAM34BD	Bioscience
CD45	PE	30-F11	Biolegend
CD45	PerCP	30-F11	Biolegend
cKit	PE	ACK2	Biolegend
cKit	APC	2B8	Biolegend
Gr1	PE	RB6-8C5	Biolegend
Ter119	PE	Ter119	Biolegend
Streptavidin	PerCP-Cyanine5.5	-	Biolegend
Sca1	Biotin	D7	Biolegend
CD16/32	PE/Cy7	93	Biolegend
Annexin V	APC	-	Biolegend
Annexin V	FITC	-	Biolegend

**Tabelle 3: Antikörper für WesternBlot Analyse**

Name	Katalog #	Spezies	Konzentration	Hersteller
α-Gfi-1	G6670	Mouse	1:1000	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.
α-Lamin-B	sc-6216	Goat	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, U.S.A.

#### 6.1.4 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 4: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien**

Artikel	Hersteller
Blunt-End Needles	Stemcell Technologies, Köln, Deutschland
Cell-Coun-Tainer 1 mit Deckel	Ratiolab, Dreieich, Deutschland
Dish 150 x 15mm, non TC Petri 10pac 100cas, BD Falcon	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Einfriergefäße Cryo.s™	Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland
Einfrierkontainer Nalgene® Mr. Frosty	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
FACS-Röhrchen 5ml	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Kanülen 20G	BD Diagnostics, Heidelberg, Deutschland
Kanülen 27G	BD Diagnostics, Heidelberg, Deutschland
MACS®Seperation Columns MS	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
MACS®Seperation Columns LS	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Microtest™ U-Bottom, 96 well	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Mikrozentrifugengefäße 1,5ml	StarLab, Ahrensburg, Deutschland
Mikro-Hämatokrit-Kapillaren, CE, heparinisiert	Hecht-Assistent, Sondheim, Deutschland
Mini-Collect-Blutentnahme-Röhrchen, K3EDTA, 0,25ml	Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland
Mullkompressen	Beese Medical, Barsbüttel, Deutschland
Multiwell™ plate 12 well, Tissue culture treated	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Multiwell™ plate 24 well, Tissue culture treated	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Multiwell™ plate 6 well, Tissue culture treated	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Multiwell™ plate 12 well, Non Tissue culture treated	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Multiwell™ plate 24 well, Non Tissue culture treated	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Multiwell™ plate 6 well, Non Tissue culture treated	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

## Material und Methoden

Neubauer Kammer 0,1mm	Assistent, Sondheim, Deutschland
Objektträger	Engelbrecht, Edermünde, Deutschland
Objektträgerhalter Rotilabo®	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PCR-Streifen, 0,2ml Gefäße und Deckel	Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland
Pipettenspitzen 10, 20, 100, 200, 1000µl	StarLab, Ahrensburg, Deutschland
Spritzen 1ml	Terumo Europe, Belgien
Spritzen 5ml	Terumo Europe, Belgien
Spitzenvorsatzfilter Puradisc 25 AS, steril 0,45 PES	GE Healthcare, Solingen, Deutschland
Stabpipetten	Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland
Zellkulturflaschen, 75cm <sup>2</sup> mit Filtercap	Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland
Zellkulturflaschen, 25cm <sup>2</sup> mit Filtercap	Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland
Zellsieb 40µm, 100µm (Nylon)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen Falcon, 15 ml, steril	Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen Falcon, 50 ml, steril	Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland

### 6.1.5 Puffer

1x TE	10 mM Tris pH 8,0 1 mM EDTA
Zellyse-Puffer	10 mM Tris pH 8,0 10 mM NaCl 0,2% NP40 50 µg/ml PMSF 10 mM NaBu 1µg/ml Leupeptin
Elutions-Puffer	100 mM NaHCO <sub>3</sub> 1% SDS
FACS-Puffer	DPBS +2,5% FCS +1% Penicillin/Streptomycin
HEBS-Puffer	50 mM HEPES 280 mM NaCl 1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
MACS- Puffer	DPBS +2% BSA +1 mM EDTA



Nuclei-Lyse Puffer	50 mM Tris pH 8,1 10 mM EDTA 1% SDS 50 µg/ml PMSF 10 mM NaBu 1 µg/ml Leupeptin
SCM	IMDM +10ng/ml IL-3 +10ng/ml IL-6 +20ng/ml SCF

### 6.1.6 Geräte

**Tabelle 5: Liste der verwendeten Geräte**

Gerät	Hersteller
Analysenwaage ALJ 220-4NM	Kern, Balingen, Deutschland
Autoklav D-65	Systec, Wetzlar, Deutschland
Cellsorter FACSAria II	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Cellsorter FACSDiva	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Durchflusszytometer BD LSR II	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Durchflusszytometer BD FACScan	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Geldokumentationsystem	Biometra, Göttingen, Deutschland
Gelelektrophoresekammer Sub-Cell®GT	BioRAD, München, Deutschland
Hematek	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Hemomat	Biomed, Oberschleißheim, Deutschland
Inkubator	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
Mikroskop BZ-9000	Keyence, Osaka, Japan
Mikroskop CK2	Olympus, Hamburg, Deutschland
Mikroskop DM1000LED	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Photometer plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Präzisionswaage EW 4200-2NM	Kern, Balingen, Deutschland
Rotator Bibby Stuart SB3 Rotator	Bibby Scientific Limited, Staffordshire, U.K.
StepOne Plus Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Sterilbank Laminar Flow	BSH AG, Dettingen, Deutschland
Sysmex XE-2100	Sysmex Europe GmbH, Norderstedt, Deutschland
Thermocycler Flex Cycler	Analytik Jena, Jena, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge Sprout	Heathrow Scientific, Illinois, USA
Vortexer Genius 3	IKA, Staufen, Deutschland
Z2 Coulter Particle Count and Size Analyzer	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Zentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Allegra 6KR	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Zentrifuge Allegra X-15R	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland

Zentrifuge Mikro 200R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Rotanta 460R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland

### 6.1.7 Kits

**Tabelle 6: Liste der verwendeten Kits**

Kits	Hersteller
Advantage® RT for PCR Kit	ClonTech, Heidelberg, Deutschland
Endofree Plasmid Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Lineage Cell Depletion Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
QIAamp DNA Blood Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
MACS Lineage Cell Depletion Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents	Thermo Scientific, Waltham, U.S.A.
One Shot® TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i>	Thermo Scientific, Waltham, U.S.A.
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Waltham, U.S.A.
QIAquick PCR purification Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
SMARTer® PCR cDNA synthesis Kit	Clonotech, Mountain View, U.S.A.
Taqman Assays	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

### 6.1.8 Zelllinien

**Tabelle 7: Verwendete Zelllinien**

Zelllinie	Herkunft
HEK 293 T	humane embryonische Nierenzellen
3T3	primäre Mausfibroblasten
Kasumi	humane akute myeloische Läkämiezellen
K562	humane chronische myeloische Läkämiezellen

### 6.1.9 EDV-Programme

Die Messdaten, die aus der Durchflusszytometrie hervorgegangen sind wurden mit der *FlowJo*-Software (Miltenyi Biotec) ausgewertet. Zur Auswertung der statistischen Daten wurde Microsoft Excel 2007 und GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) genutzt. Die Daten der *Real Time*-qPCR wurden mittels StepOnePlus (Applied Biosystems) ausgewertet.

## **6.2 Methoden**

### **6.2.1 Mäuse**

#### **6.2.1.1 Allgemeines**

Um die Rolle der verschiedenen *Gfi1*-Level im KM und die Auswirkung auf die Progression der AML zu untersuchen, wurden verschiedene Mausmutanten gezüchtet. Der Genotyp wurde mittels Genotypisierungs-PCRs an der genomischen DNA aus den Hautstücken der Ohrlochmarkierungen von drei Wochen alter Mäuse ermittelt. Die Markierung und Genotypisierung wurde vom Zentralen Tierlabor (ZTL) des Universitätsklinikums Essen durchgeführt. Die verwendeten Primer stammten aus Publikationen.

#### **6.2.1.2 C57BL/6-Mäuse / Gfi1-Wild Typ-Mäuse (Gfi1-WT-Mäuse) (C57BL/6OlaHsd) (The Harlan Laboratories)**

Die *Gfi1*-WT-Mäuse sind in ihrem Genotyp nicht verändert. Sie exprimieren das murine *Gfi1* und dienen als Kontrolle. Es wurden C57BL/6-Mäuse verwendet. Diese Mäuse stammen von *The Harlan Laboratories* (Horst, Niederlande) und wurden aus dem ZTL des Universitätsklinikums Essen bezogen.

#### **6.2.1.3 NUP98/HOXD13 (C57BL/6-Tg(Vav1-NUP98/HOXD13)G2Apla/J) (The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA))**

Transgene *NUP98/HOXD13*-Mäuse exprimieren das Fusionsgen des humanen Nukleoporin 98kDa (NUP98) und des humanen Homeobox D13 (HOXD13) Gens. Sie zeigen alle typischen Symptome eines Myelodysplastischen Syndroms (MDS) und entwickeln im späteren Verlauf häufig eine akute myeloische Leukämie (Lin *et al.*, 2005). Diese Mäuse wurden vom Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) bezogen.

#### **6.2.1.4 MLL-AF9-Knock-in-Mäuse (*Kmt2a*<sup>tm2(MLLT3)<sup>Thr</sup></sup>/KsyJ) (The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA))**

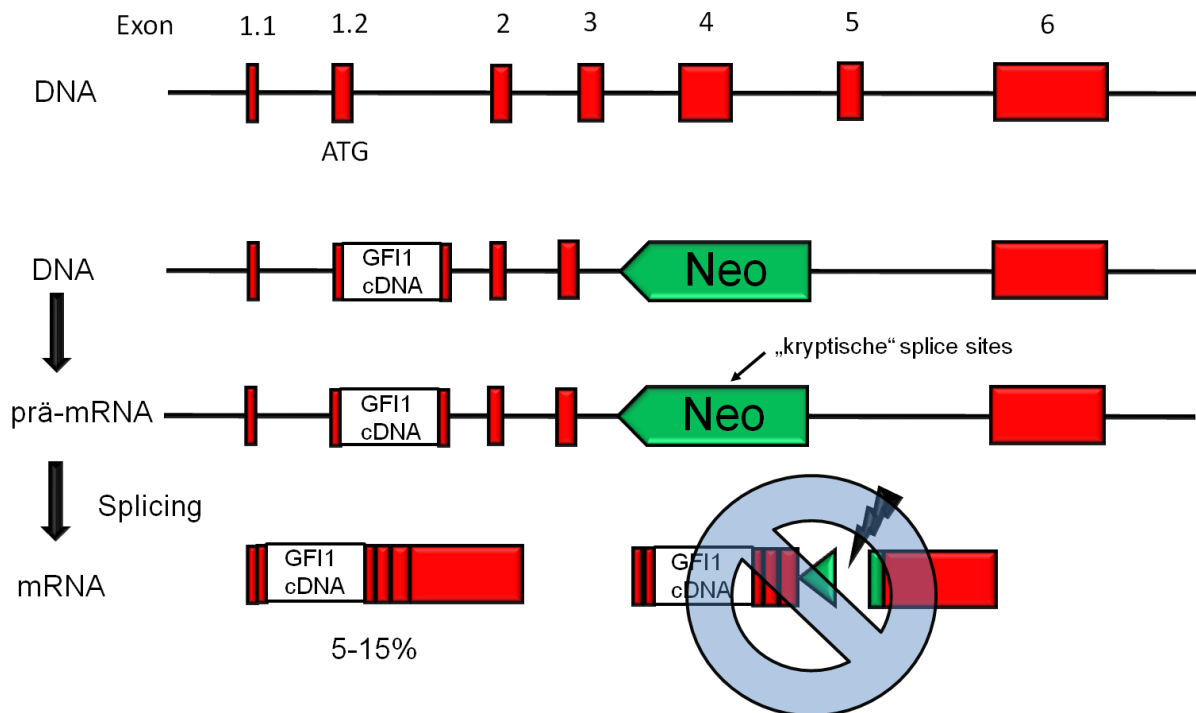
Diese Mäuse sind heterozygot für die Translokation t(9;11)(p22;q23) (MLL-AF9). Im Alter von ca. sechs Monaten rekapitulieren sie eine akute myeloische Leukämie (Johnson *et al.* 2003). Die Mäuse wurden vom Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) bezogen.

### 6.2.1.5 *GFI1*-Knock-in-Mäuse (*GFI1*-KI-Mäuse)

Bei den *GFI1*-KI-Mäusen wurde das murine *Gfi1*-Gen durch das humane *GFI1* ersetzt. Die homozygoten Mäuse exprimieren nun zu 100% das humane *GFI1*-Protein (Khandanpour *et al.*, 2012).

### 6.2.1.6 *GFI1*-Knock down (*GFI1*-KD)

Bei diesem Genotyp wurde eine Neo-Kassette in entgegengesetzter Richtung an das Ende des humanen *GFI1*-Gens eingebaut. Die Neokassette enthält "kryptische" *splice sites*, die das RNA-splicing beeinflussen. Dies reduziert das mRNA-Level des Zielgens und es entsteht ein sogenanntes "hypomorphes" Allel (Holzenberger *et al.*, 2000). Dies führt dazu, dass das *GFI1*-Gen nur noch zwischen 5% bis 15% der üblichen Transkriptionsrate exprimiert wird (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des *GFI1*-KD Maus-Modells.** Die eingestzte Neokassette enthält "kryptische" *splice sites*, die das RNA-splicing beeinflussen können. Dies reduziert das mRNA-Level und führt zu einer verminderten *GFI1*-Proteinexpression (5-15%).

### 6.2.1.7 *GFI1*-Knock-out-Mäuse (*GFI1*-KO-Mäuse)

Bei den *Gfi1*-KO-Mäusen wurde das *Gfi1*-Gen vollständig deletiert. Dazu wurden murine embryonale Stammzellen so manipuliert, dass es zu einem Knock-out des

*Gfi1*-Gens kommt (Karsunky *et al.*, 2002). Diese Mäuse wurden vom Tarik Möröy Labor (IRCM, Montreal, Kanada) bezogen.

### 6.2.1.8 *GFI1*-WT/EGFP-Knock-in-Mäusen (*GFI1*-WT/EGFP-KI)

Bei den *GFI1*-WT/EGFP-KI Mäusen wurde durch homologe Rekombination ein *GFI1*-Allel durch die EGFP-cDNA ersetzt (Yucel *et al.* 2004). Dies führt dazu, dass diese Mäuse weniger *GFI1* als *GFI1*-KI-Mäuse exprimieren und die *GFI1*-Promotoraktivität beobachtet werden kann. Diese Mäuse wurden vom Tarik Möröy Labor (IRCM, Montreal, Kanada) bezogen.

### 6.2.1.9 *Gfi1*-flox -*Mxcre*-Mäuse

Bei den *Gfi1*-flox-Mäusen handelt es sich um Mäuse bei denen ein konditionaler Knock-out des *Gfi1*-Gens durch Gabe von plpC und der damit verbundenen Aktivierung der Cre-Rekombinase induziert werden kann. Diese Mäuse besitzen zwei loxP-Stellen zwischen Exon 4 und Exon 5 des *Gfi1* Gens. Die Deletion dieser Exone führt zu einer Verlagerung im Leserahmen und dies hat zur Folge, dass das *Gfi1*-Gen nicht mehr exprimiert wird (Zhu *et al.* 2006). Die Mäuse wurden vom William E. Paul Labor (Bethesda, Maryland, USA) bezogen.

### 6.2.1.10 *CBFB-MYH11*-*Mxcre*-Mäuse

Diese Mäuse sind durch konditionelle Aktivierung transgen für die Inversion 16 (inv(16)(p13q22)) (Castilla *et al.*, 1999; Kuo *et al.*, 2006). Diese Inversion tritt bei 10% aller *de novo* AML-Erkrankungen auf (Claxton *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1996) und resultiert in der Genfusion von *CBFB-MYH11*. In diesem Mausmodell sind die *Cbfb* Exons 5 und 6 durch loxP-Seiten flankiert und zwischen eine *Msc1*-Seite in Intron 4 integriert. Unter normalen Bedingungen wird das wild-typ *Cbfb*-Transkript exprimiert. Aber mittels Aktivierung der Cre-Rekombinase durch plpC-Injektion wird das knock-in Allel entfernt und die Expression von *CBFB-MYH11* aktiviert (Kuo *et al.*, 2006). Die Mäuse wurden uns vom Castilla Labor (Worcester, Massachusetts, USA) zur Verfügung gestellt.

### **6.2.2 Haltung von Mäusen**

Alle verwendeten Mäuse wurden unter SPF (spezifisch Pathogen frei) -Bedingungen und kontrollierten Umweltbedingungen (22+/-2°C Temperatur, 55+/-5% Luftfeuchtigkeit, 12-stündiger Tag-Nacht-Rhythmus) in Makrolon-IVC-Käfigen im ZTL des Universitätsklinikums Essen gezüchtet und gehalten. Im Alter von drei Wochen wurden die Jungtiere durch das ZTL genotypisiert und markiert.

### **6.2.3 Isolation von Knochenmark- und Milzzellen**

Nach Euthanasie der Mäuse wurde nach Feststellung des Todes, durch Kornealreflex- und Zwischenzehenreflexprüfung, Humerus, Femur und Tibia herauspräpariert und in 5 ml FACS-Puffer überführt. Alle weiteren Arbeiten fanden auf Eis statt. Die Enden der Knochen wurden mit einer Schere abgetrennt. Mittels einer 20G-Kanüle und einer 5 ml Spritze wurde das KM herausgespült. Um eine homogene Zellsuspension zu erhalten, wurde die Suspension mit einer 25G-Kanüle 2-3 mal resuspendiert und durch einen 35 µm-Filter in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gefiltert. Die Milz wurde mittels zwei steriler Objektträger, durch zerdrücken und aneinander reiben, so lange zerkleinert bis eine Zellsuspension vorhanden war. Danach wurde diese ebenfalls mit einer 25G-Kanüle und einer 5 ml-Spritze resuspendiert um mögliche Zellaggregatate zu zerkleinern und um eine homogene Suspension zu bekommen. Auch diese Zellsuspension wurde durch einen 35 µm Filter in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gefiltert. Die Zellen wurden dann bei 300xg für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert und in 1 ml BD Pharm Lyse™ lysing buffer solution resuspendiert um die Erythrozyten zu lysieren. Nach einer Inkubation von 7 Minuten wurden 5ml FACS-Puffer hinzugegeben und die Zellen bei 300xg für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 5ml FACS-Puffer resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl, wurden 100 µl der Zellsuspensionen in 10 ml Coulter Clenz Cleaning Agent verdünnt und mit dem Z2 Particle Count and Size Analyzer gezählt.

### **6.2.4 Isolation von Lineage-negativen Zellen (Lin<sup>-</sup>-Zellen)**

Lineage-negative (Lin<sup>-</sup>-Zellen) Zellen wurden mittels des MACS Lineage Cell Depletion Kits isoliert. Die KM-Zellen wurden wie oben beschrieben isoliert und die gewünschte Anzahl an Zellen bei 300xg für 5 Minuten bei 4°C pelletiert. Wie im Benutzerhandbuch beschrieben wurden 10<sup>7</sup> Zellen in 40 µl FACS-Puffer

resuspendiert und 10 µl α-Lin-Biotin Antikörper hinzugefügt. Nach einer 10 minütigen Inkubation bei 4-8°C wurden 30 µl FACS-Puffer und 20 µl α-Biotin-Microbeads hinzugegeben und für 15 Minuten bei 4-8°C inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen mit 25 ml FACS-Puffer gewaschen und für 10 Minuten bei 300xg und 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet wurde in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf die Säulen gegeben. Nach Durchlauf der Zellen wurden die Säulen dreimal mit jeweils 500 µl MACS-Puffer gewaschen. Die separierten Lineage-negativen Zellen wurden wie oben beschrieben gezählt. Jeweils  $2 \times 10^6$  Zellen wurden zur Expansion in 1 ml SCM mit Cytokinen in ein *well* einer 48-ger-*well*-Platte ausgesät und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

### 6.2.5 Oberflächenmarkerfärbung von Knochemark- und Milzzellen

Jede Zelle besitzt auf ihrer Oberfläche spezifische Antigene. Diese Proteine, meist membrangebundene Glykoproteine, werden auch als CD-Marker (*Cluster of differentiation* = Unterscheidungsgruppen) bezeichnet. Viele dieser CD-Marker werden spezifisch exprimiert und ermöglichen so eine immunphänotypische Unterscheidung. T-Zellen können anhand ihrer CD4- und CD8-Marker unterschieden werden. Bei CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten handelt es sich meist um Helferzellen und bei CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten meist um zytotoxische T-Zellen. Der Oberflächenmarker B220 ist charakteristisch für B-Zellen. Monozyten, darunter Makrophagen und Granulozyten, können anhand der Marker Mac-1 (CD11b) und Gr-1 unterschieden werden. Makrophagen exprimieren viele Mac-1-Marker, wohingegen Granulozyten viele Gr-1-Oberflächenmoleküle exprimieren. Mittels Antikörperfärbung gegen die spezifisch exprimierten Antigene kann mittels durchflusszytometrischer Analyse der prozentuale Anteil der verschiedenen Zellpopulationen im KM und der Milz bestimmt werden. Des Weiteren lässt sich anhand des prozentualen Anteils der verschiedenen Zellarten wie CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, Gr1<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> etc. oder doppelt positiver Zellen, die Klonalität genauer charakterisieren. Ein erhöhter Anteil an doppelt positiven Gr-1<sup>+</sup> und Mac-1<sup>+</sup> Zellen spricht demnach für einen Klon aus der myeloiden Reihe wohingegen eine erhöhter Anteil an doppelt positiven CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen eher für einen Klon aus dem lymphatischen Kompartiment spricht (Kogan *et al.*, 2002). Um die Leukämie erkrankter Mäuse genauer zu charakterisieren wurden KM-Zellen und Milzzellen wie

oben beschrieben, isoliert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden pro Färbung  $1 \times 10^6$  Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und mit 1 ml FACS-Puffer bei 300xg und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 70  $\mu$ l FACS-Puffer resuspendiert. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden, wurden die Zellen mit 10  $\mu$ l Fc-Block für 10 min bei 4-8°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen und der Überstand nach Zentrifugation verworfen. Als nächstes wurden die Zellen mit den jeweiligen Antikörpern gefärbt (Tabelle 8). Hierzu wurden die Zellen in 80  $\mu$ l FACS-Puffer resuspendiert und jeweils 0,2  $\mu$ g/ml des jeweiligen Antikörpers hinzu gegeben. Die Röhrchen wurden gevortext und bei 4-8°C für 15 Minuten inkubiert. Als Kontrolle für eine spätere optimale Kompensierung am FACScan wurde jeweils ein Tube mit CD45 PE und CD45 PerCP gefärbt. Von jeder Maus und jedem Organ wurde eine ungefärbte Kontrolle mitgeführt. Nach der Färbung wurden die Zellen wiederum mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert und in 250  $\mu$ l FACS-Puffer resuspendiert.

**Tabelle 8: Kombination verwendeter Antikörper zur Färbung der Oberflächenmarker von KM- und Milzzellen**

<b>Gr-1PE+CD11bPerCP</b>
<b>Ter-119PE+B220PerCP</b>
<b>CD8aPE+CD4 PerCP</b>
<b>cKit PE</b>

### 6.2.6 Färbung von Granulozyten-Makrophagen-Vorläuferzellen (Granulocyte Macrophage Progenitors, GMPs)

Es ist bekannt, dass leukämische Stammzellen (LSCs) aus GMPs hervorgehen können (Gordon et al., 2011; Ye et al., 2015). Aus diesem Grund wurde der Anteil von GMPs im KM transplantierte Mäuse bestimmt. Um GMPs zu färben wurden  $4 \times 10^6$  KM-Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und mit 1ml FACS-Puffer gewaschen. Danach wurden die Zellen in 77  $\mu$ l FACS-Puffer resuspendiert und 3  $\mu$ l (0,2  $\mu$ g/ml) CD16/32 PE-Cy7 hinzugegeben und für 10 Minuten bei 4-8°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde ein Mastermix hergestellt (Tabelle 9):



Pro Ansatz:

**Tabelle 9: Antikörper für GMP-Färbung**

Antikörper	Menge in $\mu\text{l}$	Konzentration
Lineage cell detection	7,5	-
cKit APC	2	0,4 $\mu\text{g/ml}$
Sca-1 Biotin	2	1 $\mu\text{g/ml}$
CD34 PE	10	2 $\mu\text{g/ml}$
FACS-Puffer	59	--

Die Zellen wurden für 10 min bei 4-8°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen wiederrum gewaschen und zentrifugiert. Als nächstes wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 100  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer resuspendiert und mit 1  $\mu\text{l}$  SA<sub>v</sub> PerCP für 10 Minuten bei 4-8°C im Dunkeln gefärbt. Nach dem letzten Waschschrift mit 2 ml FACS-Puffer wurde das Zellpellet in 400  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer resuspendiert.

### 6.2.7 AnnexinV-Apoptose-Assay

Als Apoptose bezeichnet man den programmierten Zelltod. Dieser Prozess ist ein wichtiger Bestandteil im Leben und in der Entwicklung vielzelliger Organismen (Kelly and Marks, 2005) (Wyllie *et al.*, 1980). Des Weiteren fungiert die Apoptose als eine Art Qualitätskontrollmechanismus. Zellen die durch Strahlung, DNA-Mutation oder durch virale Transduktion geschädigt sind, werden im Normalfall durch Apoptose eliminiert. Störungen im Gleichgewicht zwischen Zellerneuerung und Apoptose können zu schwerwiegenden pathologischen Veränderungen (Krebs) im Organismus führen. Es ist bekannt, dass viele Tumorsuppressorgene für Apoptose-regulierende Proteine kodieren. Während der Apoptose kommt es zu verschiedenen morphologischen Veränderungen der Zelle. Das normalerweise in gesunden Zellen an der Innenseite der Lipiddoppelschicht lokalisierte Phospholipid Phosphatidylserin (PS) transloziert zu Beginn der Apoptose nach außen und fungiert als "eat-me"-Marker für Makrophagen (Fadok and Henson, 2003). Außerdem kommt es zu einer Fragmentierung der chromosomalen DNA und zum Verlust des elektrischen Potentials zwischen der Innen- und Außenmembran der Mitochondrien und zum Ausstrom mitochondrialer Proteine wie Cytochrom C (Kerr *et al.*, 1972) (Eskes *et al.*, 2000) (Antonsson *et al.*, 2000). Das PS, welches zu Beginn der Apoptose von der Innenseite der Lipiddoppelschicht nach außen transloziert ist wichtig für die Bindung

von AnnexinV. Denn AnnexinV bindet  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig an extrazelluläres PS und kann so für die Apoptosedetektion genutzt werden.

Es wurden 100000 Zellen für 5 min bei 4°C und 1200 rpm mit 1 ml PBS gewaschen und danach in 250 µl Annexin-Bindungspuffer (1:10 in Aqua dest.) resuspendiert. Dann wurde 1 µl AnnexinV-FITC bzw. 5 µl AnnexinV-APC-Antikörper hinzugegeben und die Zellen für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin folgte unmittelbar die durchflusszytometrische Analyse der Zellen. Es wurden 10000 Ereignisse gemessen.

### **6.2.8 Automatisiertes Differentialblutbild**

Das Differentialblutbild des peripheren Blutes der Mäuse wurde maschinell am Sysmex XE-2100-Gerät der im Hämatologischen-Onkologischen Labor der Klinik für Hämatologie des Universitätsklinikums Essen gemacht.

### **6.2.9 Wright-Giemsa- und Pappenheim-Färbung von KM- bzw. Milzcytopins und Blutausstrichen**

Um die Blutausstriche und die Zytospins zytologisch und hämatologisch beurteilen zu können wurden diese mittels der Wright-Giemsa Methode gefärbt. Diese Färbung ist eine nach Romanowsky-Färbung modifizierte Differentialfärbung für methanolfixierte Präparate. Die verwendete Färbelösung besteht aus einer Mischung der Farbstoffe Azur A-Eosinat, Azur B-Eosinat, Methylenblau-Eosinat und Methylenblauchlorid. Methylalkohol und Glycerin dienen als Stabilisator. Durch Komplexbildungen mit dem Farbstoff erscheint die DNA purpurrot und das Zytoplasma blau (Piaton *et al.*, 2016). Die Färbung erfolgte automatisiert (Hematek, Bayer; Hemomat Biomed) im Hämatologisch-Onkologischen Labor des Universitätsklinikums Essen.

### **6.2.10 Kryokonservierung von primären Zellen und Zelllinien in Einfriermedium**

Um weitere Analysen der Zellen zu gewährleisten oder diese für Transplantationen zu nutzen, wurden diese kryokonserviert. Hierzu wurde zunächst Einfriermedium hergestellt. DMSO wurde mit FCS im Verhältnis 1:10 gemischt. Pro Kryotube wurden höchstens  $3 \times 10^7$  Zellen/ml eingefroren. Um eine höchst mögliche Vitalität der Zellen zu erhalten mussten die Arbeiten zügig und immer auf Eis durchgeführt werden.

Die Zellen wurden in spezielle Einfrierbehälter (Einfrierkontainer Nalgene® Mr. Frosty; Sigma-Aldrich) überführt und für 24 Stunden bei -80°C gelagert. Diese speziellen Behältnisse dienen dem schrittweisen Einfrieren der Proben (1°C/Minute) und erhöhen somit die Vitalitätsrate der Zellen. Einen Tag später wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

### **6.2.11 Bestimmung der Anzahl lebender Zellen mittels Trypanblau**

Lebende Zellen haben eine intakte Zellmembran die für den Azofarbstoff Trypanblau undurchlässig ist. Bei toten Zellen hingegen ist die Membran durchlässig und Trypanblau kann in die Zellen eindringen, sich an Proteine anlagern und färbt so die Zellen blau.

Die zu analysierende Zellsuspension wurde mit Trypanblau vermischt. Anschließend wurden die Zellsuspension in eine Neubauer-Kammer pipettiert. Um die Anzahl der lebenden Zellen zu ermitteln, wurden die ungefärbten Zellen unter einem Lichtmikroskop bei 20-facher Vergrößerung ausgezählt. Das Volumen eines Eckquadrats der kammer beträgt 0,1µl. So ergibt sich die Gesamtzellzahl pro ml aus der Berechnung folgender Formel: Anzahl lebender Zellen/ ml=  $Z \times V \times 10^4$  (Z=Mittelwert der gezählten lebenden Zellen aus vier großen Quadraten, V=Verdünnungsfaktor).

### **6.2.12 DNA-Klonierung**

#### **6.2.12.1 Herstellung von Selektivagarplatten**

Es wurden 25,6 g LB-Agar Pulvers unter Rühren in 800 ml Aqua dest. aufgelöst. Danach wurde das Gemisch bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert. Nach Abkühlen des Agars wurde das jeweilige Antibiotikum zur späteren Selektion der MLL-AF9- oder AML-ETO9a-Klone hinzugegeben und die Mischung in Petrischalen gefüllt. Diese wurden mit Parafilm verschlossen und bei 4°C gelagert. Alle Arbeiten fanden unter sterilen Bedingungen unter der Werkbank statt.

### **6.2.12.2 Transformation von kompetenten E.coli-Zellen**

Zur Transformation wurden kompetente E. coli Bakterien der Firma Invitrogen verwendet. Die einzubringenden Plasmide besitzen bestimmte Antibiotikaresistenzgene für z.B. Ampicillin. 1-5 µl der jeweiligen Plasmide wurden zu den kompetenten Bakterien gegeben und der Ansatz 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 45 Sekunden im Thermomixer einer Temperatur von 42°C ausgesetzt, um so die Membranbeschaffenheit kurzzeitig zu verändern und die Aufnahme der Plasmide zu erleichtern. Nachfolgend wurden die Bakterien für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Zu 100 µl des Transformationsansatzes wurden nun 900 µl SOC-Medium hinzugegeben und alles bei 37°C und 225 rpm für 1 Stunde unter schütteln inkubiert. Danach wurden 10 µl des Ansatzes unter sterilen Bedingungen auf dem Selektivagar ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

### **6.2.12.3 Minipräparation**

Von der Agarplatte wurden mit einer 10 µl Pipettenspitze Klone gebickt und diese in ein 15 ml Falcon-Röhrchen mit 5 ml LB-Medium mit 1µl/ml Antibiotika transferiert. Der Ansatz wurde auf dem Thermoschüttler über Nacht bei 225 rpm und 37°C inkubiert. Danach wurden 4 ml des Ansatzes in 250 ml LB-Medium (inklusive Antibiotika 50 mg/ml) überführt und bei 225 rpm über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde eine Maxipräparation durchgeführt.

### **6.2.12.4 Maxipräparation von Plasmiden**

Die Plasmidpräparation wurde mit dem EndoFree<sup>®</sup> Plasmid Maxi Kit von Qiagen nach den Angaben vom Hersteller durchgeführt. Nach Aufreinigung der Plasmide wurde die DNA-Konzentration mit einem Spektrometer (BioPhotometer Plus, Eppendorf) bestimmt.

### **6.2.13 Retrovirusproduktion**

Für die Retrovirusproduktion wurden  $1 \times 10^7$  293T-Zellen in 25ml DMEM (1x) + GlutaMAX<sup>™</sup>-I, 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) in einer 140 cm<sup>2</sup> Zellkulturschale ausgesät und für 24 Stunden und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Bei einer optimalen Zelldichte von 80-90% wurde

das Medium vorsichtig gewechselt und der Transfektionsmix vorbereitet. 1 ml H<sub>2</sub>O, welcher die gewünschte DNA (20 µg), pCL-Eco (retrovirales Verpackungsplasmid; 2,25 µg) und 2,5 M CaCl<sub>2</sub> enthält, wurden langsam zu 1 ml 2x HEBS-Puffer unter kontinuierlichem langsamem Mischen auf dem Vortexmischer hinzugegeben. Dieser Mix wurde bei RT für 10 Minuten inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium der 293T-Zellen durch 15 ml DMEM (1x) + GlutaMAX<sup>TM</sup>-I, 10% FCS und 1% Pen/Strep und 20mM HEPES ersetzt. Der Transfektionsmix wurde tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert und nachfolgend wurde das Medium durch 15 ml DMEM (1x) + GlutaMAX<sup>TM</sup>-I, 10% FCS und 1% Pen/Strep und 10mM HEPES ersetzt. Am darauffolgenden Tag wurde der Überstand geerntet und mittels eines 45 µm Filter filtriert. Wiederum wurden 15 ml DMEM (1x) + GlutaMAX<sup>TM</sup>-I, 10% FCS und 1% Pen/Strep und 10 mM HEPES vorsichtig auf die Zellen gegeben, um diesen Überstand am folgenden Tag zu ernten. Der Virusüberstand wurde bei -80°C gelagert.

### 6.2.14 Bestimmung des Virustiters

Zur Bestimmung des Virustiters wurden  $2 \times 10^4$  NIH 3T3 Zellen pro *well* in eine *Tissue culture-treated* 12-*well*-Platte in 1ml DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep ausgesät und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Pro produziertem Virus (MLL-AF9, AML1-ETO9a) wurden jeweils 4 *wells* und zwei zusätzliche *wells* zur Bestimmung der Zellzahl ausgesät. Dies wurde für zwei Tage gemacht. Einen Tag nach dem Aussäen der Zellen wurden verschiedene Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000) des Virusüberstandes in DMEM/10% FCS/1% Pen/Strep angesetzt und diese mit 8 µg/ml Polybrene versetzt. Das Medium in den *wells* wurde vorsichtig abgenommen und durch jeweils 300 µl des nicht-verdünnten und des verdünnten Virus ersetzt. Am selben Tag wurden die Zellen von zwei nicht behandelten *wells* trypsinisiert und gezählt. Die mit dem Virus behandelten Zellen wurden über Nacht inkubiert. Dann wurde der Virusüberstand abgenommen und mit 1 ml DMEM/10% FCS/1% Pen/Strep ersetzt. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen für 5 Minuten bei Raumtemperatur trypsinisiert, in FACS-Puffer resuspendiert und bei 300xg, 4°C und für 5 Minuten pelletiert. Das Zellpellet wurde in 400µl FACS-Puffer resuspendiert und in ein FACS-Röhrchen überführt. GFP<sup>+</sup>-Zellen wurden mittels BD FACScan System und mit der FlowJo Single Cell Analysis Software V10 analysiert.

### 6.2.15 Virale Transduktion

Um die virale Transduktion zu optimieren, wurde die gewünschte Anzahl an *wells* mit 400  $\mu$ l ( 48 *well*-Platte) bzw. mit 600  $\mu$ l (24 *well*-Platte) 20  $\mu$ g/ml Retronectin in PBS 48 Stunden vor Beginn der Transduktion bei 4°C beschichtet. Nach der Inkubation wurde die Retronectinlösung in neue *wells* transferiert und die beschichteten *wells* vorsichtig mit 1 ml PBS gespült. Daraufhin wurden die *wells* mit einer 2%-iger BSA-Lösung für 30 Minuten bei RT geblockt und direkt danach mit 1ml PBS gewaschen. Jeweils 600  $\mu$ l des Virusüberstandes wurden in jedes *well* pipettiert und die Platte für 2 Stunden bei 3500xg bei 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden ca. 450  $\mu$ l des Virusüberstandes aus den *wells* verworfen und nochmals 600  $\mu$ l frischer Virusüberstand hinzugefügt. Die Platten wurden ein zweites mal für 2 Stunden bei 3500xg und 4°C zentrifugiert. Währenddessen wurden die Lin<sup>-</sup>-Zellen, welche wie oben beschrieben separiert und kultiviert wurden mittels abgeschnittener 1000  $\mu$ l Pipetten vorsichtig aus ihren *wells* gelöst und in ein Falcon-Tube überführt. Die Zellen wurden gezählt und es wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 600  $\mu$ l SCM resuspendiert. Nach der zweiten Zentrifugation der virusbeschichteten Platten wurde der Überstand bis auf 100  $\mu$ l entfernt und jeweils 600  $\mu$ l der Zellsuspension in ein *well* gegeben. Die nun mit den Zellen bestückten Platten wurden bei 300xg für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde Polybrene zu einer Endkonzentration von 2  $\mu$ g/ml zu jedem *well* gegeben. Die Zellen wurden nun bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

### 6.2.16 Durchflusszytometrische Analyse (FACS)

FACS (*fluorescence activated cell sorting*) ist eine durchflusszytometrische Analysemethode, die es ermöglicht Zellen auf Basis ihrer Größe, Form und Granularität zu analysieren und zu sortieren. Außerdem ist es möglich Zellen, die mit fluoreszierenden Antikörpern gefärbt wurden oder selbst durch Expressierung fluoreszierender Proteine markiert sind zu detektieren und zu sortieren. Die FACS-Analyse wurde am FACScan (BD Bioscience) gemacht. Das Sortieren der Zellen wurde am FACSArial oder am FACSDiva (BD Bioscience) durchgeführt.

### 6.2.17 Flüssigkultur-Assay

80.000 transfizierten oder nicht transfizierten murine Lin<sup>-</sup>-Zellen wurden in 300 µl SCM pro well einer 48-well Platte in Triplikaten ausgesät. Jeden dritten Tag wurden 100 µl des Mediums durch frisches SCM ersetzt. Nach 7-tägiger Inkubation bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert wurden die Zellen mit einer 100 µl Pipettenspitze behutsam aus ihren wells gelöst und in Eppendorfgefäße überführt. Jedes well wurde zweimal mit 100 µl FACS-Puffer gespült um möglichst alle Zellen aus den wells zu entfernen. Daraufhin wurden die Zellen mittels einer Neubauer Zählkammer gezählt.

### 6.2.18 Methylcellulose-Assay (CFU-Assay)

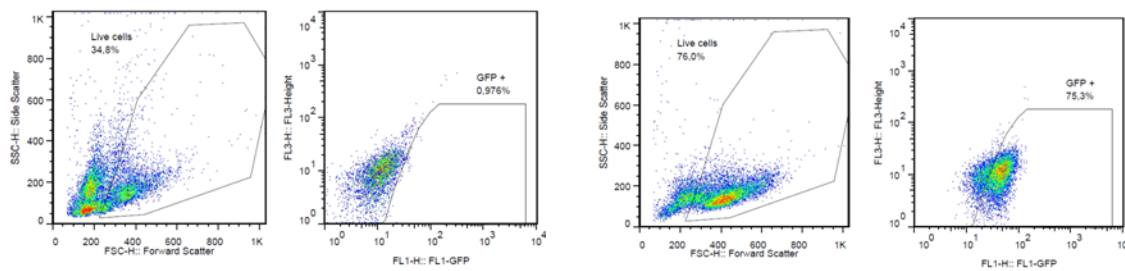
Um die Eigenschaft der Zellen bezüglich ihrer Koloniebildung zu untersuchen, wurde ein sogenanntes CFU-Assay (*Colony Forming Unit Assay*) angesetzt. Hierzu wurden 1.000 transfezierte oder nicht transfezierte Lin<sup>-</sup>- Zellen in 1 ml Methocult<sup>TM</sup> GFM3434 mit 10 µl Pen/Strep versetzte Methylcellulose (GF M3434 Methylcellulosemedium Stemcell Technologies, Vancouver, Canada) ausgesät. Für jeden zu untersuchenden Genotypen wurden 4 wells einer 12-well Platte ausgesät. Nach 7-tägiger Inkubation wurden die Kolonien pro well gezählt und analysiert. Danach wurden die Zellen mit 4 ml angewärmten IMDM-Medium + 10% FCS + 1% Pen/Strep aus den wells herausgelöst und bei 300xg bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 500 µl SCM resuspendiert und mittel Neubauer-Zählkammer gezählt.

### 6.2.19 Transplantation von frischen KM-Zellen in Mäuse

Die C57Bl/6 Empfängermäuse wurden letal (7Gy + 3Gy) bestrahlt. Das Trinkwasser der Mäuse wurde von nun an für 3 Wochen mit 10% Baytril (1: 1000) versetzt. Einen Tag nach Bestrahlung wurden die wie oben beschrieben transfizierten Zellen aus ihren wells gewaschen und 100 µl der Zellsuspension zum Zählen genutzt. Desweiteren wurden 50 µl der Zellsuspension genutzt, um den prozentualen Anteil der GFP<sup>+</sup>-Zellen per FACS zu bestimmen. Als GFP<sup>-</sup>-Kontrolle wurden KM-Zellen einer Wildtyp Maus genutzt (Abbildung 5).

**Kontroll-KM**

**MLL-AF9 leukämisches KM**



**Abbildung 5: Gatingstrategie für transfizierte KM-Zellen.** Als erstes werden im FSC und SSC die lebenden Zellen markiert und dann im FL1 und FL3 Kanal die GFP<sup>+</sup>-Zellen markiert.

Nach dem Zählen und der FACS-Analyse wurde die Anzahl der lebenden und GFP-positiven Zellen kalkuliert. Es wurden 10 000 GFP<sup>+</sup>-Zellen pro Maus i.v. injiziert. Für die Injektion wurde eine 1ml-Spritze und eine 27G-Kanüle verwendet. Alle Arbeiten fanden unter sterilen Bedingungen unter der Werkbank statt um Infektionen zu vermeiden.

**6.2.20 Sekundäre Transplantation von KM-Zellen in Mäuse**

Die C57Bl/6 Empfängermäuse wurden subletal (3Gy) bestrahlt. Das Trinkwasser der Mäuse wurde von nun an für 3 Wochen mit 10% Baytril (1: 1000) versetzt. Einen Tag später wurden die zur Transplantation vorgesehenen Zellen aus dem Stickstoff geholt und im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Direkt nach dem Auftauen, wurden die Zellen in ein mit 5 ml FACS-Puffer gefülltem Falcon-Röhrchen überführt und bei 300xg für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet vorsichtig in 1ml PBS resuspendiert. Es wurden 100 µl der Zellsuspension zum Zählen benutzt. Desweiteren wurden 50 µl der Zellsuspension benutzt, um den prozentualen Anteil der GFP<sup>+</sup>-Zellen per FACS zu bestimmen. Als GFP<sup>-</sup>-Kontrolle wurden KM-Zellen einer Wildtyp-Maus benutzt. Nach dem Zählen und der FACS-Analyse wurde die Anzahl der lebenden und GFP<sup>+</sup>-Zellen berechnet. Es wurden 100.000 GFP<sup>+</sup>-Zellen pro Maus i.v. injiziert. Für die Injektion wurde eine 1 ml-Spritze und eine 27G-Kanüle verwendet. Alle Arbeiten fanden unter sterilen Bedingungen in einer sterilen Werkbank statt um Infektionen zu vermeiden.



### 6.2.21 Blutabnahme bei Mäusen

Zur Gewinnung von peripherem Blut wurden die Mäuse in *Restrainern* (Fixierungskäfige) fixiert und die Schwanzvene punktiert. Mittels speziellen heparinisierten Mikro-Kapilaren (Hecht-Assistent, Sondheim) wurden ca. 50 µl des Bluts gesammelt und in Blutentnahmeröhrchen überführt.

### 6.2.22 Zellkultur

Die humane AML-Zelllinie Kasumi-1 wurden in RPMI 1640 + 20% FCS + 1% Pen/Strep kultiviert. K562-Zellen wurden in IMDM + 20% FCS + 1% Pen/Strep kultiviert. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Für K562-Zellen betrug die optimale Zelldichte 5x10<sup>6</sup>/ml und für Kasumi-1-Zellen 1x10<sup>6</sup>/ml.

Primäre humane KM-Zellen wurden in IMDM + 20% FCS + 1% Pen/Strep mit humanem SCF (10 ng/ml), humanem FLT3 (10 ng/ml) und humanem TPO (10 ng/ml) im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

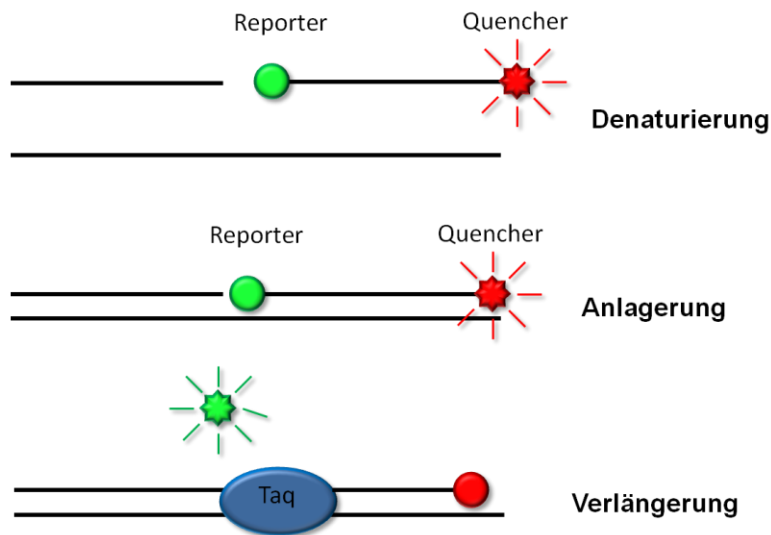
### 6.2.23 Behandlung von Zellen mit Inhibitoren

Um den Effekt der Histondeacetylase- (HDAC) und Histonacetylase- (HAT) Inhibitoren Vorinostat und CTK7a auf Zellen zu testen, wurden 5000 Zellen per 96-*well* in 100 µl des jeweiligen Mediums (abhängig von der Zelllinie, bzw. murinen oder humanen primären Zellen) oder 80.000 Zellen per 48-*well* ausgesät. Es wurden ausschließlich unbeschichtete Platten benutzt um Zelladherenz zu vermeiden. Für Vorinostat wurden Konzentrationen von 0,25 µM, 0,5 µM, 0,75 µM und 1 µM in DMSO angesetzt. Für CTK7a wurden Konzentrationen von 25 µM, 50 µM 75 µM und 100 µM in DMSO angesetzt. Als Kontrolle wurde die jeweils höchste Menge an DMSO verwendet. Jede Bedingung wurde in Triplikaten angesetzt. Nach 48 bzw. 72 Stunden Inkubation bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit wurden die Zellen aus ihren *wells* gewaschen und mittels Neubauerzählkammer gezählt.

### **6.2.24 Bestimmung der *GFI1*-Expressionsleveln mittels Taq Man *Real-Time*-PCR**

Die *Real-Time*-PCR (RT-qPCR) ermöglicht, anders als die herkömmliche PCR, eine Quantifizierung der amplifizierten DNA. Mit Hilfe von fluoreszierenden Sonden kann mittels Fluoreszenzmessung die Quantifizierung ermöglicht werden. Das Fluoreszenzsignal nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. In dieser Arbeit wurden sogenannte *Fluorescence energy transfer (FRET)*-Sonden, genauer TaqMan-Sonden verwendet. Das Prinzip dieses Assays beruht auf der 5`-3` Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase. Bei den TaqMan-Sonden handelt es sich um Oligonukleotide, welche sequenzspezifisch für die Ziel-DNA sind. Die Sonden sind mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt, einem Reporterfarbstoff (z.B. FAM) und einem *Quencher* (z.B. TAMRA). Wenn die Sonde nun an die Zielsequenz bindet, kommt es durch die 5`-3` Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase zur Hydrolyse der Sonde. Dies hat eine Trennung des Reporters und des *Quenchers* zur Folge und es wird eine steigende Reporter-Fluoreszenz gemessen (Huggett *et al.*, 2005) (Nolan *et al.*, 2006).

Um das *GFI1*-mRNA-Expressionslevel in humanen Proben zu bestimmen wurde eine *Real-Time* PCR durchgeführt. Von  $1 \times 10^7$  Zellen wurde die RNA isoliert. Hierzu wurde das RNeasy Mini Kit (Quiagen) verwendet und es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Die cDNA-Synthese erfolgte mittels SMARTer® PCR cDNA Synthese Kits. Für jede Probe wurden 6ng cDNA, 11 µl Taqman Gene Expression MasterMix und 1 µl Taqman Primer für *GFI1/Gfi1* und GAPDH in einer MikroAmp-96-*well*-Platte zusammenpipettiert. Es wurden für jede Probe Duplikate angesetzt. Die Platte wurde für 30 Sekunden bei 800rpm und RT geschüttelt und dann bei 300xg für eine Minute zentrifugiert um mögliche Luftblasen zu entfernen. Die *Real-Time* PCR wurde mittels des StepOnePlus™ *Real-Time*-PCR-Systems durchgeführt. Es wurde das Standardprotokoll verwendet. Nach 2-minütiger 50°C Erhitzung folgte eine 10 minütige 95°C Erhitzung um die DNA-Doppelstränge zu separieren. Danach folgten 40 Zyklen mit zwei verschiedenen Bedingungen. Eine weitere Inkubation bei 95°C für 15 Sekunden, um die Separation der Doppelstränge zu erhalten gefolgt von einer 1-minütigen Inkubation bei 60°C um das Anlagern der Primer und die Polymerisation der DNA zu ermöglichen. Die relative mRNA-Expression wurde mittels  $\Delta\Delta CT$ -Methode ermittelt und zum GAPDH-Referenzgen normalisiert.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung des Prinzips der quantitativen Real-Time-PCR mittels TaqMan-Sonden.** Die sequenzspezifische TaqMan-Sonde mit Reporter und "Quencher" bindet an die DNA-Zielstruktur. Durch die 5'-3' Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase kommt es zur Abspaltung des Reporters und eine steigende Fluoreszenz kann gemessen werden.

### 6.2.25 Bestrahlung von Mäusen und Zellen

Die Mäuse wurden für eine letale Bestrahlung mit 8Gy bestrahlt. Für eine subletale Bestrahlung wurden die Mäuse mit 3Gy bestrahlt. Für die Bestrahlung wurden die Mäuse in keimfreie Bestrahlungskäfige überführt, die so konzipiert sind, dass eine gleichmäßige und genaue Bestrahlung gewährleistet werden konnte. Zellen wurden bei 8Gy in 6-well-oder 48-well-Platten in dem jeweiligen Medium bestrahlt.

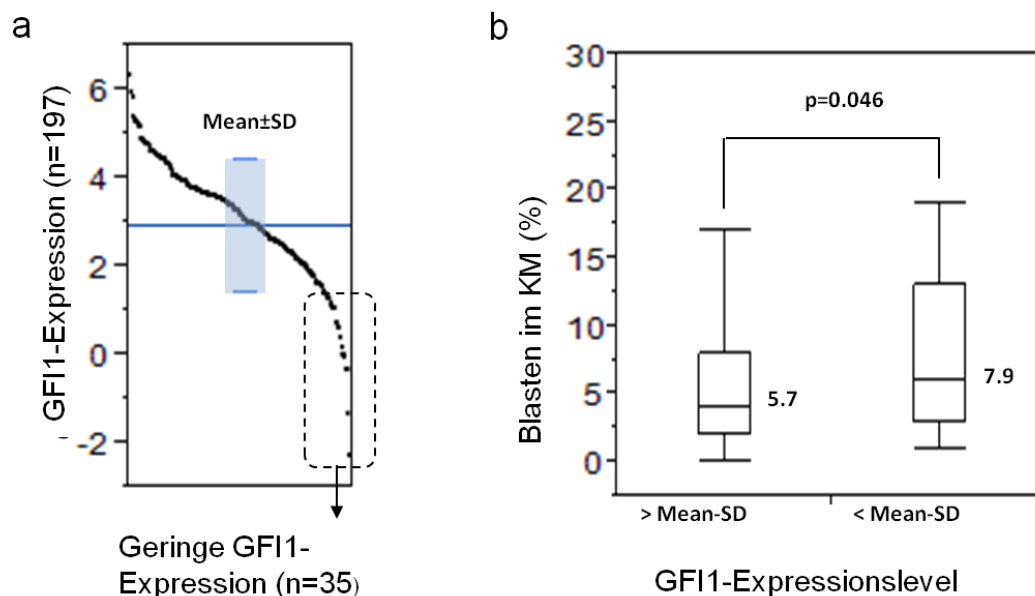
### 6.2.26 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen wurden mit der Graph Pad Prism 4 oder 6 Software (La Jolla, CA, USA) oder der SPSS Version 19 (IBM, Düsseldorf) gemacht. Die Überlebenskurven wurden mit der Kaplan-Meier-Methode erstellt. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen. Die prozentualen Unterschiede wurden mittels *two-sample t-test* bestimmt. Das EFS In dieser Arbeit wurde an unbereinigten GF11-Expressionslevel bemessen. Für das Überleben der humanen Kohorten wurde der Log-rank-Test und für das Überleben der murinen Kohorten der Mantel Cox-Test genutzt. Alle gezeigten p-Werte waren zweiseitig. Die *Cox proportional-hazards regression* wurde für das Alter, das Geschlecht und die Zytogenetik der humanen Kohorten benutzt.

## 7 Ergebnisse

### 7.1 Geringe *GFI1*-Expression beeinflusst die Prognose von AML-Patienten

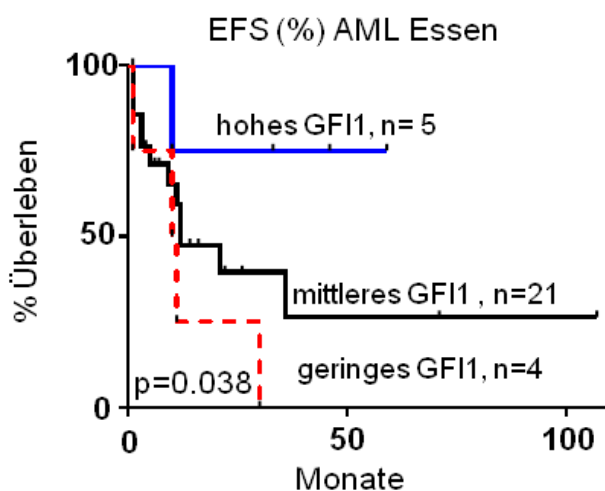
Erste Hinweise, dass die Expression von *GFI1* eine Rolle bei der Progression und der Prognose von MDS/AML-Patienten spielt, zeigen unveröffentlichte Daten von Maciejewski. Hier wurde das KM von MDS-Patienten hinsichtlich der *GFI1*-Expression untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit geringerer *GFI1*-Expression eine höhere Anzahl an Blasten in ihrem KM aufwiesen (Abbildung 7).



**Abbildung 7: MDS-Patienten mit geringerem *GFI1*-Expressionslevel weisen mehr Blasten im KM auf.** a) Das *GFI1*-Expressionslevel von 197 KM-Proben von MDS-Patienten wurde mittels RT-PCR analysiert und in niedrige *GFI1*-Expression und hohe *GFI1*-Expression unterteilt. b) Die Patienten mit geringerem *GFI1*-Expressionslevel zeigten hatten signifikant ( $p=0,046$ ) mehr Blasten im KM als Patienten mit hohem *GFI1*-Expressionslevel (Daten Maciejewski).

Um dies genauer zu überprüfen, ob verschiedene *GFI1*-Expressionslevel eine mögliche Rolle bei der Progression und der Pathogenese bei der AML spielen, wurde eine kleine Kohorte von AML-Patienten der Klinik für Hämatologie des Universitätsklinikums Essen untersucht. Hierzu wurde die mRNA-Expression von

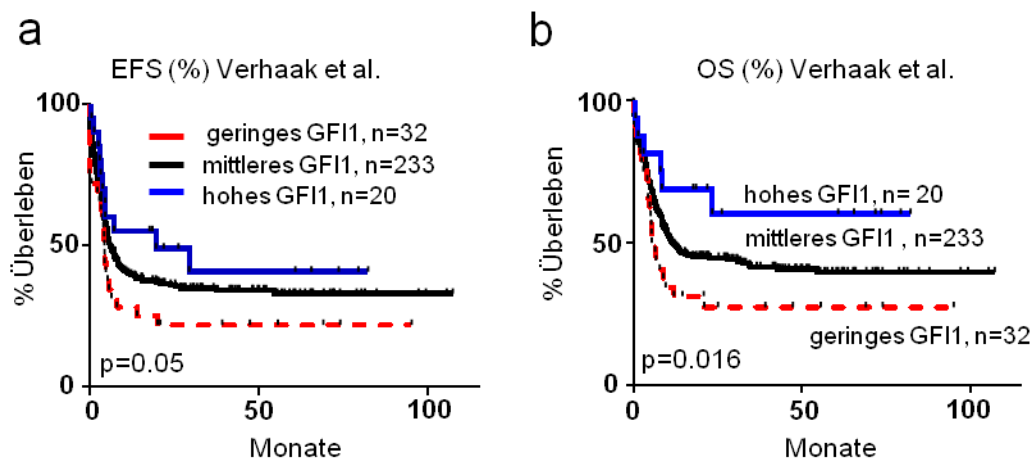
KM-Proben mittels RT-PCR untersucht und mit dem *Event*-freien (Ereignis-freies) Überleben (*Event Free Survival* = EFS) verglichen (Aufgrund dieffernzieller Behandlung von AML-M3 Patienten, wurden diese von der Untersuchung ausgeschlossen). Nach der Bestimmung der *Gfi1*-mRNA-Level konnten die Patienten in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden: 1. Patienten mit geringem *GFI1*-Expressionslevel (0-5%). 2. Patienten mit mittlerer *GFI1*-Expression 6-60% und 3. Patienten mit hoher *GFI1*-Expression 61-100%. Geringe *GFI1* mRNA-Level waren mit einer signifikant schlechteren Prognose assoziiert ( $p=0.038$ ). Während Patienten mit hohen *GFI1*- Expressionslevel mit einer besseren Prognose und einem höheren Event-freien Überleben assoziiert werden konnten (Abbildung 8).



**Abbildung 8: AML Patienten mit geringem *GFI1*-Expressionslevel haben eine schlechtere Prognose.** Das *GFI1*-Expressionslevel im KM von AML Patienten vom Uniklinikum Essen wurde mittels Real-Time PCR analysiert. Es wurde eine Kaplan-Meier Kurve vom Event-freien Überleben erstellt. Patienten mit geringerer *GFI1*-Expression zeigen im Vergleich zu Patienten mit hoher oder mittlerer *GFI1*-Expression eine schlechtere Prognose.

Es gab keine Korrelation zwischen AML-Subtypen basierend auf der FAB-Klassifikation (Estey and Dohner, 2006; Dohner *et al.*, 2010), Zytogenetik, Alter oder Geschlecht und geringer *GFI1*-Expression (Tabelle 10). Nachfolgend wurde eine weitere unabhängige Kohorte von AML-Patienten untersucht (beschrieben von Verhaak *et al.* (Verhaak *et al.*, 2009)). Anhand des *GFI1*-Expressionslevels wurden auch diese Patienten in drei verschiedene Gruppen eingeteilt. Es wurden die gleichen Kriterien wie bei der Essener Kohorte angewandt. Auch hier war ein schlechtes EFS mit einer geringen Expression von *GFI1* assoziiert, wo hingegen höhere *GFI1*-Expressionen mit einem signifikant besseren Überleben einhergingen

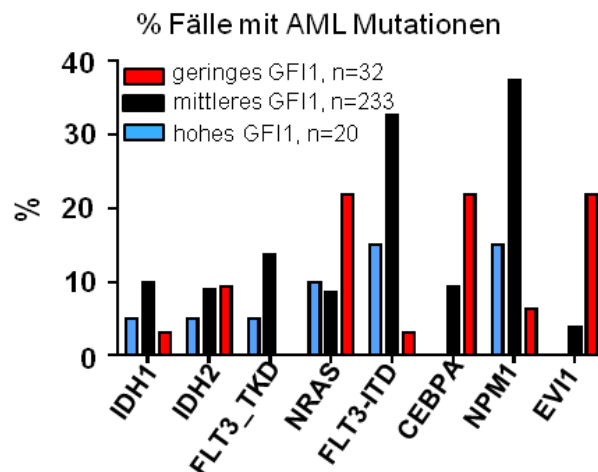
(Abbildung 9a). Die Patienten mit geringem *GFI1*-Expressionslevel zeigten ein medianes EFS von 9 Monaten hingegen zeigten die Patienten mit hohem *GFI1*-Expressionslevel ein EFS von 39 Monaten. Diese Beobachtungen ließen sich auch beim Gesamt-Überleben (*overall survival*, OS) machen (Abbildung 9b). Auch hier zeigten Patienten mit geringerem *GFI1*-Expressionslevel ein schlechteres Überleben, als Patienten mit hohem *GFI1*-Expressionslevel.



**Abbildung 9: Korrelation zwischen *GFI1*-Expression und AML-Prognose.** a) EFS. Es wurden die Daten von Verhaak et al. analysiert. Das *GFI1*-Expressionslevel der Patientenkohorte wurde mit dem EFS korreliert. Es ist deutlich, dass Patienten mit geringem *GFI1*-Level eine schlechtere Prognose aufwiesen. b) Das OS der Patientenkohorte korreliert mit dem *GFI1*-Expressionslevel. Patienten mit hohem *GFI1*-Level zeigen eine signifikant bessere Prognose im Vergleich zu Patienten mit geringer *GFI1*-Expression.

In dieser Kohorte gab es keine Korrelation zwischen AML-Subtypen basierend auf dem Alter oder dem Geschlecht (Tabelle 11). Auffällig war jedoch, dass ein Zytogenetikstatus mit schlechter Prognose öfter bei Patienten mit niedrigen *GFI1*-Expressionsleveln auftraten, als bei Patienten mit hohen *GFI1*-Expressionsleveln (Tabelle 11). Demnach wiesen 48% der Patienten mit geringer *GFI1*-Expression eine durch die Zytogenetik bestimmte schlechtere Prognose auf, wohingegen nur 6% der Patienten mit hoher *GFI1*-Expression diesen Status aufwiesen. Des Weiteren zeigten 65% der Patienten mit hohem *GFI1*-Expressionslevel eine Zytogenetik, die mit einer guten Prognose assoziiert ist, und nur 8% der Patienten mit geringem *GFI1*-Expressionslevel hatten diesen Phänotyp. Außerdem gab es eine Korrelation zwischen Patienten mit geringer *GFI1*-Expression und der FAB-M4E und -M0-Typen (Tabelle 11).

Anschließend wurden die verschiedenen AML-assoziierten Mutationen der verschiedenen Patientengruppen untersucht und es konnte gezeigt werden, dass Mutationen wie *CEBPα*- oder *NRAS*-Mutationen oder eine erhöhte *EVI1*-Expression häufiger bei Patienten mit niedriger *GFI1*-Expression auftraten. Im Gegensatz dazu waren *NPM*- und *FLT3*-Alterationen häufiger bei Patienten mit höheren *GFI1*-Level zu detektieren (Abbildung 10).

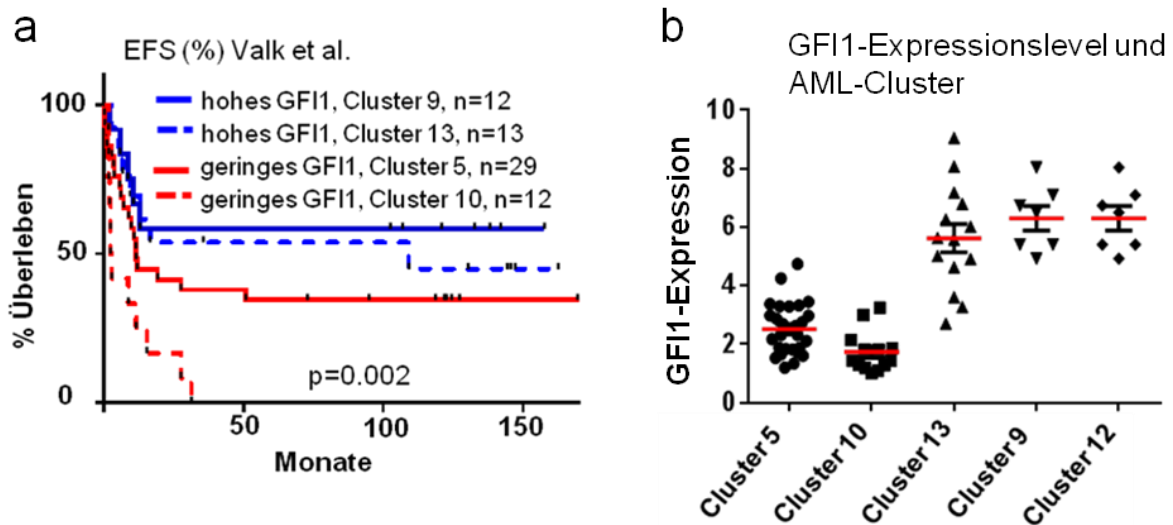


**Abbildung 10: Mutationsfrequenz der Patientenkohorte von Verhaak et al. (2009).** Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Mutationen, die bei den verschiedenen Patienten diagnostiziert wurden. Mutationen wie *FAB-M4* und *M0*, *CEBPα*-, *NRAS*-Mutationen treten häufiger bei Patienten mit niedriger *GFI1*-Expression auf. Hingegen waren *FAB M2*, *NPM* und *FLT3* Alterationen häufiger bei Patienten mit höheren *GFI1*-Expressionslevel zu detektieren.

Das geringe *GFI1*-Expressionslevel war ein unabhängiger prognostischer Faktor für das EFS. Dies konnte mittels einer multivariaten Cox-Regressions-Analyse nach Adaptierung für Alter, Zytogenetik, *EVI1*-Expression, *NPM*-, *CEBPα*- und *NRAS*-Mutationsstatus gezeigt werden (Tabelle 12).

Des Weiteren wurde das Gen-Expressionsmuster von AML-Blasten mit dem Überleben einer anderen AML-Patientenkohorte untersucht (Valk et al., 2004). Valk et al. (2004) definierten Patientengruppen aufgrund ihrer Gen-Expressionssignatur und unter anderem des Vorhandenseins an Onkofusionsgenen und spezifischer Krankheitsentitäten. Die Patienten aus Cluster 5 und 10 zeigten ein schlechtes EFS, wo hingegen die Patienten der Cluster 9, 12 und 13 mit einer guten Prognose und einem guten EFS assoziiert werden konnten (Abbildung 11a). Es wurde das *GFI1*-Expressionslevel dieser Patienten untersucht und wir konnten zeigen, dass Patienten der Cluster 5 und 10 geringere *GFI1*-Expressionslevel aufwiesen als Patienten aus

den Clustern mit einer guten Prognose (Cluster 9,12,13) (Abbildung 11b). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Höhe der *GFI1*-Expression eine wesentliche Rolle in der Entstehung und Progression der AML spielen könnte.

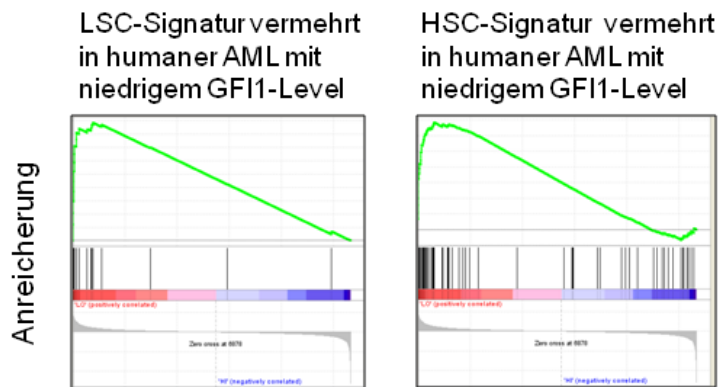


**Abbildung 11: Hohe *GFI1*-Expressionslevel korrelieren mit einer guten Prognose bei AML-Patienten.** a) EFS der Patientenkohorte von Valk et al. (2004). Valk et al. definierten Patientengruppen aufgrund ihrer Gen-Expressionssignatur und unter anderem des Vorhandenseins an Onkofusionsgenen und spezifischer Krankheitsentitäten. Die Patienten aus Cluster 5 und 10 zeigten ein schlechtes EFS, wo hingegen die Patienten der Cluster 9, 12 und 13 mit einer guten Prognose und einem guten EFS assoziiert werden konnten. b) Es wurde das *GFI1*-Level der Patienten (Kohorte von Valk et al.) untersucht und es konnte gezeigt werden, dass Patienten der Cluster 5 und 10 geringere *GFI1*-Level aufweisen als Patienten aus den Clustern mit der guten Prognose (Cluster 9,12,13).

Um die Frage zu klären, warum geringe *GFI1*-Expressionen mit einer schlechten Prognose von AML-Patienten korrelieren, wurde eine Analyse der Daten von Valk und Kollegen durchgeführt. Es wurde das Gen-Expressionsmuster von Blasten mit geringen *GFI1*-Leveln (5% der geringsten *GFI1*-Level) mit Blasten, welche ein hohes *GFI1*-Expressionslevel (20% der höchsten *GFI1*-Level) aufwiesen, verglichen. Auffallend war, dass die Genexpressionslevel von Blasten mit geringem *GFI1*-Level mit ähnlichen Genen korrelieren, die auch in leukämischen (*LSC*) und hämatopoetischen Stammzellen (*HSC*) gefunden wurden (Abbildung 12). Dies kann auch durch bisherige Veröffentlichungen gestützt werden. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass ein ähnliches Expressionsmuster sowohl für *HSCs* als auch für *LSCs* mit einer schlechteren Prognose für Patienten assoziiert ist (Eppert et al., 2011). Dies



könnte erklären, warum eine geringe *GF11*-Expressionen mit einer schlechteren Prognose korrelierten.

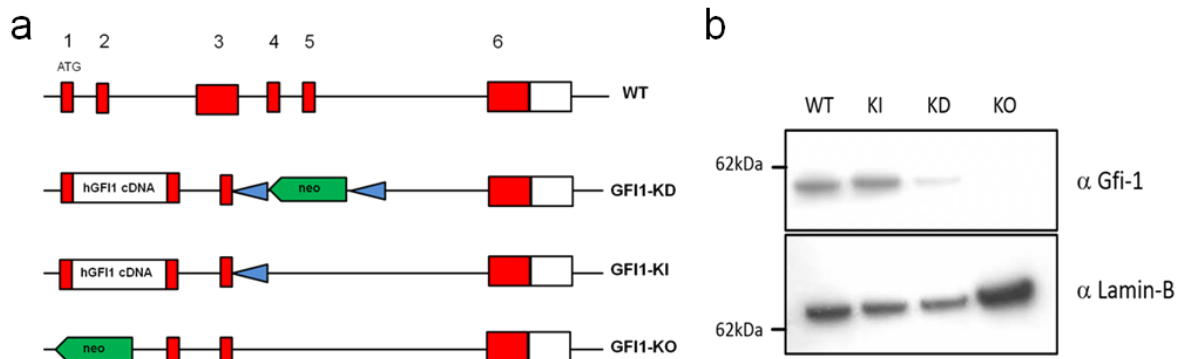


**Abbildung 12: Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) von humanen leukämischen Zellen mit geringen *GF11*-Expressionslevel zeigen Expressionsmuster wie LSCs und HSCs.** Die Genexpressionslevel von Blasten mit geringem *GF11*-Level korrelieren mit ähnlichen Genen, die auch in LSCs und in HSCs gefunden wurden.

## 7.2 Der Knock-down von *GF11* ist assoziiert mit spezifischen Alterationen des hämatopoetischen Systems

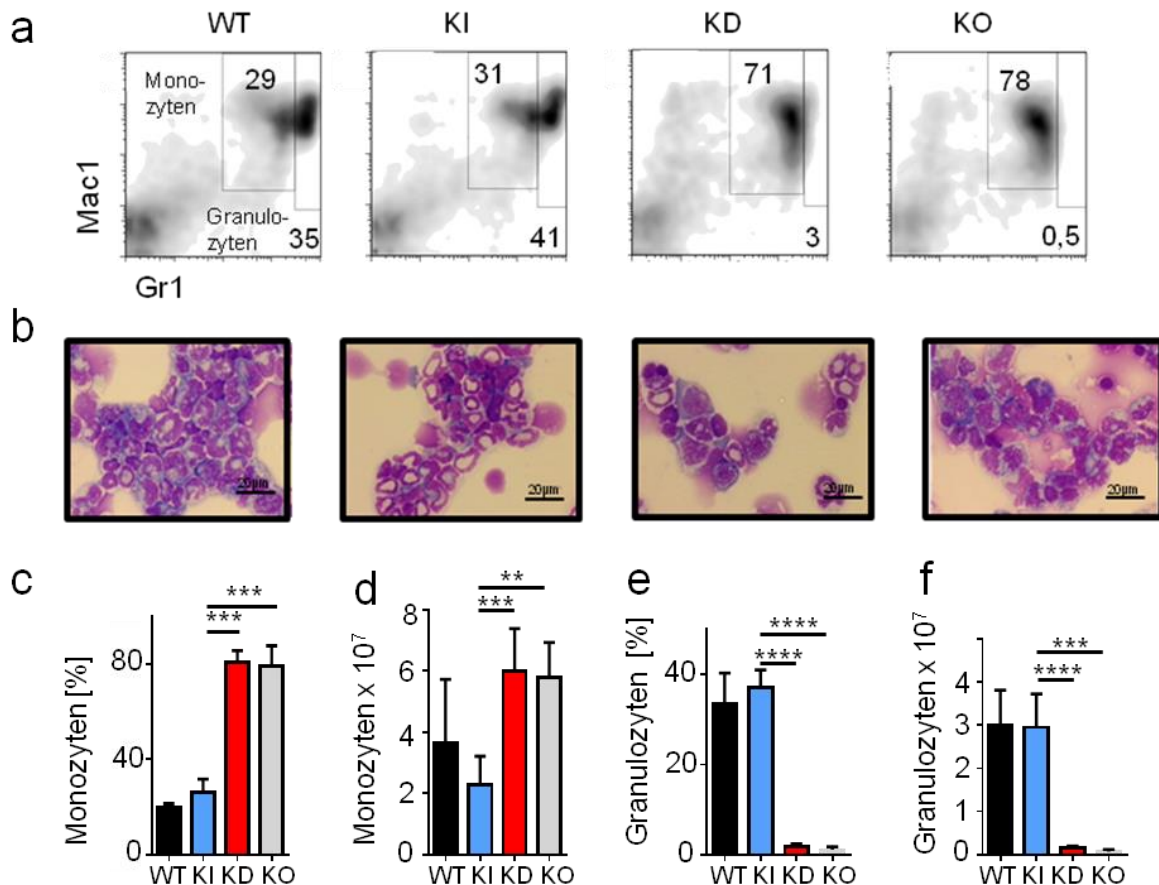
Um zu klären, warum eine geringe *GF11*-Expression die AML-Entwicklung fördert und um den dafür verantwortlichen Mechanismus zu untersuchen, wurde ein spezieller Mausstamm entwickelt. Dieser Mausstamm exprimiert das humane *GF11*-Gen mit erniedrigten Expressionsleveln (*GF11*-KD-Mäuse). Diese sogenannten *GF11*-Knock-down-Mäuse tragen eine Neo-Kassette im *GF11*-Gen in antisense Richtung. Die Neo-Kassette enthält "kryptische" *splice sites*, die das RNA-splicing beeinflussen. Dies reduziert das mRNA-Level von *GF11* und es entsteht ein sogenanntes "hypomorphes" Allel (Holzenberger *et al.*, 2000). Dies führt dazu, dass das *GF11*-Gen nur noch zwischen 5% bis 15% der üblichen Transkriptionsrate exprimiert wird (Hones *et al.*, 2016). Für weitere Untersuchungen wurden durch *Gen-Targeting* generierte Mäuse benutzt, welche die humane *GF11*-cDNA anstelle der murinen cDNA am *Gfi1*-Locus tragen (Knock-in, *GF11*-KI-Mäuse) (Abbildung 13a) (Zeng *et al.*, 2004; Khandanpour *et al.*, 2012). Um den Phänotyp der *GF11*-KD-Mäuse in einem nicht malignen Zustand und den funktionellen KD zu attestieren wurde zunächst ein Western Blot angefertigt. Die *GF11*-KD-Mäuse zeigten eine *GF11*-Expression von 5-15% (Proteinlevel) im nuklearen Extrakt von Thymozyten im Vergleich zu WT-

Mäusen (Abbildung 13b). Wie erwartet exprimieren *Gfi1*-KO-Mäuse kein GFI1-Protein (*Gfi1*-KO) (Hock *et al.*, 2004) (Marteijn *et al.*, 2007) (Abbildung 13b).



**Abbildung 13: Verwendete Mausmodelle. Schematische Darstellung des GFI1-/Gfi1-Locus der in dieser Arbeit verwendeten Mausstämme.** a) Schematische Darstellung des genetischen Hintergrunds der verwendeten Mausmodelle. WT-Mäuse exprimieren physiologische Level des murinen *Gfi1*-Gens. Bei GFI1-KD-Mäusen wurde das murine *Gfi1*-Gen durch das humane GFI1-Gen ersetzt und eine Neokassette in antisense Richtung eingebaut, dass nur noch ca. 5-15% des humanen GFI1-Gens exprimiert werden. Bei GFI1-KI-Mäusen wurde das murine *Gfi1*-Gen durch die humane Variante ersetzt. *Gfi1*-KO-Mäuse exprimieren kein funktionelles *Gfi*-Protein. b) Proteinexpressionslevel der verschiedenen Mausmodelle. Aus den Thymi der verschiedenen Mäuse wurde der nukleäre Extrakt separiert und mit 10 µg Protein ein Western Blot angefertigt. Die Extrakte von *Gfi1*-WT- und der GFI1-KI-Mäusen zeigten gleiche Mengen an *Gfi1*/GFI1-Protein. Extrakte aus GFI1-KD-Mäusen zeigten eine deutlich reduzierte Menge an GFI1-Protein (55 kDa) und Extrakte aus *Gfi1*-KO-Mäusen enthielten kein nachweisbares *Gfi1*-Protein. Als Kontrolle für die Beladung des Gels wurde das Lamin B-Protein (67 kDa) benutzt.

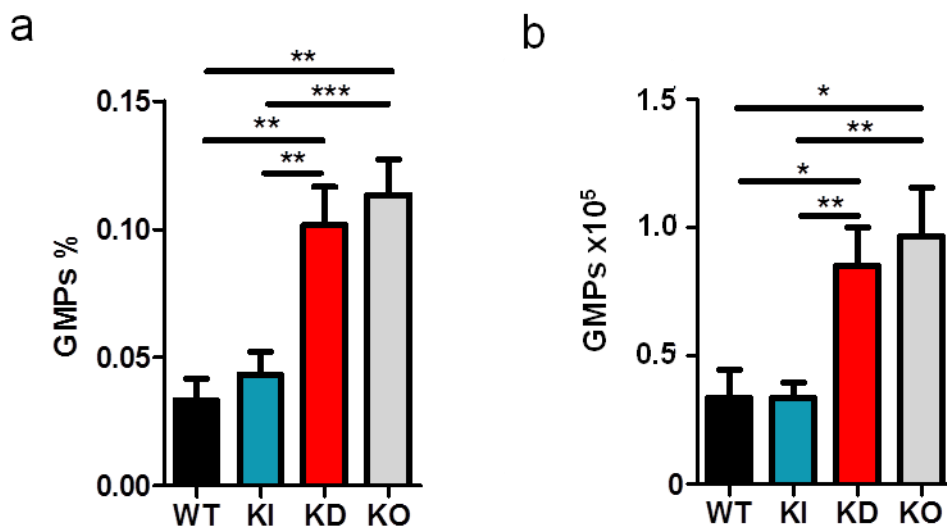
Mittels Färbung der KM-Zellen gegen die Oberflächenmarker (Mac-1 oder CD11b und Gr-1) wurden die Anteile von Monozyten und Granulozyten im KM der verschiedenen Mausstämme bestimmt. GFI1-KD- und *Gfi1*-KO-Mäuse zeigten einen Arrest in der myeloiden Differenzierung. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Anteil von Granulozyten in GFI1-KD- und in *Gfi1*-KO-Mäusen um das 10-fache erniedrigt war (Abbildung 14a, b, c, d). Andererseits ist der Anteil an Monozyten in diesen Tieren dieser Genotypen mehr als verdoppelt. Die Expansion dieser Vorläuferzellen stellt eine größere Wahrscheinlichkeit dar, dass diese Zellen durch additiv eintretene Mutationen zu Blasten formatieren könnten.



**Abbildung 14: Einfluss der verschiedenen GFI1-Expressionslevel auf die Hämatopoese.** a) FACS-Daten von KM von Mäusen mit verschiedenen Genotypen. Links: Prozentualer Anteil der Monozyten, rechts: prozentualer Anteil der Granulozyten. Gfi1-WT- und GFI1-KI-Mäuse unterschieden sich nicht im prozentualen Anteil an Monozyten und Granulozyten. GFI1-KD- und Gfi1-KO-Mäuse zeigten einen deutlich erhöhten Anteil an Monozyten, allerdings einen stark reduzierten Anteil an Granulozyten. b) Wright-Giemsa Färbung von KM-Cytospins von Mäusen verschiedener Genotypen (Markierung entspricht 20 µm). c) Prozentualer Anteil an Monozyten im KM von Mäusen mit verschiedenen Genotypen. (n= 4 Gfi1-WT, n=4 GFI1-KI, n=4 GFI1-KD, n=4) \*\*\*p=0,0002. d) Totale Anzahl an Monozyten im KM von Mäusen mit verschiedenen Genotypen (n= 4 Gfi1-WT, n=4 GFI1-KI, n=4 GFI1-KD); \*\*\*p=0,0003. e) Prozentualer Anteil an Granulozyten im KM der verschiedenen Mausgenotypen (n= 4 Gfi1-WT, n=4 GFI1-KI, n=4 GFI1-KD) \*\*\*\*p<0,0001. f) Totale Anzahl an Granulozyten im KM von Mäusen mit verschiedenen Genotypen (n= 4 Gfi1-WT, n=4 Gfi1-KI, n=4 Gfi1-KD); \*\*\*\*p<0,0001. WT=Gfi1-WT; KI=GFI1-KI; KD=GFI1-KD; KO=Gfi1-KO.

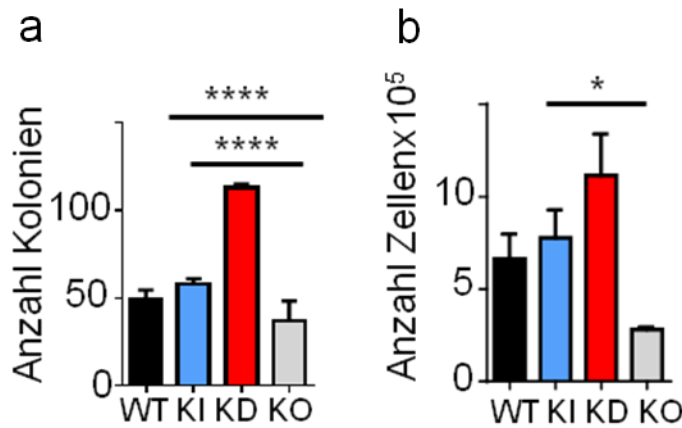
Es ist bekannt, dass LSCs aus GMPs hervorgehen können (Goardon *et al.*, 2011; Ye *et al.*, 2015). Bereits Hock *et al.* (2003) konnten zeigen, dass der Anteil von GMPs im KM von Gfi1-KO-Mäusen erhöht ist (Hock *et al.*, 2003). Aufgrund dessen wurde untersucht, ob auch schon ein KD der GFI1-Expression zu einer veränderten Anzahl

an GMPs im KM führt. Es wurden KM-Zellen mit Antikörpern, die spezifisch für die Oberflächenmarker von GMPs sind, gefärbt. Es ist zu erkennen, dass auch der KD der *GFI1*-Expression bereits zu einer Erhöhung des Anteils an GMPs im KM führte. Im Vergleich zu *Gfi1*-WT-Mäusen oder *GFI1*-KI-Mäusen war der prozentuale Anteil an GMPs signifikant erhöht (Abbildung 15a, b). Eine erhöhte Anzahl an GMPs könnte die Wahrscheinlichkeit einer AML-Progression steigern. Denn es ist bekannt, dass sich maligne Zellen in der AML aus unreifen myeloiden oder hämatopoietischen Vorläuferzellen entwickeln (Fialkow, 1976).



**Abbildung 15: *GFI1*-KD- und *Gfi1*-KO-Mäuse generieren mehr GMPs.** a) Prozentualer Anteil an GMPs ( $Lin^{-}$ ,  $Kit^{+}$ ,  $Sca^{-}$ ,  $CD34^{+}$ ,  $CD16/32^{+}$  KM-Zellen) ( $n=6$  *Gfi1*-WT,  $n=6$  *GFI1*-KI,  $n=6$  *GFI1*-KD,  $n=4$  *Gfi1*-KO)  $**p<0,0073$ ;  $**p=0,0007$ . b) Totale Anzahl an GMPs ( $Lin^{-}$ ,  $Kit^{+}$ ,  $Sca^{-}$ ,  $CD34^{+}$ ,  $CD16/32^{+}$  KM-Zellen) ( $n=6$  *Gfi1*-WT,  $n=6$  *GFI1*-KI,  $n=6$  *GFI1*-KD)  $*p<0,02$ ;  $**p<0,009$ . Sowohl *GFI1*-KD- als auch *Gfi1*-KO-Mäuse zeigten eine erhöhte Anzahl an GMPs. WT=*Gfi1*-WT; KI=*GFI1*-KI; KD=*GFI1*-KD; KO=*Gfi1*-KO.

Diesen Vorläuferzellen fehlen die sogenannten *lineage marker* und werden aufgrund dessen auch als *lineage negative* Zellen ( $Lin^{-}$ ) bezeichnet (Spangrude, 1989). Um die Rolle der verschiedenen *Gfi1*/*GFI1*-Level auf das Proliferationsverhalten der Vorläuferzellen zu untersuchen, wurden diese aus dem KM isoliert und in semisolidem Medium ausgesät. Nach acht Tagen wurden die Kolonien und die Zellzahl bestimmt (Abbildung 16a, b).

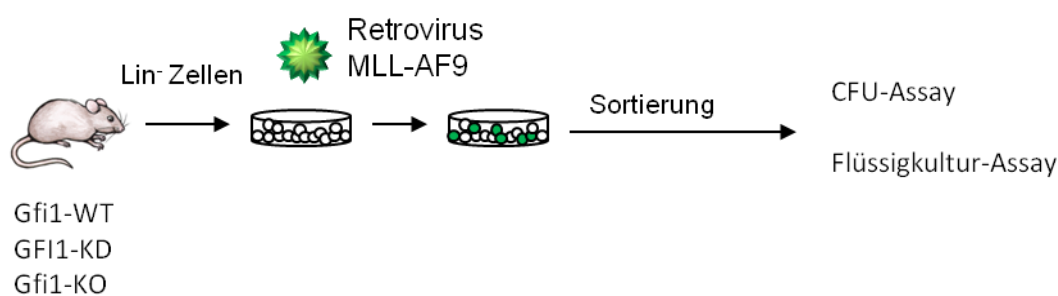


**Abbildung 16: CFU-Assay von Lin-Zellen der Mäuse mit verschiedenen Genotypen.**  
a) Anzahl der Kolonien in Methylcellulose (1000 Zellen ausgesät) nach 7 Tagen. Gezeigt werden die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments von insgesamt vier Experimenten. Im Vergleich zu *Gfi1*-WT-KM, *GFI1*-KI-KM und *Gfi1*-KO-KM bildet *GFI1*-KD-KM doppelt so viele Kolonien. \*\*\*\* $p < 0,0001$  b) Anzahl der Zellen in Methylcellulose (1000 Zellen ausgesät) nach 7 Tagen. Gezeigt wird ein repräsentatives Experiment von insgesamt vier Experimenten. Im Vergleich zum WT und KI generiert der KD signifikant mehr Zellen. Der KO generiert von allen Genotypen die wenigsten Zellen.  $p^* = 0,04$ . WT=*Gfi1*-WT; KI=*GFI1*-KI; KD=*GFI1*-KD; KO=*Gfi1*-KO.

Im Vergleich zu *Gfi1*-WT-KM oder *GFI1*-KI-KM bildet *GFI1*-KD-KM ca. doppelt so viele Kolonien. Im Gegensatz dazu bilden die Lin<sup>-</sup>-Zellen des *Gfi1*-KO-KM ca. 25% weniger Kolonien als das KM der *Gfi1*-WT- oder der *GFI1*-KI-Mäuse. Des Weiteren ist auch die Zellzahl bei den Kolonien des *GFI1*-KD-KM im Vergleich zum *Gfi1*-WT-KM signifikant erhöht. Das KM der *GFI1*-KD-Mäuse zeigte eine ca. 60% höhere Proliferationsrate als das KM der *Gfi1*-WT-Mäuse. Beim Vergleich zwischen *Gfi1*-WT und *Gfi1*-KO fällt auf, dass die Lin<sup>-</sup>-Zellen der *Gfi1*-KO-Maus eine deutlich geringere Proliferationsrate aufweisen. Bei *Gfi1*-KO-Mäusen ist die Proliferation verglichen mit den *Gfi1*-WT-Mäusen um ca. 40% erniedrigt (Abbildung 16). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das KM der *GFI1*-KD-Mäuse verglichen mit dem KM der *Gfi1*-WT- und *GFI1*-KI-Mäusen eine signifikant höhere Proliferationsrate aufweist. Diese gesteigerte Proliferation der Vorläuferzellen der *GFI1*-KD-Mäuse könnte eine mögliche Ursache für eine prädisponierte AML-Entstehung darstellen.

### 7.2.1 *GFI1*-KD und der Verlust vom *GFI1*-Gen beschleunigt die AML-Progression im *MLL-AF9*-Mausmodell

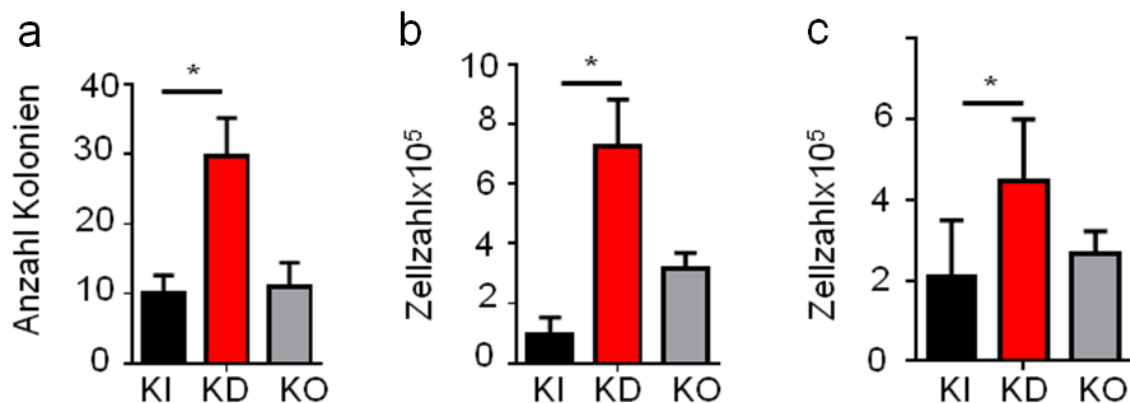
Die zuvor beschriebenen Ergebnisse erklärten die verschiedenen *GFI1*/*Gfi1*-Phänotypen in einem physiologischen Zustand. Um die Vermutung, dass der KD der *GFI1*-Expression eine AML-Entstehung beschleunigen kann, wurden weitere Untersuchungen gemacht. Es wurde sowohl in Mäusen, als auch im Menschen gezeigt, dass AML-Stammzellen aus *GMPs* hervorgehen können (Ye *et al.*, 2015). Um dies zu überprüfen, wurden *Lin*<sup>-</sup>-Zellen (Population enthält *GMPs*) aus dem KM von *GFI1*-KD-, *Gfi1*-KO-, und *GFI1*-KI-Mäusen separiert und mit einem retroviralen Konstrukt, welches das humane Onkofusionsprotein *MLL-AF9*, bedingt durch eine Translokation (t(9;11)(p22;q23) exprimiert, infiziert. Diese Translokation wird häufig bei AML-Patienten beobachtet und es ist bekannt, dass es eine AML in Mäusen induzieren kann (Krivtsov *et al.*, 2006). Erfolgreich infizierte Zellen exprimieren auch *green fluorescent protein* (GFP), so dass transfizierte Zellen sortiert werden konnten. Das Plasmid des Retrovirus ist so konstruiert, dass die Sequenz des GFP über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) mit der Sequenz für das Onkofusionsprotein *MLL-AF9* verbunden ist (Krivtsov *et al.*, 2006). Dies ermöglicht eine unabhängige Expression des GFPs und verhindert somit die Beeinflussung des Onkofusionsproteins ohne dessen Proteinstruktur zu verändern. Nach erfolgreicher Transfektion wurden GFP<sup>+</sup>-Zellen sortiert und in semisolidem Medium für einen Kolonietest und in Flüssigmedium für Proliferationsanalysen ausgesät (Abbildung 17).



**Abbildung 17: Schematische Darstellung des *MLL-AF9* in vitro-Experiments.** *Lin*<sup>-</sup>-Zellen von Mäusen mit verschiedenen Genotypen wurden isoliert und mit einem *MLL-AF9* exprimierenden Retrovirus transduziert. Nach Sortierung der Zellen wurden 5000 GFP<sup>+</sup>-Zellen in Flüssigmedium (SCM) oder semisolidem Medium (CFU-Assay) ausgesät.

Im Vergleich zu *GFI1*-KI- und *Gfi1*-KO-Zellen zeigten die Zellen von *GFI1*-KD-Mäusen eine dreifach erhöhte Anzahl an Kolonien im semisolidem Medium. Des

Weiteren generierten die leukämischen Zellen des *GFI1*-KD fast siebenmal so viele Zellen als die *GFI1*-KI-Kulturen und doppelt so viele Zellen als die *Gfi1*-KO-Kulturen (Abbildung 18 a, b). Auch in der Flüssigkultur wuchsen die transduzierten Zellen mit dem *GFI1*-KD-Phänotyp doppelt so stark, als die Zellen der *GFI1*-KI- oder der *Gfi1*-KO-Maus. (Abbildung 18c). Demnach erhöht der KD von *GFI1* die Proliferationsrate und die Koloniebildung bei transduzierten leukämischen Zellen *in vitro*.



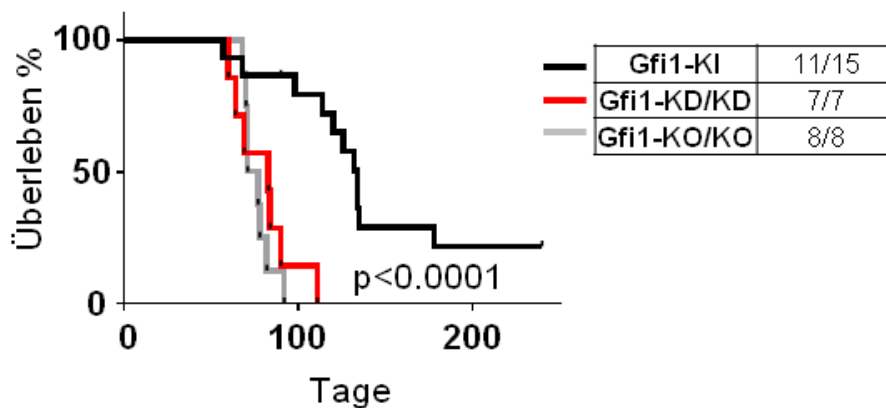
**Abbildung 18: Schematische Darstellung der Isolation von  $Lin^-$ -Zellen der jeweiligen Mausstämme und Transduktion der Zellen mit einem MLL-AF9 exprimierenden Retrovirus.**  $Lin^-$ -Zellen wurden isoliert und mit einem MLL-AF9 exprimierenden Retrovirus transfiziert. Nach dem Sortieren wurden die Zellen in Methylcellulose oder Flüssigkultur ausgesät. a) Anzahl der Kolonien in Methylcellulose (1000 Zelle wurden ausgesät) und nach 7 Tagen gezählt. Der *GFI1*-KD zeigt signifikant mehr Kolonien als der *Gfi1*-KI (\* $p=0,025$ ). b) Anzahl der Zellen in Methylcellulose. Der *GFI1*-KD zeigt signifikant mehr Zellen als der *Gfi1*-KI (\* $p=0,035$ ). c) Anzahl der Zellen in Flüssigkultur (3000 Zellen wurden ausgesät). Nach 7 Tagen wurden die Zellen ausgezählt. Der *GFI1*-KD zeigt signifikant mehr Zellen als der *Gfi1*-KI (\* $p=0,015$ ). Gezeigt wird ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten. KI= *GFI1*-KI; KD=*GFI1*-KD, KO=*Gfi1*-KO

Um zu untersuchen, ob der KD der *GFI1*-Expression auch einen Einfluss auf die Progression einer AML *in vivo* hat, wurden  $Lin^-$ -Zellen von *GFI1*-KD- und *GFI1*-KI-Mäusen mit dem MLL-AF9-Retrovirus transduziert. Empfängermäuse wurden letal bestrahlt und mit den transduzierten leukämischen Zellen transplantiert (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Schematische Darstellung des MLL-AF9-Transplantationsexperiments.** Lin<sup>-</sup>-Zellen der jeweiligen Mausstämmen wurden isoliert und mit einem MLL-AF9-exprimierenden Retrovirus transduziert. 100.000 GFP<sup>+</sup>-Zellen wurden in letal bestrahlte Empfängermause transplantiert.

Mäuse, welche mit den *Gfi1*-KD-*MLL-AF9*-Zellen und *Gfi1*-KO-*MLL-AF9*-Zellen transplantiert wurden, zeigten eine signifikant ( $p < 0,0001$ ) schnellere AML-Entwicklung als die Mäuse, die mit den *Gfi1*-KI-*MLL-AF9*-Zellen transplantiert wurden (Abbildung 20).

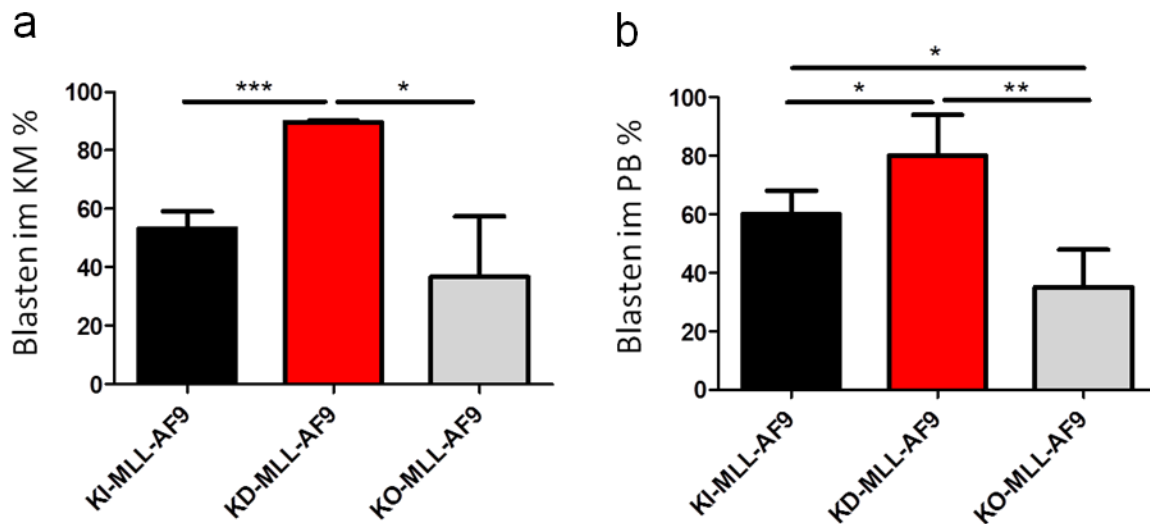


**Abbildung 20: *Gfi1*-KD- und *Gfi1*-KO-Zellen zeigen eine erhöhte AML-Induktion im *MLL-AF9*-Transplantationsmodell.** Mäuse die mit *Gfi1*-KD- und *Gfi1*-KO-*MLL-AF9*-Zellen transplantiert wurden, zeigten ein signifikant kürzeres Überleben als Mäuse die mit *Gfi1*-KI-*MLL-AF9*-Zellen transplantiert wurden. Die Zahlen zeigen, wie viele Mäuse an einer AML erkrankt waren. Alle *Gfi1*-KD-*MLL-AF9* und *Gfi1*-KO-*MLL-AF9*-Mäuse entwickelten eine AML entwickelt, im Vergleich zu 11 von 15 *Gfi1*-KI-*MLL-AF9*-Mäusen, die eine AML entwickelten.

Die Mäuse, welche mit den *Gfi1*-KD-*MLL-AF9*-Zellen transplantiert wurden, hatten ein Medianesüberleben von 83 Tagen und die transplantierten *Gfi1*-KO-*MLL-AF9*-Mäuse hatten ein medianes Überleben von 78 Tagen, wohingegen die *Gfi1*-KI-*MLL-AF9*-Mäuse 134 Tage überlebten. Das KM und die Milzzellen aller Mäuse wurde mittels FACS-Analyse analysiert, um festzustellen, ob sie an einer AML erkrankt waren. Neben der Analyse des KMs und der Milzzellen wurden auch Blutbilder und Blutaussstriche angefertigt. Die transplantierten *Gfi1*-KD-Mäuse hatten 1,7-fach mehr

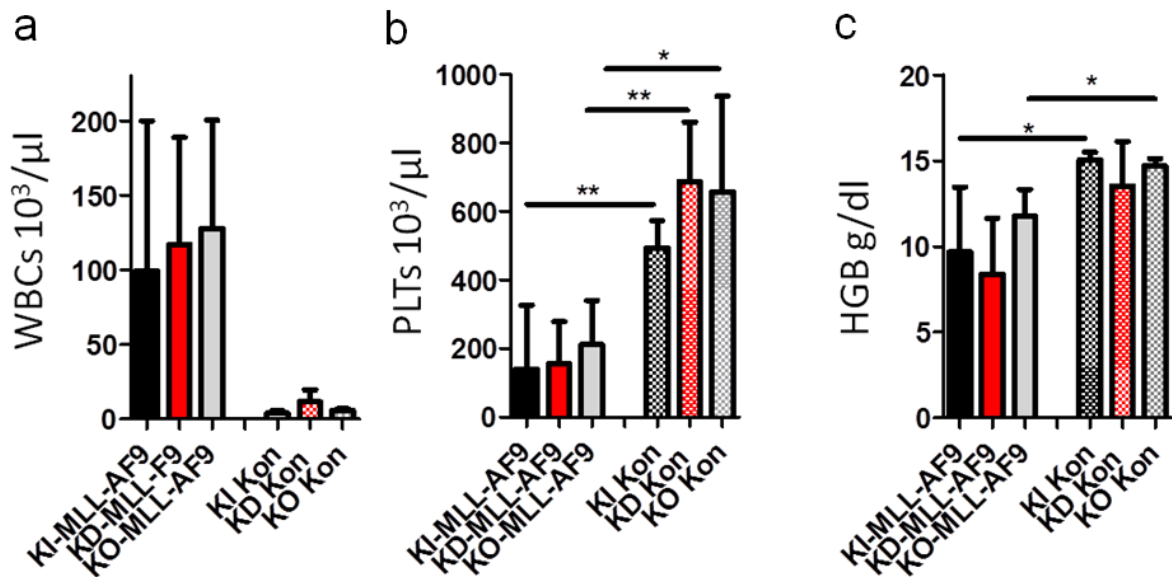


Blasten im KM, als die *GFI1*-KI-Mäuse. Des Weiteren war auch die Anzahl an Blasten im peripheren Blut der transplantierten *GFI1*-KD-Mäuse im Vergleich zu den *GFI1*-KI-Mäusen signifikant erhöht (Abbildung 21a). Die transplantierten *Gfi1*-KO-Mäuse zeigten weder einen Unterschied zum prozentualen Anteil der Blasten im KM, noch im peripheren Blut im Vergleich zu den transplantierten *GFI1*-KI-*MLL*-*AF9*-Mäusen (Abbildung 21b).



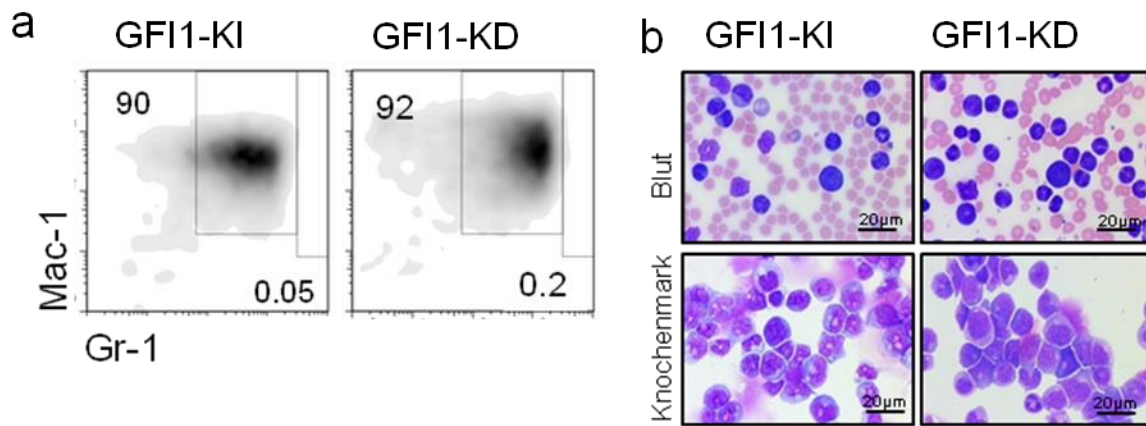
**Abbildung 21: Transplantierte *GFI1*-KD-*MLL*-*AF9*-Mäuse zeigten einen höheren Anteil an Blasten im KM und peripheren Blut als *GFI1*-KI- und *Gfi1*-KO-*MLL*-*AF9*-Mäuse.** a) Prozentualer Anteil der Blasten im KM der mit *MLL*-*AF9* transplantierten Mäuse. Die *GFI1*-KD-Mäuse ( $n=3$ ) zeigten 30% mehr Blasten im KM als die *GFI1*-KI-Mäuse ( $n=3$ ). Die *Gfi1*-KO-Mäuse ( $n=3$ ) zeigten keinen signifikanten Unterschied zu den *GFI1*-KI-Mäusen ( $*p=0,0116$ ;  $***p=0,0004$ ). b) Prozentualer Anteil der Blasten im peripheren Blut (PB). Die *GFI1*-KD-*MLL*-*AF9* transplantierten Mäuse ( $n=3$ ) zeigten 20% mehr Blasten im Vergleich mit den *GFI1*-KI-*MLL*-*AF9*-Mäusen ( $n=3$ ) ( $*p=0,05$ ). Die *Gfi1*-KO-*MLL*-*AF9* transplantierten Mäuse ( $n=3$ ) zeigten 50% weniger Blasten im PB als die *GFI1*-KI-*MLL*-*AF9*-Mäuse ( $*p=0,017$ ) und weniger als 50% im Vergleich zu den *GFI1*-KD-*MLL*-*AF9*-Mäusen ( $**p=0,0033$ ).

Auch die Analyse des peripheren Blutes der erkrankten Mäuse bestätigte, dass diese an AML erkrankt waren. Transplantierte Mäuse zeigten eine bis um 15-fach erhöhte Anzahl an weißen Blutzellen (*white blood cells*, WBCs) und eine erniedrigte Anzahl von Thrombozyten (*platelets*, PLTs) (Abbildung 22). Ferner waren auch die Werte für Hämoglobin (HGB) im Blut der transplantierten verringert (Abbildung 22a, b, c).



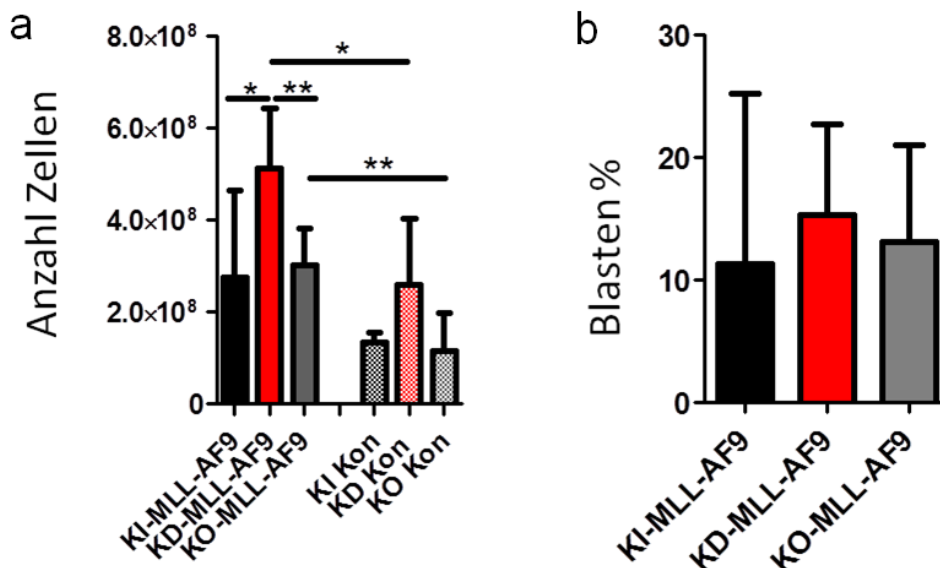
**Abbildung 22: Analyse des PBs der MLL-AF9-transplantierten Mäuse.** a) Anzahl der WBCs im peripheren Blut der mit MLL-AF9 transplantierten Mäuse im Vergleich zu gesunden Mäusen. b) Anzahl der PLTs im peripheren Blut der transplantierten Mäuse im Vergleich zu gesunden Mäusen. \* $p=0,01$ ; \*\* $p<0,004$ . c) Menge an HGB der transplantierten Mäuse im Vergleich zu gesunden Mäusen. \* $p<0,04$ . (KI-MLL-AF9= *Gfi1*-KI-MLL-AF9 ( $n=11$ ), KD-MLL-AF9= *Gfi1*-KD-MLL-AF9 ( $n=6$ ), KO-MLL-AF9 = *Gfi1*-KO-MLL-AF9 ( $n=7$ ), KI Kon= *Gfi1*-KI-Kontrolle ( $n=3$ ), KD Kon= *Gfi1*-KD-Kontrolle ( $n=3$ ), KO Kon= *Gfi1*-KO-Kontrolle ( $n=3$ )).

Wie bereits oben erwähnt, kommt es während einer AML zu einem Differenzierungsblocks in der myeloiden Reihe der Hämatopoese (Estey and Dohner, 2006). Daraus resultierend sollte nur noch ein geringer Anteil an differenzierten Zellen wie Granulozyten im KM vorhanden sein. Die KM-Zellen der erkrankten Mäuse wurden nach Lyse der Erythrozyten mit Antikörpern gegen Mac-1 und Gr-1 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Den Daten ist zu entnehmen, dass es zu einer drastischen Erhöhung (90%) von Mac-1<sup>+</sup>- und Gr-1<sup>+</sup>-Zellen gekommen war (Abbildung 23a). Darüber hinaus ist in Abbildung 23b auch mikroskopisch eine Ansammlung von Blasten sowohl im KM als auch im peripheren Blut zu erkennen (Abbildung 23b).



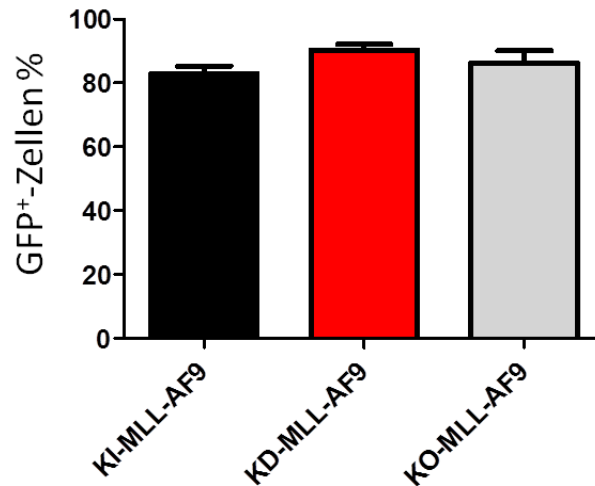
**Abbildung 23: Erhöhung der Blastenzahl in MLL-AF9 transplantierten Mäusen.** a) Durchflusszytometrische Analyse der Mac-1+, Gr-1+ und doppelt positiven Zellen des KMs der transplantierten Mäuse. b) Blutausstriche und Cytospins vom KM der transplantierten Mäuse mit MLL-AF9-Expression.

Nachfolgend wurde auch die Gesamtzellzahl der Milzzellen bestimmt. Auch hier konnte bei den transplantierten Mäusen eine Splenomegalie beobachtet werden. Allerdings gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Tieren mit den unterschiedlichen Genotypen (Abbildung 24a, b).



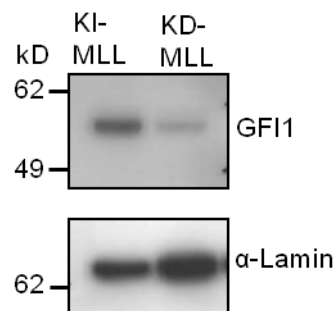
**Abbildung 24: MLL-AF9 transplantierte Mäuse entwickelten eine Splenomegalie** a) Graphische Darstellung der Gesamtzellzahl der Milzen der MLL-AF9 transplantierten Mäuse im Vergleich zu gesunden Kontrollmäusen. \* $p=0,0143$ , \*\* $p=0,0039$  b) Prozentualer Anteil der Blasten in der Milz der transplantierten Mäuse. KI-MLL-AF9= GFI1-KI-MLL-AF9 ( $n=11$ ), KD-MLL-AF9= GFI1-KD-MLL-AF9 ( $n=6$ ), KO-MLL-AF9= Gfi1-KO-MLL-AF9 ( $n=7$ ), KI Kon= GFI1-KI-Kontrolle ( $n=3$ ), KD Kon= GFI1-KD-Kontrolle ( $n=3$ ), KO Kon= Gfi1-KO-Kontrolle ( $n=3$ ).

Um sicher zustellen, dass sich die Leukämie aufgrund der Transplantation entwickelt hat und nicht als sekundäre Leukämie aus der Bestrahlung hervorgegangen ist, wurde der prozentuale Anteil an GFP<sup>+</sup>-Zellen im KM bestimmt (Abbildung 25).



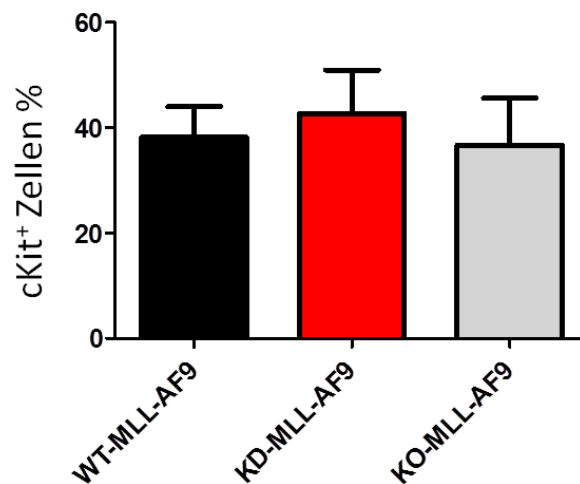
**Abbildung 25: Prozentualer Anteil GFP<sup>+</sup>-Zellen im KM der MLL-AF9 transplantierten Mäuse.** Mittels durchflusszytometrischer Analyse wurde der prozentuale Anteil GFP<sup>+</sup>-Zellen im KM der MLL-AF9 transplantierten Mäuse bestimmt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Genotypen festgestellt werden. Alle Mäuse zeigten einen prozentualen Anteil an GFP<sup>+</sup>-Zellen von über 80%. (KI-MLL-AF9= GFI1-KI-MLL-AF9 (n=11), KD-MLL-AF9= GFI1-KD-MLL-AF9 (n=6), KO-MLL-AF9= Gfi1-KO-MLL-AF9 (n=7)).

Des Weiteren wurde ein Western Blot des KMs gemacht, um zu überprüfen, ob die Bestrahlung erfolgreich war und ob sich die transplantierten Zellen angesiedelt und vermehrt hatten (Abbildung 26).



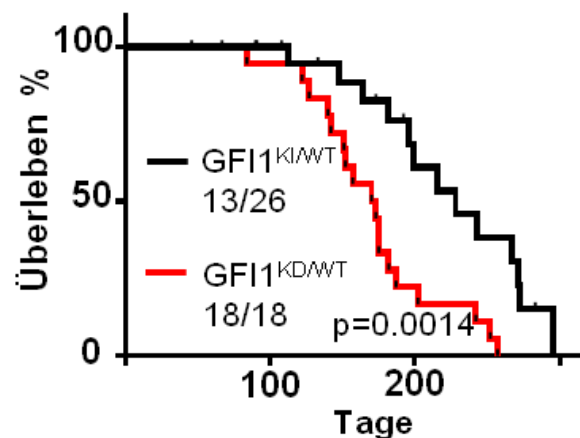
**Abbildung 26: GFI1-Proteinexpressionslevel im KM der transplantierten MLL-AF9-Mäuse.** Aus dem KM der verschiedenen transplantierten Mäuse wurde der nukleäre Extrakt separiert und mit 10 µg Protein ein Western Blot angefertigt. KI-MLL= GFI1-KI-MLL-AF9, KD-MLL= GFI1-KD-MLL-AF9

Aufgrund der verschiedenen Analysen konnte gezeigt werden, dass alle Mäuse eine Leukämie entwickelten. Außerdem konnten keine Unterschiede bezogen auf Oberflächenmarker, Zytologie oder der Anzahl an weißen Blutzellen festgestellt werden (Abbildung 22). Allerdings konnten höhere Anzahlen von Blasten im KM und im Blut von den *GFI1-KD-MLL-AF9*-Mäusen festgestellt werden (Abbildung 21). Des Weiteren wurde der prozentuale Anteil an cKit<sup>+</sup> (CD117)-Zellen im KM untersucht. cKIT ist ein Zytokinrezeptor, der auf der Oberfläche von hämatologischen Stammzellen exprimiert wird. cKit spielt eine Rolle in einem Rezeptor-Tyrosinkinase-Signalweg und beeinflusst das Zellwachstum, die Proliferation und die Differenzierung von Zellen (Sharma et al. 2007). Darüber hinaus konnten Mutationen im *KIT*-Gen oder Überexpressionen von *KIT* zur Krebsentstehung führen (Huret et al., 2013). Ausdifferenzierte Zellen exprimieren im Normalfall kein cKit mehr. Mittels durchflusszytometrischer Analyse wurde der prozentuale Anteil cKit<sup>+</sup>-Zellen im KM bestimmt. Es konnte kein signifikanter Unterschied an cKit<sup>+</sup>-Zellen im KM der transplantierten Mäuse detektiert werden (Abbildung 27). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass niedrige *GFI1*-Expressionslevel eine wesentliche Rolle bei der Progression durch das Onkofusionsprotein MLL-AF9 induzierter AML spielen.



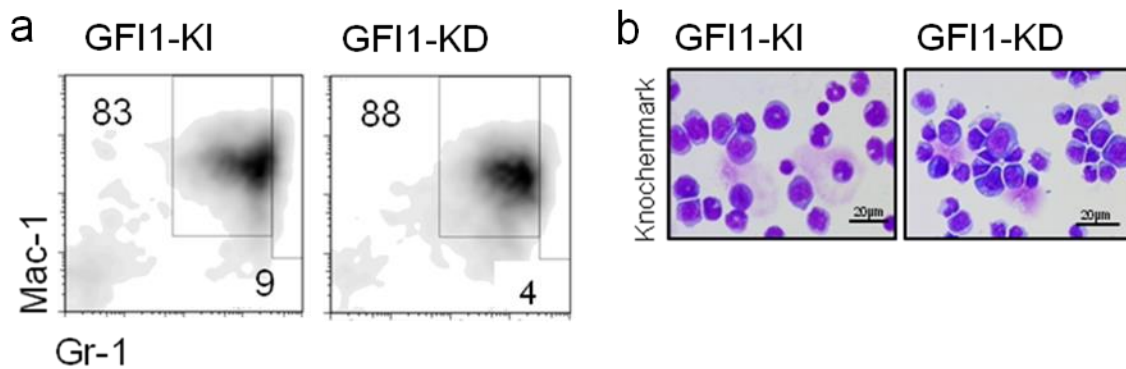
**Abbildung 27: Graphische Darstellung der cKit<sup>+</sup>-Zellen im KM der MLL-AF9 transplantierten Mäuse.** Es gab keinen signifikanten Unterschied im prozentualen Anteil an cKit<sup>+</sup> Zellen der MLL-AF9 transplantierten Mäuse. KI-MLL-AF9= *GFI1-KI-MLL-AF9* (n=11), KD-MLL-AF9= *GFI1-KD-MLL-AF9* (n=6), KO-MLL-AF9= *Gfi1-KO-MLL-AF9* (n=7).

Um den Effekt von GF11 auch in einem anderen *In-vivo*-Modell zu untersuchen, wurden *MLL-AF9*-transgene Tiere (Chen *et al.*, 2008) mit *GF11*-KD- und *GF11*-KI-Mäusen verpaart und gezüchtet. Es konnte beobachtet werden, dass der heterozygote *GF11*-KD-Genotyp im Vergleich zu den *GF11*-KI-Mäusen, die Leukämieentwicklung signifikant beschleunigte ( $p=0.0014$ ) (Abbildung 28). Die heterozygoten *GF11*-KD-Mäuse (*GF11*-KD/WT) zeigten ein medianes Überleben von 172 Tagen. Im Gegensatz dazu zeigten die heterozygoten *GF11*-KI-Mäuse (*GF11*-KI/WT) ein medianes Überleben von 228 Tagen.



**Abbildung 28: Der *GF11*-KD-Genotyp zeigte eine beschleunigte AML-Progression im *MLL-AF9*-Mausmodell.** Die Kaplan-Meier Kurve zeigt einen signifikanten Unterschied im Überleben der heterozygoten *GF11*-KI- und *GF11*-KD-*MLL-AF9* transgenen Tiere. Die heterozygoten *GF11*-KD-Mäuse zeigten ein kürzeres Überleben im Vergleich zu den *GF11*-KI/WT Mäusen. Die Zahlen hinter den Genotypen zeigen, wie viele entsprechenden Mäuse an einer AML erkrankten.

Während der Zucht ( $n=150$ ) wurden niemals Mäuse geboren, die zwei *GF11*-KD Allele trugen. Dies lässt vermuten, dass die Kombination zwischen *GF11*-KD/KD und *MLL-AF9* embryonal letal ist. Wie bereits bei den Experimenten mit den *MLL-AF9*-Retrovirus konnten auch hier keine Unterschiede in der Mikroskopie und der Zelloberflächenmarker verzeichnet werden (Abbildung 29).



**Abbildung 29: GFI1-KI- und GFI1-KD-MLL-AF9-transgene Mäuse zeigen keinen Unterschied bezüglich der Anzahl an Mac-1<sup>+</sup>- und Gr-1<sup>+</sup>-Zellen** a) Durchflusszytometrische Analyse der Mac-1<sup>+</sup> und Gr-1<sup>+</sup> und doppelt positiven Zellen des KMs der MLL-AF9-transgenen Mäuse. b) Cytospins vom KM der transgenen MLL-AF9 Mäuse.

## 7.2.2 GFI1-KD und der Verlust eines GFI1-Allels beschleunigt die AML-Progression im NUP98/HOXD13-Mausmodell

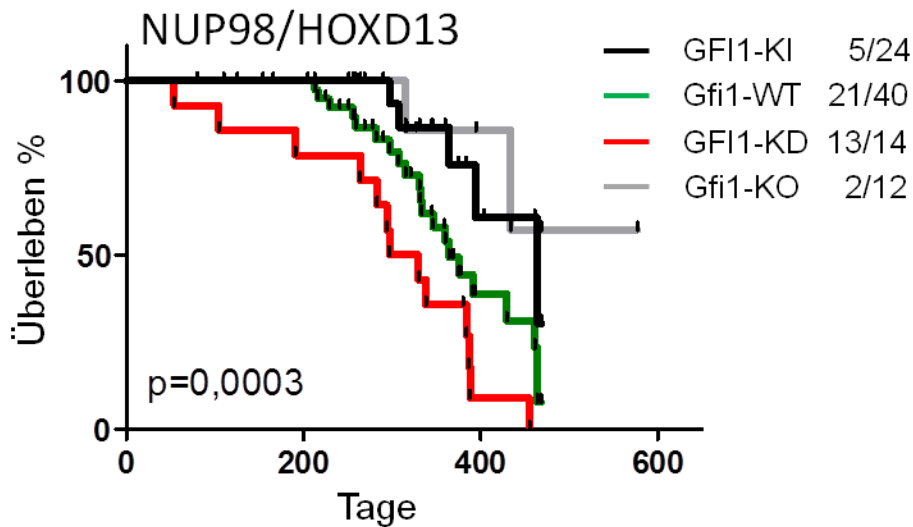
Wie oben bereits beschrieben, entwickeln ca. 33% der MDS Patienten im späteren Verlauf der Krankheit eine AML. Um zu untersuchen, ob auch hier das Expressionslevel von *GFI1* eine Auswirkung auf die Progression einer sekundären AML hat, wurde das *NUP98/HOXD13* Mausmodell verwendet.



**Abbildung 30: Schematische Darstellung der Kreuzung zwischen den verschiedenen GFI1-Mausstämmen mit den NUP98/HOXD13-Mäusen.** Die verschiedenen *GFI1*-Mausstämme wurden mit den *NUP98/HOXD13*-Mäusen verkreuzt.

Diese Mäuse exprimieren das humane NUP98/HOXD13-Onkofusionsprotein (Lin *et al.*, 2005) und rekapitulieren die t(2;11)(q31;p15) Translokation. Ferner zeigen diese Mäuse typische Symptome eines MDS, wie Dysplasie sowie eine erhöhte Apoptoserate und 90% der transgenen Mäuse entwickeln im späteren Verlauf eine AML. Es wurden die Mäuse mit den verschiedenen *GFI1*-Mausstämmen mit den *NUP98/HOXD13*-Mäusen verpaart (Abbildung 30) und hinsichtlich der Symptome

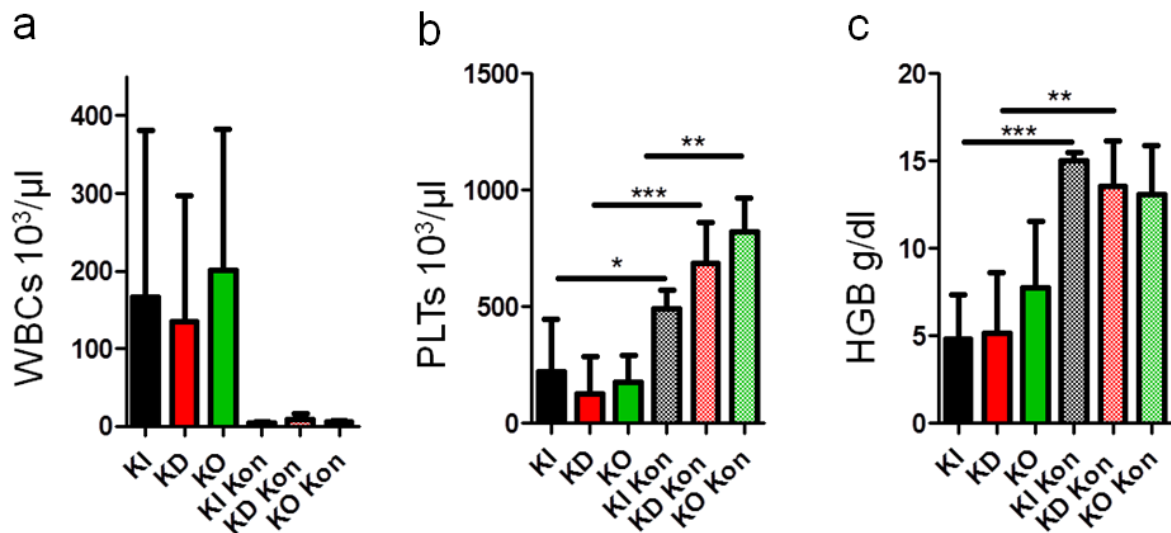
einer AML beobachtet. Der KD der *GFI1*-Expression erhöhte die AML-Inzidenz und verkürzte die Latenzzeit bis zur AML-Entwicklung signifikant ( $p=0,0003$ ) im Vergleich zu den *GFI1*-KI-, *Gfi1*-WT- oder *Gfi1*-KO Mäusen (Abbildung 31).



**Abbildung 31: GFI1-KD beschleunigte die AML-Entwicklung in NUP98/HOXD13 transgenen Mäusen.** Die Kaplan-Meier Kurve zeigt das AML-freie Überleben der Mäuse mit verschiedenen Genotypen. Ein verringertes GFI1-Level (GFI1-KD) beschleunigt die AML-Entwicklung, wohingegen der komplette Verlust von Gfi1 (Gfi1-KO) die AML-Entwicklung im NUP98/HOXD13-Modell verlangsamt. Die Zahlen hinter den verschiedenen Mäusen zeigen, wie viele Mäuse an einer AML. Beim GFI1-KI-Genotyp entwickelten 5 von insgesamt 24 Mäusen eine AML entwickelt. Beim GFI1-KD-Genotyp entwickelten 13 von 14 Mäusen eine AML, beim Gfi1-KO 2 von 12 Mäusen und beim Gfi1-WT-Genotyp entwickelten 21 von 41 Mäusen eine AML.

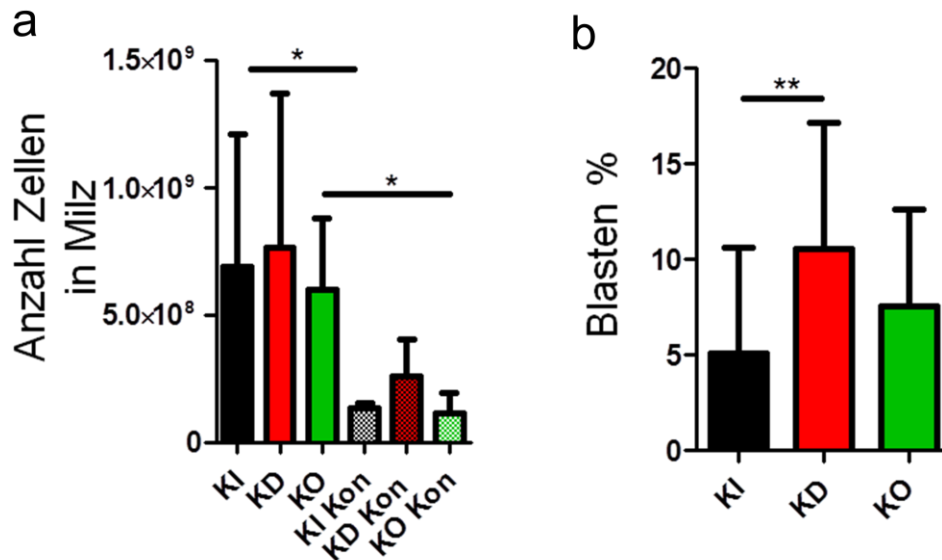
Auch hier wurden das KM und die Milzzellen mittels Oberflächenmarkerfärbung und Durchflusszytometrie analysiert, um nachzuweisen, dass es sich um eine AML handelt. Auch das periphere Blut wurde auf das Vorhandensein von Blasten untersucht. Die *NUP98/HOXD13* transgenen Mäuse zeigten im Gegensatz zu gesunden Kontrollmäusen eine starke Erhöhung der *WBCs* im peripheren Blut. Des Weiteren war die Anzahl an Thrombozyten (*platelets*, *PLT*) und die Menge an Hämoglobin (HGB) bei den transgenen Mäusen stark reduziert (Abbildung 32a, b, c). Demnach zeigten die Mäuse typische Anzeichen einer Thrombozytopenie und Anämie, was ein Indiz für eine AML ist.





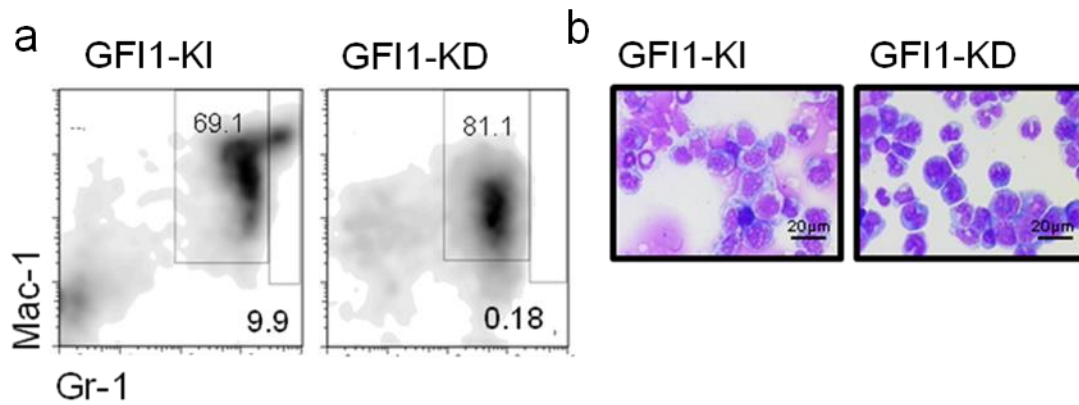
**Abbildung 32: Analyse des PBs der transgenen *NUP98/HOXD13*-Mäuse.** a) Anzahl der WBCs im PB der *NUP98/HOXD13* transgenen Mäuse. b) Menge an HGB im peripheren Blut der *NUP98/HOXD13* transgenen Mäuse  $**p=0.0013$ ;  $***p<0.0001$  c) Anzahl der PLTs im PB der *NUP98/HOXD13* transgenen Mäuse  $*p=0.039$ ,  $**p=0,0038$ ,  $***p<0.0001$ . KI= *GFI1*-KI-*NUP98/HOXD13* ( $n=24$ ), KD= *GFI1*-KD-*NUP98/HOXD13* ( $n=14$ ), KO=*Gfi1*-KO-*NUP98/HOXD13* ( $n=12$ ), KI Kon= *GFI1*-KI-Kontrolle ( $n=3$ ), KD=*GFI1*-KD-Kontrolle ( $n=3$ ), KO= *Gfi1*-KO-Kontrolle ( $n=3$ ).

Bei Betrachtung der Anzahl der Milzzellen fällt auf, dass alle *NUP98/HOXD13* transgenen Mäuse im Vergleich zu gesunden Mäusen eine stark erhöhte Zellanzahl aufwiesen. Demnach entwickelte ein Großteil der transgenen Mäuse eine Splenomegalie (Abbildung 33a), die bereits makroskopisch erkennbar war. Auffällig ist, dass die *GFI1*-KD-*NUP98/HOXD13*-Mäuse eine signifikante Erhöhung von Blasten in der Milz zeigten (Abbildung 33b).



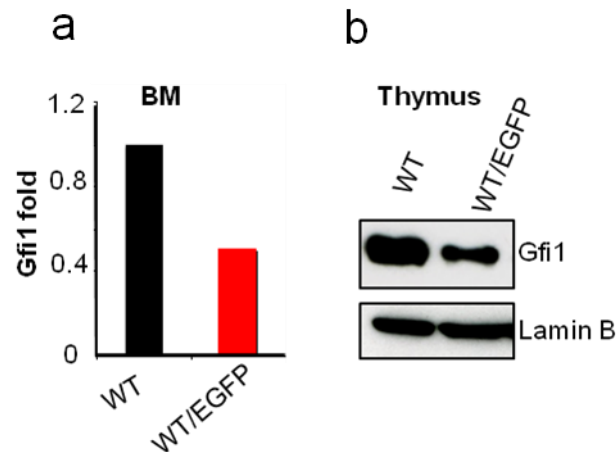
**Abbildung 33: Transgene NUP98/HOXD13-Mäuse zeigten eine Splenomegalie** a) Anzahl der Zellen in der Milz der NUP98/HOXD13 transgenen Mäuse im Vergleich zu gesunden Kontrollmäusen \* $p=0.017$ . b) Anzahl der Blasten in der Milz der NUP98/HOXD13 transgenen Mäuse \*\* $p=0.0085$ . KI= GFI1-KI-NUP98/HOXD13 ( $n=24$ ), KD= GFI1-KD-NUP98/HOXD13 ( $n=14$ ), KO=Gfi1-KO-NUP98/HOXD13 ( $n=12$ ), KI Kon= GFI1-KI-Kontrolle ( $n=3$ ), KD= GFI1-KD-Kontrolle ( $n=3$ ), KO= Gfi1-KO-Kontrolle ( $n=3$ ).

Die KM-Zellen der transgenen GFI1-KD-Mäuse zeigten eine Erhöhung von Mac-1<sup>+</sup>- und Gr-1<sup>+</sup>- doppelt-positiven-Zellen (80%) (Abbildung 34a). Es konnten keine Unterschiede bezogen auf die Anzahl der weißen Blutzellen im peripheren Blut (Daten nicht gezeigt) oder die zytologischen Beschaffenheit der KM-Zellen gemacht werden (Abbildung 34b). Im Vergleich zu gesunden Kontrollmäusen zeigten auch hier die für NUP98/HOXD13 transgenen Mäuse eine Splenomegalie (Daten nicht gezeigt). Dies lässt vermuten, dass auch in diesem Mausmodell ein vermindertes GFI1-Expressionslevel die AML-Progression beschleunigte.



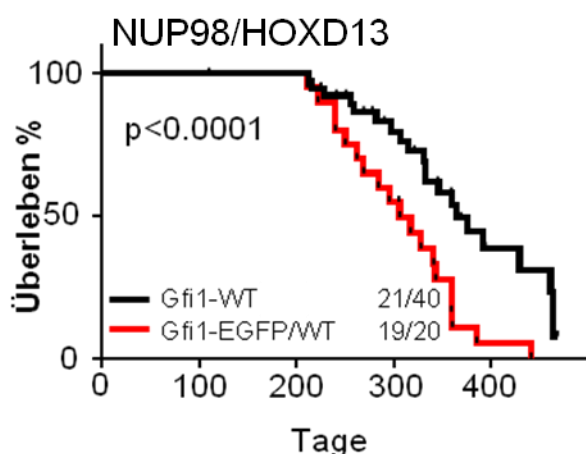
**Abbildung 34: GFI1-KD-NUP98/HOXD13 transgene Mäuse zeigten eine erhöhte Anzahl an Mac1<sup>+</sup>- und Gr1<sup>+</sup>-Zellen im KM.** a) Durchflusszytometrische Analyse von Mac-1<sup>+</sup> und Gr-1<sup>+</sup> positiven KM-Zellen der verschiedenen Mausgenotypen. b) Cytospins vom KM der verschiedenen Mausgenotypen.

Es wurde ein Western Blot vom leukämischen KM der Mäuse gemacht um zu überprüfen, ob GFI1 im jeweiligen Genotyp herunter reguliert ist. Des Weiteren wurden Mäuse gezüchtet, bei denen ein GFI1-Allel durch EGFP-cDNA ersetzt ist (*Gfi1*-WT/EGFP-KI) (Yucel et al. 2004). Dies erlaubt die *Gfi1*-Promotor-aktivität *in vivo* zu untersuchen. Diese *Gfi1*-WT/EGFP-KI-Mäuse exprimieren weniger *GFI1* als *GFI1*-KI-Mäuse. Mittels RT-PCR konnte gezeigt werden, dass das mRNA-Level im KM der *Gfi1*-WT/EGFP-KI-Mäusen um 50% reduziert (Abbildung 35a (in Kooperation mit dem Möröy Labor)). Auch auf Proteinebene konnte eine Reduktion von *Gfi1* in Thymuszellen um ca. 50% im Vergleich zum Wildtyp verzeichnet werden (Abbildung 35b (in Kooperation mit dem Möröy Labor)).



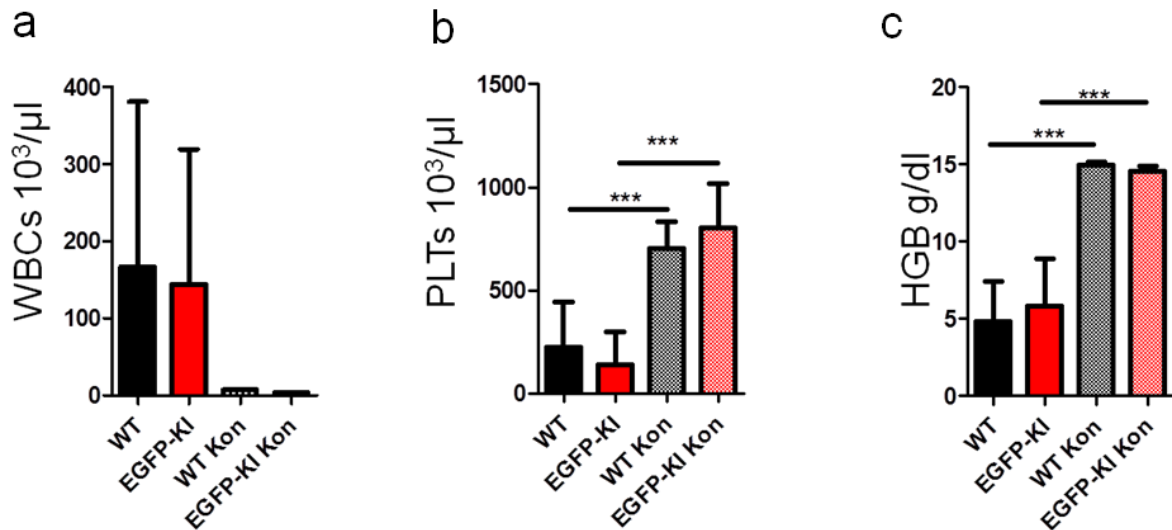
**Abbildung 35: *Gfi1*-WT/EGFP-KI Mäuse exprimieren weniger GF11.** a) Mittels Real-Time PCR wurde das *Gfi1* mRNA-Level im KM von den jeweiligen Genotypen bestimmt. b) Aus den Thymi der verschiedenen Genotypen wurde der nukleäre Extrakt separiert und die *Gfi1*-Proteinexpression via Western Blot analysiert (Diese Daten wurden in Kooperation mit dem Möröy Labor in Montreal (IRCM) generiert).

Die *Gfi1*-WT/EGFP-KI-Mäuse wurden mit den NUP98/HOXD13-Mäusen verpaart und hinsichtlich einer AML-Progression beobachtet. Die *Gfi1*-WT/EGFP-KI-NUP98/HOXD13-Mäuse zeigten im Vergleich zu *Gfi1*-WT-NUP98/HOXD13-Mäusen eine erhöhte AML-Inzidenz und eine verkürzte Latenzzeit bis zum Ausbruch einer AML (Abbildung 36). Das mediane AML-freie Überleben betrug bei den *Gfi1*-WT/EGFP-KI Mäusen 306 Tage. Die *Gfi1*-WT-Mäuse zeigten ein medianes AML-freies Überleben von 364 Tagen.



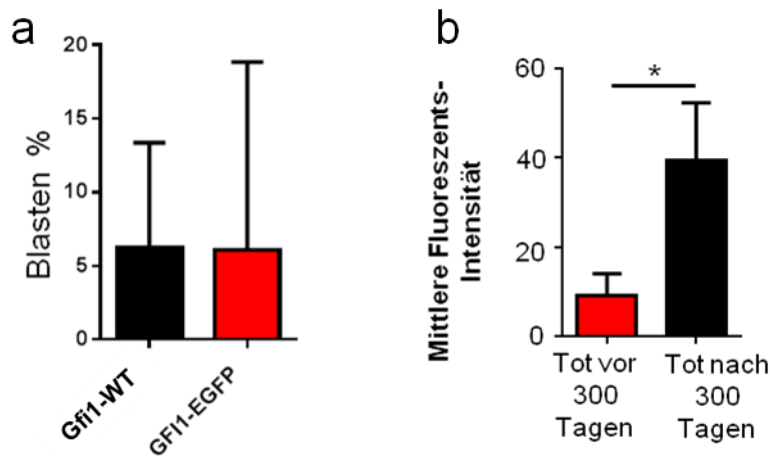
**Abbildung 36: Die *Gfi1*-WT/EGFP-KI-Nup98/HOXD13 transgenen Mäuse entwickelten schneller eine AML als *Gfi1*-WT-NUP98/HOXD13 Mäuse.** Die Kaplan-Meier Kurve zeigt das AML-freie Überleben der *Gfi1*-WT/EGFP-KI- und *Gfi1*-WT-NUP98/HOXD13 transgenen Mäuse. Die Zahlen zeigen, dass 21 von 40 *Gfi1*-WT-NUP98/HOXD13 und 19 von 20 *Gfi1*-WT/EGFP-KI-NUP98/HOXD13 Mäusen eine AML entwickelt haben.

Nachfolgend wurde das KM und die Zellen der Milz mittels Antikörperfärbung und FACS analysiert. Das periphere Blut wurde auf das Vorhandensein von Blasten untersucht. Die *NUP98/HOXD13*-transgenen Mäuse zeigten im Gegensatz zu gesunden Kontrollmäusen eine starke Erhöhung der WBCs im peripheren Blut. Die Anzahl der Thrombozyten und die Hämoglobinwerte waren im Vergleich zu den gesunden Kontrollen um die Hälfte reduziert (Abbildung 37a, b, c).



**Abbildung 37: Analyse des peripheren Bluts der *Gfi1*-WT/EGFP-KI- und *Gfi1*-WT - *NUP98/HOXD13* transgenen Mäuse.** a) Anzahl der WBCs im peripheren Blut. b) Anzahl der PLTs im peripheren Blut \*\*\* $p=0.0001$ . c) Mangel an HGB im peripheren Blut \*\*\* $p<0.0001$ . WT= *Gfi1*-WT-*NUP98/HOXD13* ( $n=21$ ), EGFP-KI= *Gfi1*-EGFP-KI-*NUP98/HOXD13* ( $n=19$ ), WT Kon= *Gfi1*-WT Kontrolle ( $n=3$ ), EGFP-KI Kon= *Gfi1*-EGFP-KI Kontrolle ( $n=3$ ).

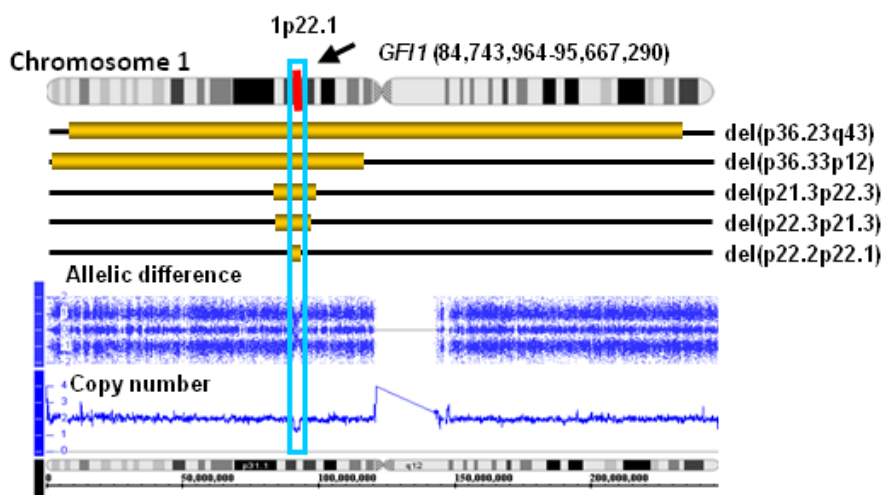
Es konnten auch hier keine Unterschiede bezogen auf Oberflächenmarker, Zytologie oder Anzahl der weißen Blutzellen gemacht werden. Des Weiteren konnte kein signifikanter Unterschied im prozentualen Anteil von Blasten im Milzgewebe detektiert werden (Abbildung 71).



**Abbildung 38: Mäuse mit geringerem Gfi1-Expressionslevel starben schneller an einer AML.** Mittels Durchflusszytometrie wurde die mittlere GFP-Fluoreszenz-Intensität in Blasten der *Gfi1*-WT/EGFP-KI-NUP98/HOXD13 transgenen Mäuse analysiert. Mäuse die vor 300 Tagen erkrankten ( $n=3$ ), zeigten eine geringere GFP-Intensität (*Gfi1*-Expression) als Mäuse, die nach 300 Tagen erkrankten ( $n=4$ ) \* $p=0,013$ .

Mittels durchflusszytometrischer Analyse wurde die mittlere GFP-Fluoreszenz-Intensität der *Gfi1*-WT/EGFP-KI-NUP98/HOXD13-transgener Mäuse untersucht. Auffällig war, dass das EGFP-Expressionslevel bei *Gfi1*-WT/EGFP-KI-NUP98/HOXD13 Mäusen die vor 300 Tagen erkrankten, signifikant geringer war, als bei Mäusen die später erkrankten (Abbildung 38). Dies lässt annehmen, dass der Verlust eines *GFI1*-Allels und somit eine verringerte *Gfi1*-Expression progredient für die Entwicklung einer Leukämie aus einer MDS ist.

Anschließend sollte die Frage geklärt werden, ob die Deletion eines *GFI1*-Allels auch eine Rolle in der Entwicklung von MDS/AML im Menschen spielt. Das *GFI1*-Gen liegt auf Chromosom 1p22, und es konnte bereits gezeigt werden, dass Chromosom 1-Deletionen mit der Initiation und Progression von MDS und AML assoziiert sind (Mori *et al.*, 2003). In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Maciejewski konnte die genaue minimale deletierte Region von fünf MDS-Patienten untersucht werden. Eine deletierte Region, die alle fünf Patienten gemeinsam hatten, umfasste den *GFI1*-Lokus. Ein Patient wies nur eine einzige Deletion auf, welche nur den *GFI1*-Lokus betraf (Abbildung 39). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Deletion eines *GFI1*-Allels eine mögliche Rolle in der Entwicklung des MDS spielen könnte.



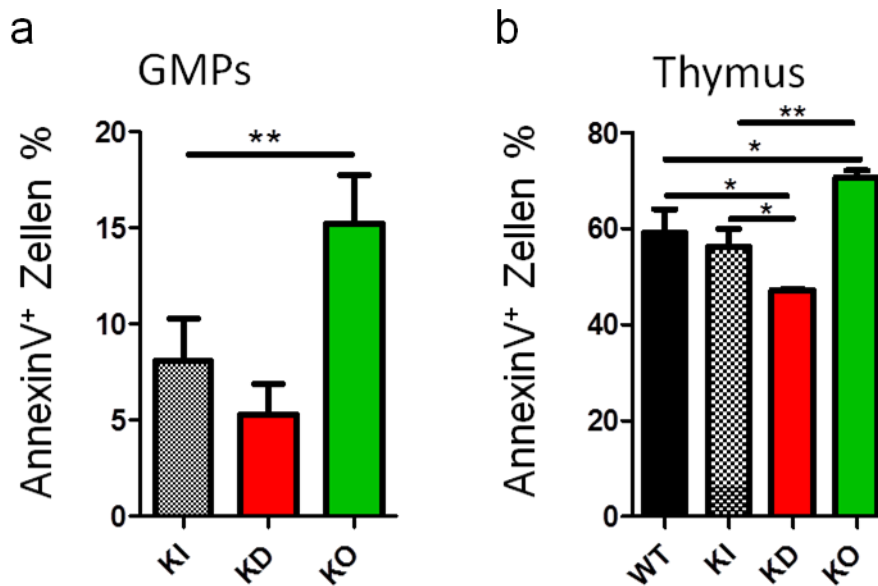
**Abbildung 39: Deletionen im *GFI1*-Locus sind häufig bei MDS-Patienten.** In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Maciejewski (Cleveland, USA) wurde ein Single Nucleotide Polymorphism Array (SNP) von fünf verschiedenen MDS-Patienten angefertigt. Alle Patienten zeigten innerhalb des *GFI1*-Locus eine Deletion.

### 7.2.3 Geringe *GFI1*-Expression korreliert mit verminderter Apoptose, veränderter Genexpression und veränderten Histon-Acetylierungsmustern

Um zu erklären, welcher Mechanismus verantwortlich für den Einfluss der verschiedenen *GFI1*-Expressionsevel auf die Leukämieentwicklung ist, wurden Apoptose und epigenetische Veränderungen untersucht. Es konnte bereits gezeigt werden, dass *GFI1* die Apoptose hemmen kann, indem es an p53 bindet. Folglich sind *GFI1*-defiziente Zellen sensibler gegenüber DNA-Schädigungen die zu induziertem Zelltod führen (Khandanpour *et al.*, 2013).

Um zu überprüfen, welchen Effekt eine Reduktion des *GFI1*/*Gfi1*-Expressionslevels auf Apoptose hat, wurden GMPs von *GFI1*-KI-, *GFI1*-KD- und *Gfi1*-KO-Mäusen isoliert und mit 8 Gy bestrahlt. Nach sechs Stunden wurde die Apoptoserate mittels AnnexinV-Färbung bestimmt. GMPs von *Gfi1*-KO-Mäusen verzeichneten die höchsten Apoptoselevel (15%), wo hingegen die GMPs der *GFI1*-KD-Mäuse resistenter gegenüber der Bestrahlung waren und nur 5% AnnexinV<sup>+</sup>-Zellen aufwiesen (Abbildung 40). Dies konnte auch bei bestrahlten Thymuszellen beobachtet werden. Auch hier zeigten die Zellen der *Gfi1*-KO-Mäuse den größten Anteil an AnnexinV<sup>+</sup>- Zellen (80%) wobei nur 50% der Zellen der *GFI1*-KD-Mäuse AnnexinV<sup>+</sup> waren. Die Zellen der *Gfi1*-WT- und der *GFI1*-KI-Mäuse hatten eine

Apoptoserate von 60%. Demnach bewirkt eine Reduktion des *GFI1*-Expressionslevels eine Resistenz gegenüber strahlungsinduziertem Zelltod, jedoch hob ein kompletter Verlust von *Gfi1* diese auf.

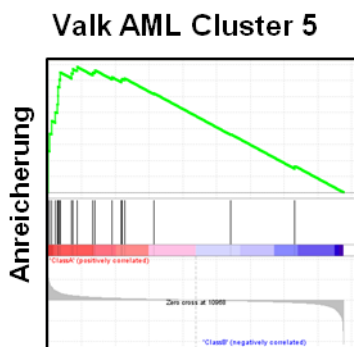


**Abbildung 40: Die Verminderung des *GFI1*-Expressionslevels resultierte in verminderter Apoptose, wohingegen die Deletion von *GFI1* mit erhöhter Apoptose einherging.** a) GMPs der verschiedenen Mausstämme wurden mittels Durchflusszytometrie sortiert und bestrahlt. Nach 6 Stunden wurde mittels Durchflusszytometrie das Apoptoselevel analysiert.  $**p=0,0052$ ; KI= *GFI1*-KI ( $n=4$ ), KD= *GFI1*-KD ( $n=4$ ), KO=*Gfi1*-KO ( $n=4$ ) b) Zellen aus dem Thymus der verschiedenen Mausstämme wurden bestrahlt und nach 6 Stunden wurde das Apoptoselevel via Durchflusszytometrie analysiert.  $*p<0,018$ ;  $**p=0,0036$ . KI= *GFI1*-KI ( $n=3$ ), KD= *GFI1*-KD ( $n=3$ ), KO=*Gfi1*-KO ( $n=3$ )

In Kooperation mit dem "Institute de recherches cliniques de Montréal" (IRCM) in Kanada wurden die epigenetischen Effekte in leukämischen KM-Zellen von *NUP98/HOXD13*-Mäusen mit verschiedenen *GFI1*-Genotypen untersucht. Es wurden die genomweiten RNA-Sequenz-Daten von leukämischen Zellen von unseren *GFI1*-KD- und *GFI1*-KI-*NUP98/HOXD13*-Mäusen mittels *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) analysiert. Hier für wurde das *NUP98/HOXD13*-Mausmodell gewählt, da dieses Modell die charakteristischen Merkmale einer humanen AML rekapituliert (Lin *et al.*, 2005). Die leukämischen Zellen der verschiedenen Mausgenotypen wurden zum Möröy Labor nach Montreal geschickt. Dort wurde dann die ChIP-Sequenzierung durchgeführt. Die leukämischen Zellen der *GFI1*-KD-*NUP98/HOXD13*-Mäuse zeigten eine Anreicherung von Genen, die nach Valk *et al.*

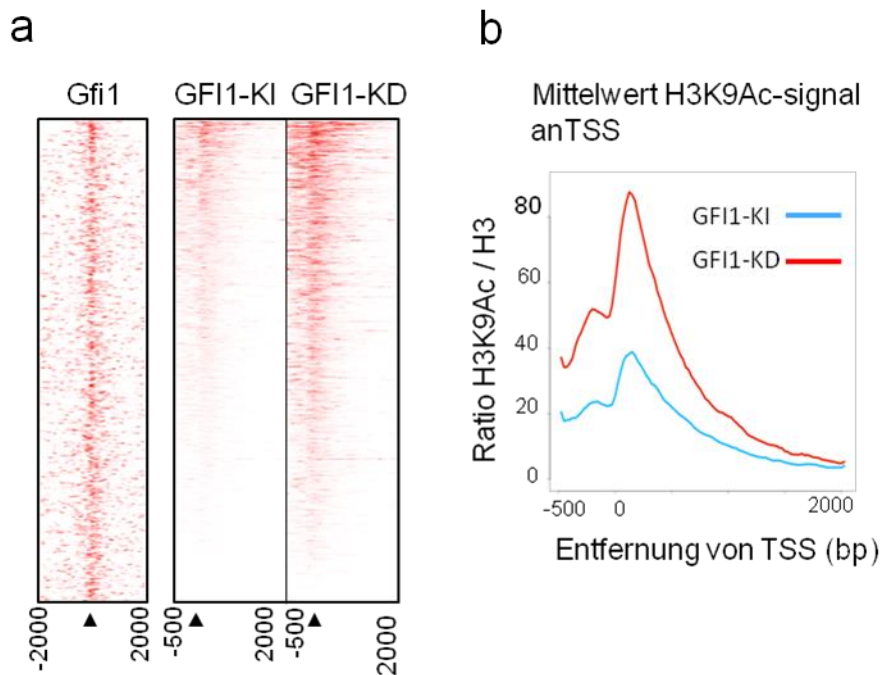


(2004) zu dem von ihnen so definierten "Cluster 5" gehören (Abbildung 41). Dieses Cluster umfasst eine humane AML-Subgruppe (61 Patienten), die laut Gen-Expressionsprofil alle dem Subtyp M4 und M5 (FAB) angehören, und dies korreliert mit einer schlechten Prognose (Valk *et al.*, 2004). Aufgrund dessen lässt sich sagen, dass die *GFI1*-KD-*NUP98/HOXD13*-Mäuse den genetischen Zustand von AML-Patienten mit schlechter Prognose rekapitulieren können.



**Abbildung 41: Gene Set Enrichment Analyse (GSEA) von KM-Zellen der *GFI1*-KD-*NUP98/HOXD13*-Mäusen.** Die leukämischen Zellen der *GFI1*-KD-*NUP98/HOXD13*-Mäuse zeigten in der Gene Set Enrichment-Analyse eine Anreicherung von Genen, die nach Valk *et al.* (2004) zu dem von ihnen so definierten "Cluster 5" gehören.

Es ist bekannt, dass *GFI1* in der Lage ist, Genexpressionsprogramme durch Histonmodifikationen zu steuern. Genauer gesagt, rekrutiert *GFI1* Histondeacetylasen (HDACs) zu ihren Zielgenpromotoren, was dann zu einer Deacetylierung des Histons H3 an Lysine 9 (H3K9) zur Folge hat (Saleque *et al.*, 2007). Diese Deacetylierung führt zu einer verringerten Genrepression der Zielgene. Um zu untersuchen, ob der KD der *GFI1*-Expression Auswirkungen auf die Genrepression hat, wurde eine Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) in Kooperation mit dem Möröy Labor des IRCM durchgeführt. Es wurden murine leukämische Zellen von den unterschiedlichen *NUP98/HOXD13*-Mäusen untersucht. In den *GFI1*-KD-*NUP98/HOXD13*-Zellen konnte eine erhöhte H3K9-Acetylierung an einer Vielzahl von *GFI1*-Zielgenen im Vergleich zu den *GFI1*-KI-*NUP98/HOXD13*-Zellen detektiert werden (Abbildung 42). Eine vermehrte Acetylierung entspricht einer verminderten Funktion von *GFI1*.



**Abbildung 42: Der KD der GFI1-Expression führte zu einer Anreicherung von H3K9-Acetylierung in leukämischen Zellen.** a) Die sogenannte Heatmap zeigt die Anreicherung von GFI1 relativ zu der IgG Kontrolle an den GFI1-Zielgenen. Der erste Abschnitt repräsentiert einen Ausschnitt von 4kb mittig der Transkriptions-Start-Seite (TSS) der Gene. Der zweite und dritte Abschnitt zeigt die Anreicherung von H3K9-Acetylierung relativ zu der H3-Kontrolle zwischen leukämischen Zellen von GFI1-KI- und GFI1-KD-NUP98/HOXD13-Mäusen. Jeder Abschnitt repräsentiert einen 2,5kb-Abschnitt im Bereich von -0,5kb und +2kb von der Gen-TSS. b) Histogramm zeigt die mittlere Verteilung von H3K9-Acetylierung relativ zur TSS zwischen ausgewählten leukämischen Zellen von GFI1-KD- und GFI1-KI-NUP98/HOXD13-Mäusen. (In Kooperation mit dem Möröy Labor, IRCM Montreal, Kanada).

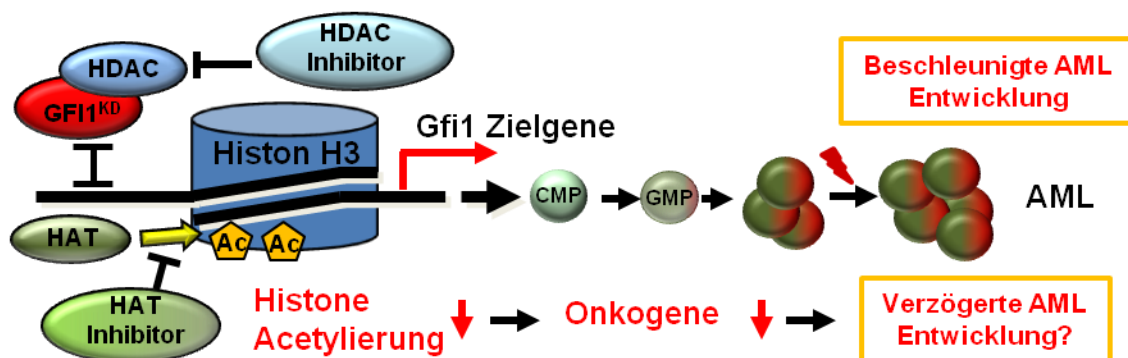
Mittels funktionaler Analyse konnte gezeigt werden, dass GFI1-KD-Zellen eine erhöhte Acetylierung von Genen, deren Produkt für die Chromosomen- und Chromatinorganisation und die Transkriptionsregulation eine Rolle spielt, aufwiesen (Abbildung 72) (Hones *et al.*, 2016).

Des Weiteren zeigte eine Analyse mit Hilfe der "Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes" (KEGG) Signalwege, dass Signalwege, die in der Krebsentwicklung eine wichtige Rolle einnehmen, beim GFI1-KD im Vergleich zum GFI1-KI eine erhöhte Aktivierung zeigten (Abbildung 73a). Außerdem ging eine erhöhte Acetylierung mit einer erhöhten mRNA-Expression einher (Abbildung 73b). Diese Ergebnisse stellen dar, dass geringe GFI1-Expressionslevel eine erhöhte Acetylierung der Zielgene herbeiführten und dies mit einer verstärkten mRNA-Expression dieser Zielgene korrelierte. Es lässt vermuten, dass durch diese epigenetischen Veränderungen eine

Leukämie-entwicklung beschleunigt oder begünstigt werden kann (Hones *et al.*, 2016).

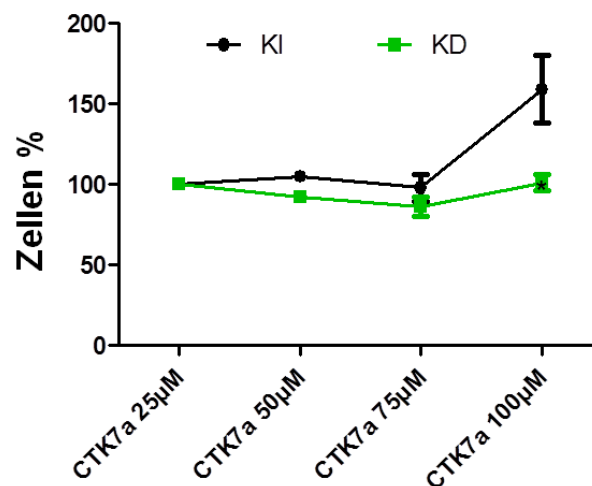
#### 7.2.4 Epigenetische Therapie als neuer Therapieansatz für leukämische Zellen mit geringer *GF11*-Expression

In Hochrisikofällen werden MDS-Patienten mit Histondeacetylaseinhibitoren (HDACi) behandelt. Diese Behandlung erfolgt oft auch in Kombination mit anderen epigenetisch modifizierenden Medikamenten (Lane and Chabner, 2009; Silva *et al.*, 2013). Bis jetzt waren diese Ansätze nicht sehr erfolgsversprechend. Es lässt vermuten, dass in Zellen mit geringer *GF11*-Expression die H3K9-Deacetylierung bereits geringer ist als in Zellen mit normaler *GF11*-Expression. Demnach wäre eine Behandlung bei MDS-Patienten mit geringer *GF11*-Expression in den Blasten mit HDACi nicht optimal. Schlussfolgernd könnte demnach die Behandlung von Zellen mit geringer *GF11*-Expression mit Histonacetylaseinhibitoren (HATi) einen erfolgsversprechenderen Ansatz darstellen. Denn die HATis würden die erhöhte Acetylierung von H3K9 revertieren, und dies würde dem Effekt, der durch die geringe Expression von *GF11* ausgelöst wird, ausgleichen (Abbildung 43).



**Abbildung 43: Modell der pathophysiologischen Funktion von geringer *GF11*-Expression in der AML und mögliche therapeutischen Intervention.** Geringe *GF11*-Expressionslevel sind nicht in der Lage, histonmodifizierende Enzyme an ihre Zielgene ausreichend zu rekrutieren. Dies führt zu einer erhöhten Acetylierung von H3K9 der *GF11*-Zielgene, deren Produkte bei der Initiation der Leukämie beteiligt sind. Was wiederum zu einer Expansion der GMPs führt. Der therapeutische Einsatz von HDACi könnte diesen Effekt (erhöhte Acetylierung und Expansion von GMPs) verstärken und die Situation verschlechtern. Die Gabe von HATi könnte die vorhandene epigenetische Dysregulation aufheben.

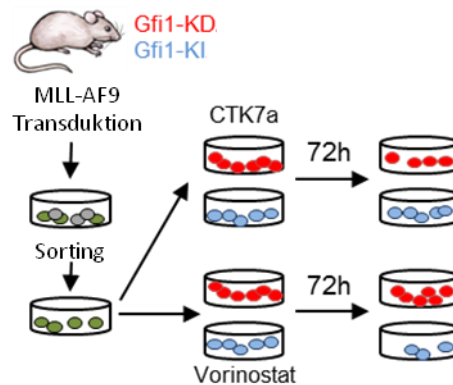
Um dies zu untersuchen, wurde zuerst ein Toxizitätstest mit Lin<sup>-</sup>-Zellen von *GFI1*-KI- und *GFI1*-KD-Mäusen durchgeführt. Die Lin<sup>-</sup>-Zellen der verschiedenen Mäuse wurden isoliert und mit verschiedenen Konzentrationen von CTK7a (HATi) behandelt. Die Anzahl lebender Zellen wurden nach 48 Stunden bestimmt. Da es zu der Behandlung mit Vorinostat (HDACi) zahlreiche Publikationen gibt (Lane and Chabner, 2009; Silva *et al.*, 2013), wurde auf einen Toxizitätstest mit Vorinostat verzichtet.



**Abbildung 44: CTK7a zeigt keine toxische Wirkung auf gesunde Zellen.** Lin<sup>-</sup>-Zellen von *GFI1*-KI- und *GFI1*-KD-Mäusen wurden separiert und mit verschiedenen Konzentrationen von CTK7a behandelt. Nach 48 Stunden wurden die lebenden Zellen gezählt. Gezeigt wird das Ergebnis von Triplikaten.

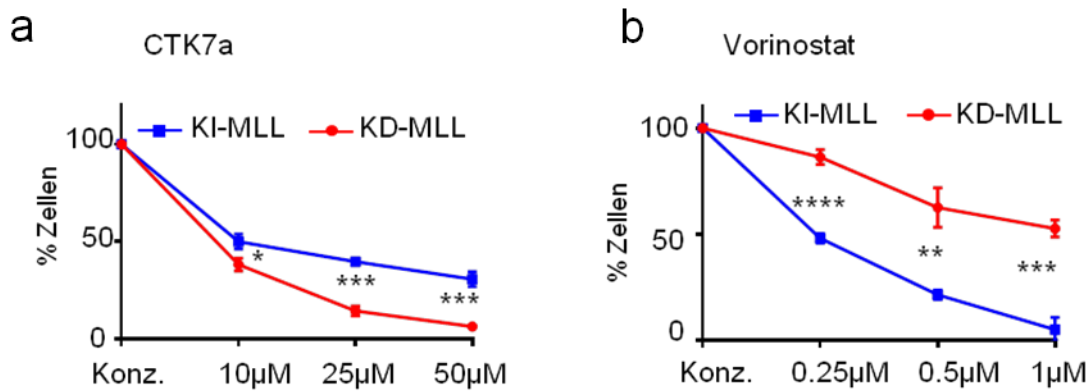
Der Toxizitätstest mit dem HATi CTK7a zeigt, dass hohe Konzentrationen von CTK7a einen geringen Einfluss auf die Proliferation und die Apoptose von gesunden Lin<sup>-</sup>-Zellen hatten (Abbildung 44).

Um den Effekt der verschiedenen Inhibitoren auf leukämische Zellen zu testen, wurden nun Lin<sup>-</sup>-Zellen von *GFI1*-KI- und *GFI1*-KD-Mäusen mit einem MLL-AF9 exprimierenden Retrovirus transduziert. Nach dreitägiger Expansion wurden die transduzierten Zellen gesortet und mit verschiedenen Konzentrationen von Vorinostat und CTK7a für 72 Stunden behandelt (Abbildung 45). Es wurden niedrige Konzentrationen der Inhibitoren eingesetzt, um ähnliche Level wie *in vivo* zu rekapitulieren (Arif *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2013).



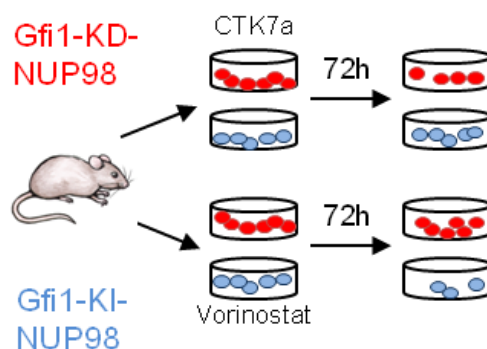
**Abbildung 45: Behandlung von transduzierten MLL-AF9-Mauszellen mit Inhibitoren.** Lin<sup>-</sup>-Zellen der verschiedenen Mausstämmen wurden separiert und mit einem MLL-AF9 exprimierenden Retrovirus transduziert. Nach dem Sortieren wurden die Zellen in Flüssigmedium ausgeplattiert und mit CTK7a (HATi) und Vorinostat (HDACi) für 72 Stunden inkubiert.

Die lebenden Zellen wurden ausgezählt. Es ist deutlich zu erkennen, dass leukämische *GFI1*-KD-Zellen im Vergleich zu den *GFI1*-KI-Zellen stärker auf die Behandlung mit CTK7a ansprachen, als auf den HDACi Vorinostat. Bei der höchsten Konzentration von CTK7a (50  $\mu$ M) reduzierte sich die Zellproliferation (normalisiert zur DMSO-Kontrolle) um fast 100%. Hingegen reduzierte sich das Zellwachstum der leukämischen *GFI1*-KI/WT nur um ca. 70% (Abbildung 46a). Bei der Behandlung mit Vorinostat reduzierte sich das Zellwachstum der leukämischen *GFI1*-KI-Zellen (normalisiert zur DMSO-Kontrolle) um ca. 100% bei der höchsten Konzentration (1  $\mu$ M). Wohingegen die *GFI1*-KD-Zellen nur eine Reduktion um 40% zeigten (Abbildung 46b).



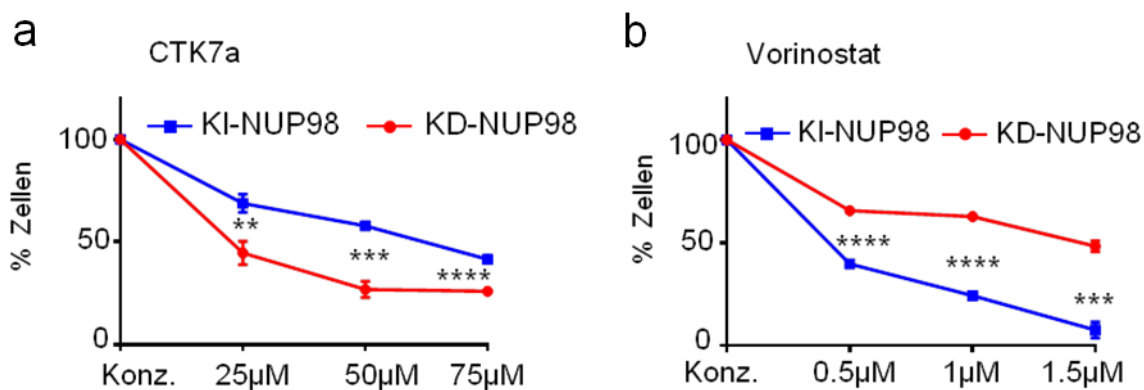
**Abbildung 46: Leukämische *GFI1*-KD-Zellen reagierten besser auf CTK7a.** Lin<sup>-</sup>-Zellen von *GFI1*-KI-Mäusen (blau) und von *GFI1*-KD-Mäusen (rot) wurden isoliert und mit einem *MLL*-AF9 exprimierenden Retrovirus transduziert. Nach dem Sortieren wurden 5000 Zellen pro well in SCM ausgesät. a) Zellen wurden mit 10 µM, 25 µM und 50 µM CTK7a (HATi) behandelt (\* $p=0,015$ ; \*\*\* $p<0,0006$ ). Gezeigt wird ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt zwei Versuchen. b) Zellen wurden mit 0.25 µM, 0.5 µM und 1 µM Vorinostat (HDACi) behandelt (\*\* $p<0,00171$ ; \*\*\* $p<0,0003$ ; \*\*\*\* $p<0,00009$ ). Gezeigt wird ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt zwei Versuchen. (Konz.=Konzentration). KI-MLL=*GFI1*-KI-MLL-AF9; KD-MLL=*GFI1*-KD-MLL-AF9

Des Weiteren wurden leukämische Zellen AML-erkrankter *GFI1*-KI- und *GFI1*-KD-*NUP98/HOXD13*-Mäusen ebenfalls mit den verschiedenen Inhibitoren behandelt. Dazu wurden zuvor gesammelte und eingefrorene KM-Zellen erkrankter Mäuse in Kultur genommen und mit CTK7a oder Vorinostat inkubiert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit DMSO behandelt (Abbildung 47).



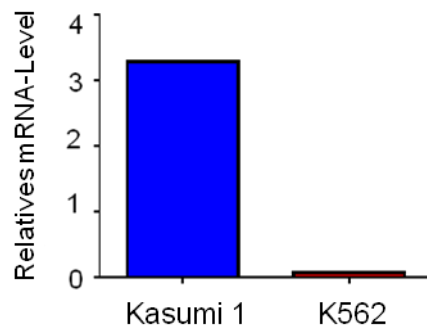
**Abbildung 47: Behandlung von Lin<sup>-</sup>-Zellen von transgenen *NUP98/HOXD13* Mäusen mit Inhibitoren.** Lin<sup>-</sup>-Zellen von Mäusen mit verschiedenen Genotypen wurden separiert und mit CTK7a (HATi) und Vorinostat (HDACi) für 72 Stunden inkubiert.

Nach 72 Stunden war deutlich zu erkennen, dass der HATi CTK7a einen stärkeren Einfluss auf die Hemmung der Proliferation bei Zellen mit niedrigen *GFI1*-Expressionsevel hatte (Abbildung 48a), als der HDACi Vorinostat (Abbildung 48b). Bei Inkubation mit CTK7a (höchste Konzentration 75  $\mu\text{M}$ ) verringerte sich die Zellzahl der leukämischen Zellen der *GFI1*-KD-*NUP98/HOXD13*-Mäuse um mehr als 70%. Im Gegensatz dazu war bei der Inkubation mit Vorinostat (höchste Konzentration 1,5  $\mu\text{M}$ ) nur eine Verringerung der Zellzahl von knapp 50% zu verzeichnen. Die leukämischen Zellen mit normalen *GFI1*-Expressionslevel (*GFI1*-KI-*NUP98/HOXD13*) hingegen zeigten bei der Behandlung mit CTK7a (höchste Konzentration 75  $\mu\text{M}$ ) eine Proliferationsrückgang von ca. 50% und bei der Behandlung mit Vorinostat (höchste Konzentration 1,5  $\mu\text{M}$ ) eine Verringerung der Zellzahl um fast 100%. Die verschiedenen Proliferationsraten wurden zur DMSO-Kontrolle normalisiert.



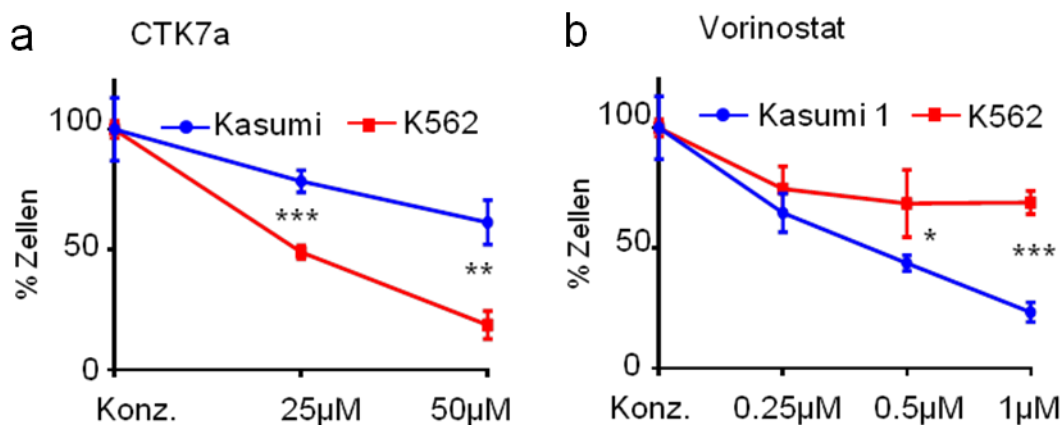
**Abbildung 48: *NUP98/HOXD13* exprimierende *GFI1*-KD-Zellen reagierten besser auf CTK7a.** Lin<sup>-</sup>-Zellen von *GFI1*-KI/WT Mäusen (blau) und von *GFI1*-KD/KD Mäusen (rot) wurden isoliert. 5000 Zellen pro well wurden in SCM ausgesät. a) Zellen wurden mit 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 75  $\mu\text{M}$  CTK7a (HATi) behandelt (\*\* $p=0,005$  \*\*\* $p<0,00024$ ; \*\*\*\* $p<0,000031$ ). Gezeigt wird ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt zwei Versuchen. b) Zellen wurden mit 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 1,5  $\mu\text{M}$  Vorinostat (HDACi) behandelt; (\*\* $p<0,0003$ ; \*\*\*\* $p<0,00007$ ). Gezeigt wird ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt zwei Versuchen. (Kon.=Konzentration). KI-NUP98=*GFI1*-KI-*NUP98/HOXD13*; KD-NUP98=*GFI1*-KD-*NUP98/HOXD13*

Der Effekt der verschiedenen Inhibitoren wurde auch in humanen AML-Zelllinien untersucht. Dazu wurden zunächst die *GFI1*-mRNA-Expressionslevel von K562-Zellen und Kasumi 1-Zellen mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Kasumi 1-Zellen zeigten ein dreifach erhöhtes *GFI1*-Expressionsevel im Vergleich zu den K562-Zellen (Abbildung 49). Somit wurden die Zellen als geeignet für die Behandlung mit den Inhibitoren angesehen.



**Abbildung 49: Kasumi 1-Zellen exprimieren mehr GF11-mRNA als K562-Zellen.** Graphische Darstellung des mRNA-Expressionslevels von humanen AML-Zelllinien. Kasumi-1-Zellen (blau) exprimierten dreifach so viel GF11-mRNA als K562-Zellen (rot). Die RNA der verschiedenen Zelllinien wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Das relative mRNA-Expressionslevel wurde mit quantitativer Real-Time-PCR analysiert. Gezeigt wird der  $\Delta\Delta CT$ -Wert.

Die Kasumi 1- und K562-Zellen wurden ausgesät und mit den Inhibitoren behandelt. Die K562-Zellen (geringes GF11-Expressionslevel) zeigten einen Zellzahlverlust von 75% bei der Behandlung mit dem HATi CTK7a (höchste Konzentration 50  $\mu\text{M}$ ), wohingegen die Kasumi 1-Zellen einen Verlust der Zellzahl um 30% zeigten (Abbildung 50a). Bei der Behandlung mit dem HDACi Vorinostat war bei den Kasumi 1-Zellen ein Verlust im Zellwachstum von 75% (höchste Konzentration 1  $\mu\text{M}$ ) zu verzeichnen, wohingegen die K562-Zellen kaum reagierte und hier nur ein Verlust der Proliferation um 25% erreicht wurde (Abbildung 50b).

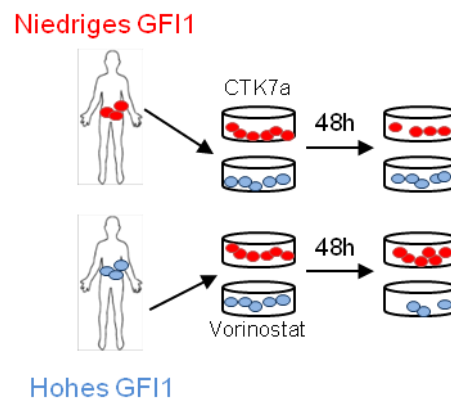


**Abbildung 50: Humane AML-Zellen mit geringem GF11-Expressionslevel reagierten besser auf CTK7a.** 15.000 humane Zellen wurden ausgesät und mit Inhibitor behandelt und nach 72 Stunden gezählt. a) Zellen wurden mit 25  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  CTK7a (HATi) behandelt. (\*\* $p=0,0025$ ; \*\*\* $p=0,0007$ ). b) Zellen wurden mit 0,25  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  Vorinostat (HDACi) behandelt; (\* $p=0,04$ ; \*\*\* $p=0,0002$ ). Gezeigt wird ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt zwei Versuchen. (Konz.=Konzentration).



Als nächstes wurden publizierte Daten von Garnett *et al.* 2012 reanalysiert. Diese Arbeitsgruppe untersuchte den Einfluss der Inhibitorenbehandlung auf verschiedene Zelllinien (Garnett *et al.*, 2012). Es wurden verschiedene humane AML-Zellen mit hohem *GF11*-Expressionslevel (MonoMac6, HL-60, Kasumi-1, THP1, P31FUJ) und Zelllinien mit niedrigem *GF11*-Expressionslevel (CESS, ML2, GDM1) in diese Analyse einbezogen. Bestimmt wurde hier die IC50 als Maß für halbmaximale Inhibition von Vorinostat. Ich sortierte die verschiedenen Zelllinien hinsichtlich ihrer *GF11*-Expressionslevel in zwei Gruppen. Es konnte gezeigt werden, dass die Zelllinien mit hohem *GF11*-Expressionslevel eine signifikant geringere IC50 aufwiesen, als Zellen mit niedrigem *GF11*-Expressionslevel (Abbildung 74).

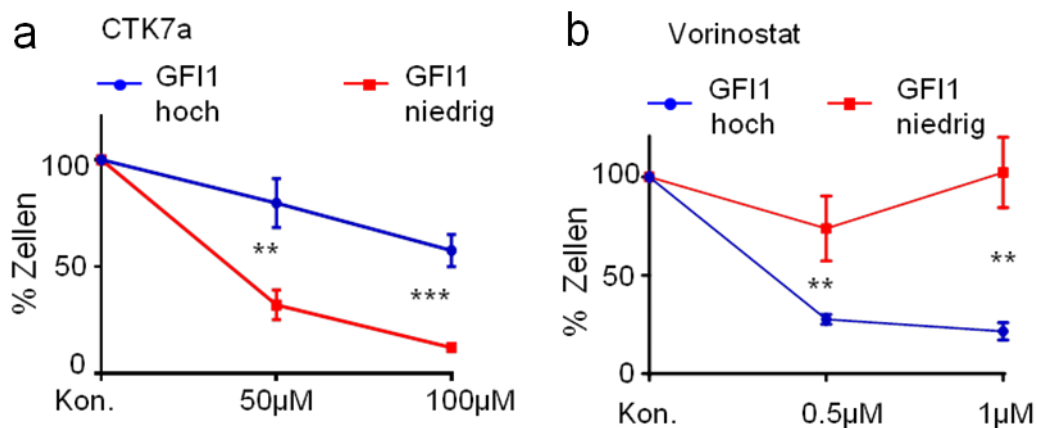
Um zu überprüfen, ob sich dieser Effekt auch in primären humanen Zellen zeigt, wurden primäre humane AML-Zellen aufgetaut. Hierbei handelte es sich um Zellen, bei denen zuvor das *GF11*-Expressionslevel mittels quantitativer RT-PCR bestimmt worden war. Es wurden Zellen mit niedrigem und hohem *GF11*-Expressionsevel ausgewählt. Jeweils 3000 Zellen wurden in ein *well* einer 96-*well*-Platte ausgesät und die verschiedenen *wells* mit den verschiedenen Konzentrationen an CTK7a (HATi), Vorinostat (HDACi) und DMSO (Kontrolle) behandelt. Nach 48 Stunden wurden die lebenden Zellen ausgezählt (Abbildung 51).



**Abbildung 51: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Behandlung von primären humanen AML-Zellen mit CTK7a und Vorinostat.** Es wurden 3000 Zellen pro *well* ausgesät und mit den verschiedenen Inhibitoren behandelt. Nach 48 Stunden wurden die lebenden Zellen ausgezählt.

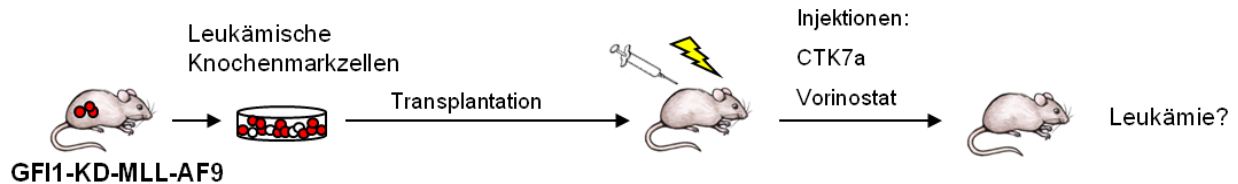
Die primären humanen AML-Zellen mit niedrigem *GF11*-Expressionslevel zeigten bei der Behandlung mit CTK7a einen Proliferationsrückgang von 90% (höchste Konzentration 100  $\mu$ M). Hingegen reagierten die Zellen mit hoher *GF11*-Expression

mit einem Rückgang von 40% (Abbildung 52a). Im Gegensatz dazu reagierten die humanen Zellen mit hohem *GFI1*-Expressionslevel, bei der Behandlung mit Vorinostat (höchste Konzentration 1  $\mu\text{M}$ ) mit einem Rückgang der Proliferation um 85%, wohingegen die Zellen mit niedrigem *GFI1*-Expressionslevel keine Veränderung in ihrem Wachstumsverhalten zeigten (Abbildung 52b).



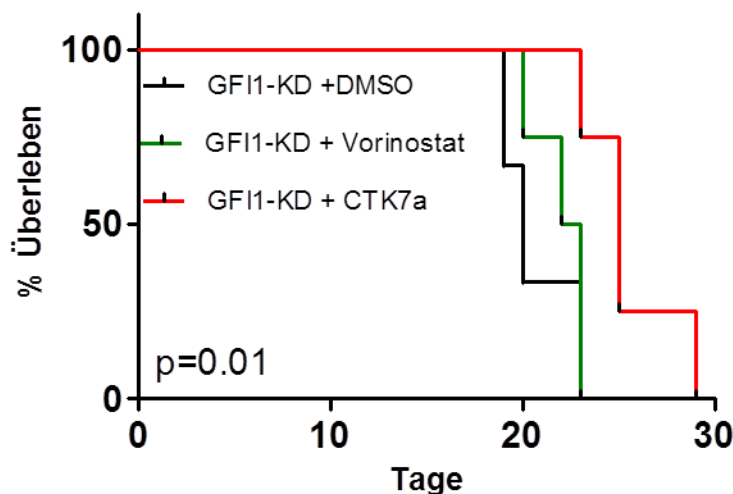
**Abbildung 52: Primäre humane AML-Zellen mit niedrigem *GFI1*-Expressionslevel reagieren besser auf CTK7a.** Primäre humane AML-Zellen wurden ausgesät und mit Inhibitor behandelt und nach 72 Stunden wurden die lebenden Zellen gezählt. a) Zellen wurden mit 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  CTK7a (HATi) behandelt. (\*\* $p=0,0035$ ; \*\*\* $p=0,00046$ ). b) Zellen wurden mit 0,5  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  Vorinostat (HDACi) behandelt; (\*\* $p<0,009$ ). Gezeigt wird ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt drei Versuchen.

Die oben beschriebenen *In-vitro*-Ergebnisse zeigten, dass leukämische Zellen mit geringem *GFI1*-Expressionslevel besser auf den HATi CTK7a als auf den HDACi Vorinostat reagierten, indem die Proliferationsrate stärker gehemmt wurde. In Folge dessen sollte dies auch *in vivo* gezeigt werden. Dafür wurden leukämische KM-Zellen von transplantierten *GFI1*-KD-*MLL*-*AF9*-Mäusen in subletal (3Gy) bestrahlte Mäuse transplantiert. Zwei Tage nach der Transplantation wurden jeweils drei Mäuse mit dem Inhibitor Vorinostat (50 mg/kg), CTK7a (100 mg/kg) und drei Kontrollmäuse mit DMSO injiziert (Abbildung 53). Die Injektion erfolgte interperitoneal (i.p.) an jedem zweiten Tag (Lane and Chabner, 2009; Arif *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2013).



**Abbildung 53: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Behandlung transplantierter Mäuse mit CTK7a (HATi) und Vorinostat (HDACi).** Zellen von transplantierten und erkrankten GFI1-KD-MLL-AF9-Mäusen wurden in subletal (3Gy) bestrahlte Mäuse transplantiert. Zwei Tage nach Transplantation wurden die Mäuse mit CTK7a (100 mg/kg) und Vorinostat (50 mg/kg) interperitoneal jeden zweiten Tag injiziert. Als Kontrolle wurden Mäuse mit DMSO injiziert.

Die Mäuse wurden jeden Tag hinsichtlich typischer Krankheitsanzeichen (Apartheit, Schnappatmung, weiße Pfoten, struppiges Fell) untersucht und beim Auftreten solcher Anzeichen euthanasiert und analysiert. Anhand der Kaplan-Meier Kurve ist deutlich zu erkennen, dass die mit DMSO behandelten Kontrollmäuse ein medianes Überleben von nur 20 Tagen aufwiesen. Im Gegensatz dazu zeigten die Mäuse, welche mit CTK7a behandelt wurden, ein signifikant längeres Überleben ( $p=0,01$ ). Die mit CTK7a behandelten Mäuse zeigten eine medianes Überleben von 25 Tagen, wohingegen die mit Vorinostat behandelten Mäuse lediglich ein medianes Überleben von 22,5 Tagen hatten (Abbildung 54).

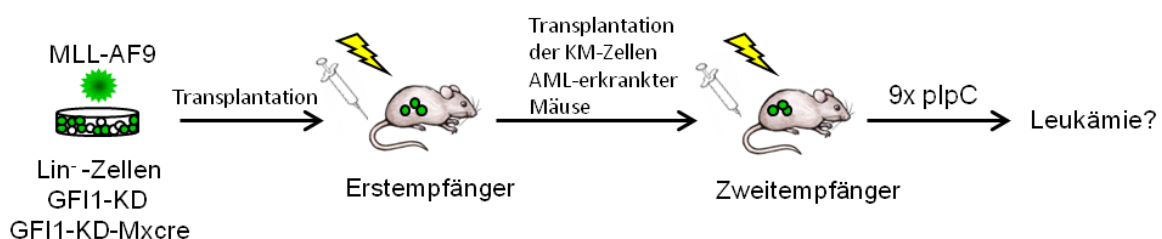


**Abbildung 54: Die Behandlung transplantierter MLL-AF9-Mäuse mit CTK7a verzögerte die AML-Progression.** Empfängermäuse wurden mit leukämischen GFI1-KD-MLL-AF9-Zellen transplantiert. 2 Tage nach der Transplantation wurden die Mäuse mit CTK7a (100 mg/kg), Vorinostat (50 mg/kg) oder DMSO (Kontrolle) i.p. injiziert. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Behandlung mit CTK7a das Überleben der Mäuse verlängerte und so die AML-Formation verlangsamt wurde. GFI1-KD + DMSO= GFI1-KD-MLL-AF9 + DMSO (n=4), GFI1-KD + Vorinostat= GFI1-KD-MLL-AF9 + Vorinostat (n=4), , GFI1-KD + CTK7a= GFI1-KD-MLL-AF9 + CTK7a (n=4).

Von allen Mäusen wurde ein Blutbild angefertigt und sowohl das KM als auch die Milzzellen mittels Durchflusszytometrie analysiert um zu bestätigen, dass eine AML vorlag. Alle Mäuse erkrankten an einer AML. Den Ergebnissen zufolge reagierten leukämische *GFI1*-KD-Zellen besser auf die Behandlung mit CTK7a (HATi) als auf die Behandlung mit Vorinostat (HDACi). Die Leukämieprogression wurde demnach verlangsamt.

### 7.2.5 Hochregulation der *GFI1*-Expression führte zu terminaler Differenzierung und erhöhter Apoptose im *MLL-AF9*-Mausmodell

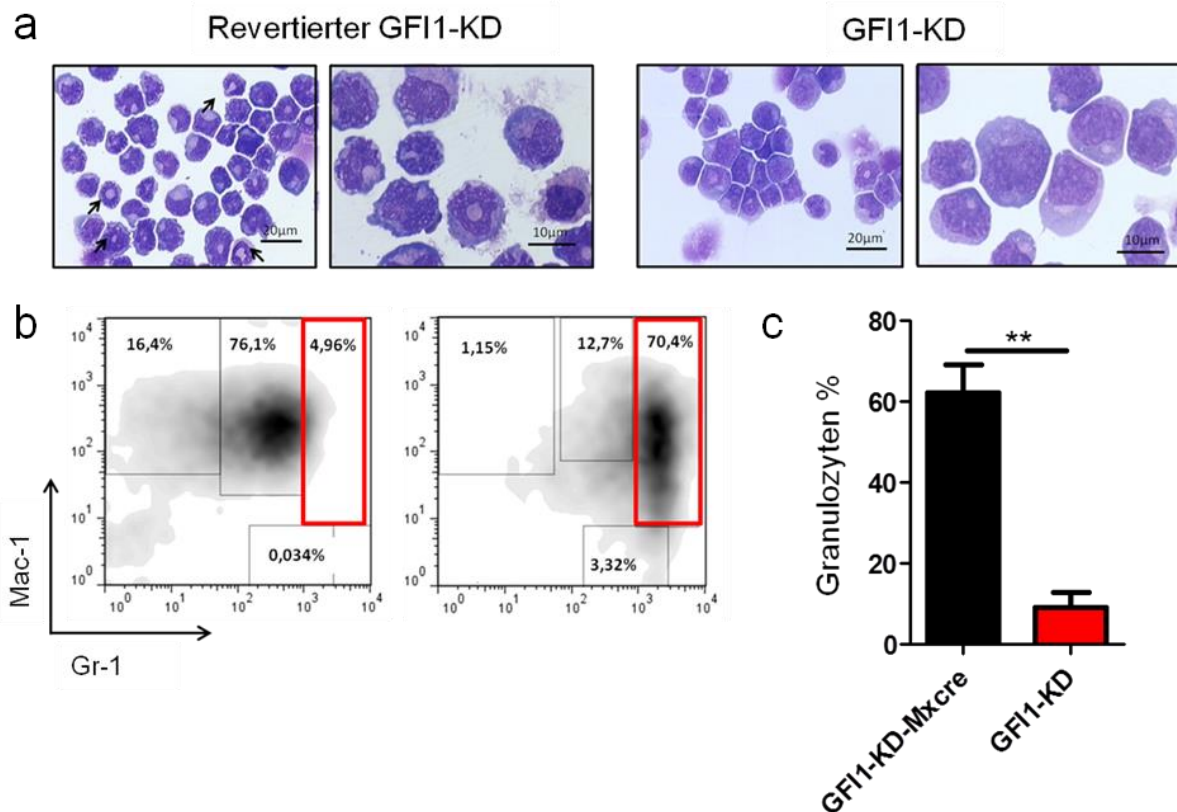
Die bisherigen Versuche zeigten, dass niedrige Expressionslevel von *GFI1* die AML-Entwicklung beschleunigten. Daraus ergibt sich die Frage, ob eine Revertierung des *GFI1*-KD-Phänotyps eine Auswirkung auf die Progression oder Entwicklung der AML hat. Um diese Frage zu beantworten, wurden  $Lin^{-}$ -Zellen aus dem KM von *GFI1*-KD-*flxMxcre*(tg) (*GFI1*-KDx*Mxcre*) - und aus *GFI1*-KD-Mäusen isoliert und mit einem *MLL-AF9* exprimierenden Retrovirus infiziert. Bei den *GFI1*-KDx*Mxcre*-Mäusen, kann die verringerte *GFI1*-Expression konditional revertiert werden, indem man durch *plpC*-Gabe die Cre-Rekombinase aktiviert und diese die Neo-Kassette, welche an beiden Enden mit *lox-P*-Seiten markiert ist, entfernt. Nach Transduktion der Zellen, wurden diese in letal bestrahlte Mäuse (8Gy) transplantiert (Abbildung 55). Nachdem diese Mäuse an einer AML erkrankten, wurde das leukämische KM in subletal bestrahlte Mäuse transplantiert.



**Abbildung 55: Schematische Darstellung des *GFI1*-KD-*Mxcre*-*MLL-AF9* Transplantationsexperiments.** *Lin<sup>-</sup>*-Zellen der jeweiligen Mausstämmen wurden mittels MACS isoliert und mit einem *MLL-AF9* exprimierenden Retrovirus transduziert. 100.000 *GFP<sup>+</sup>* Zellen wurden in letal bestrahlte Empfängermause (*Erstpfeänger*) transplantiert. Nachdem die Mäuse an AML erkrankten, wurden die KM-Zellen gesammelt und in subletal bestrahlte Mäuse (*Zweitepfänger*) transplantiert. Nach drei Tagen wurden die Mäuse mit *plpC* (250  $\mu$ l; 2 mg/ml) i.p. injiziert.

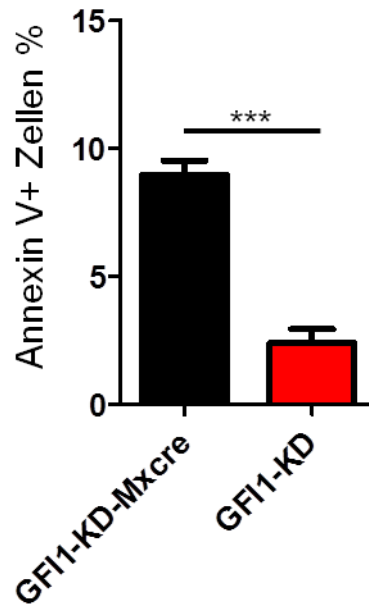
Nach drei Tagen wurden die Mäuse jeden zweiten Tag mit plpc (250 µl; 2 mg/ml) i.p. injiziert, um die mit loxP-Stellen flankierte Neokassette im GF11-Gen aus dem Genom Cre-vermittelt zu entfernen und dadurch den *GF11*-KD aufzuheben. Bei ersten Krankheitsanzeichen wurden die Mäuse euthanasiert. Alle Mäuse wurden i.p. mit plpC injiziert, um einen plpC-induzierten Effekt auszuschließen. Daraufhin wurde das KM sowohl mikroskopisch als auch mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Die *GF11*-KDxMxcre-*MLL-AF9*-Mäuse zeigten eine hohe Anzahl an ausdifferenzierten Zellen (Gr-1<sup>+</sup>) auf. Die Mäuse, bei denen die KD-typische GF11-Expression revertiert wurde, hatten im Durchschnitt 60% Granulozyten im KM, wohingegen die *GF11*-KD-*MLL-AF9*-Mäuse nur 10% an Granulozyten im KM aufwiesen (Abbildung 56). Dies konnte sowohl mikroskopisch als auch mittels Oberflächenmarkerfärbung und Durchflusszytometrie detektiert werden.



**Abbildung 56: Die Hochregulation von GF11 in vivo führt zu einer Ausdifferenzierung von unreifen KM-Zellen.** a) Mikroskopische Aufnahme von KM-Zellen der erkrankten Mäuse. Im Gegensatz zu den GF11-KD-MLL-AF9 Mäusen (rechts) zeigten die GF11-KD-flxMxcre Mäuse (links) viele ausdifferenzierte Zellen (mit Pfeilen markiert). b) Das KM der GF11-KD-flxMxcre-MLL-AF9-Mäuse (rechte Abbildung) zeigt nach der Färbung der Oberflächenmarker mit Mac-1 und Gr-1 und der durchflusszytometrischen Analyse einen deutlich erhöhten Anteil an Granulozyten (70,4% rote Markierung) im Vergleich zu den Mäusen, bei denen der GF11-KD nicht revertiert wurde (linke Abbildung; 4,96%). c) Graphische Darstellung des prozentualen Anteils an Granulozyten im KM der transplantierten und mit plpC injizierten Mäuse. Im Gegensatz zum Gfi1-WT-MLL-AF9 (n=7) und GF11-KD-MLL-AF9 (n=4) zeigten die Mäuse mit revertiertem GF11-KD (n=4) (mittlere Säule) einen deutlich erhöhten Anteil an Granulozyten. \*\*p≤0,002. Gfi1-WT= Gfi1-WT-MLL-AF9, GF11-KD-Mxcre= GF11-KD-flxMxcre-MLL-AF9, GF11-KD= GF11-KD-MLL-AF9.

Des Weiteren wurde auch der Anteil der AnnexinV<sup>+</sup>-Zellen im KM mittels Durchflusszytometrie analysiert. Das KM der Mäuse mit revertiertem GF11-KD (hochregulierter GF11-Expression) zeigte eine wesentlich höhere Apoptoserate im KM als die GF11-KD-MLL-AF9-Mäuse. Die Anzahl an AnnexinV<sup>+</sup>-Zellen lag bei den GF11-KD-MLL-AF9-Mäusen bei ca. 2,5%, wohingegen die Mäuse mit hochregulierter GF11-Expression einen Anteil an AnnexinV<sup>+</sup>-Zellen von 9% aufwiesen (Abbildung 57).



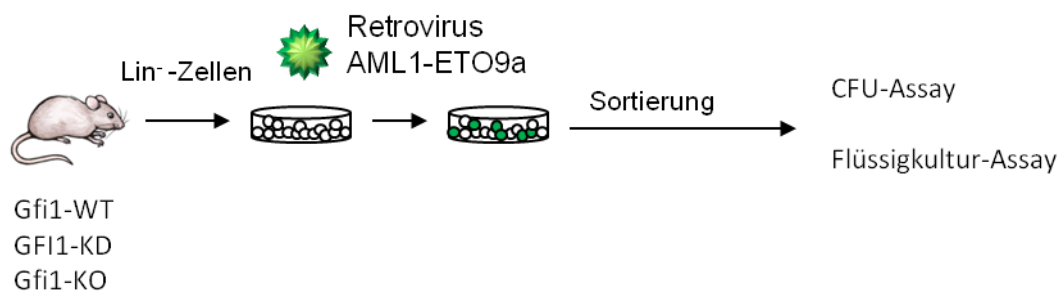
**Abbildung 57: Mäuse bei denen die GFI1-Expression hochreguliert wurde, wiesen einen höheren Anteil an AnnexinV<sup>+</sup> Zellen auf.** Graphische Darstellung der AnnexinV<sup>+</sup> Zellen im KM der transplantierten Mäuse. Die Mäuse bei denen durch plpC Gabe der GFI1-KD-Phänotyp revertiert wurde (n=4), zeigten im Vergleich zu den Kontrollmäusen (GFI1-KD) (n=4) eine signifikante Erhöhung der apoptotischen Zellen im KM auf. \*\*\*p=0,0002. GFI1-KD-Mxcre= GFI1-KD-flxMxcre-MLL-AF9, GFI1-KD= GFI1-KD-MLL-AF9.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Hochregulierung der *GFI1*-Expression zu einer veränderten Zelldifferenzierung im *MLL-AF9*-Mausmodell führte. Eine Erhöhung des *GFI1*-Expressionslevels resultierte in einer Differenzierung der unreifen KM-Zellen hin zu Granulozyten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass ein gesteigertes *GFI1*-Expressionslevel mit einer erhöhten Apoptoserate einhergeht.

### 7.2.6 GFI1 ist essentiell für die AML-Entwicklung in AML1-ETO9a transduzierten Zellen

Wie oben beschrieben, hatten verschiedene *GFI1*-Expressionsevel unterschiedliche Auswirkungen auf die AML-Progression und Entwicklung im *MLL-AF9*- und *NUP98/HOXD13*-Modell. Um diese Beobachtung zu bestätigen, wurde ein weiteres AML-Modell verwendet. Hierzu wurden Lin<sup>-</sup>-Zellen mittels ekotropher Retroviralertransduktion mit einem AML1-ETO9a (t(8;21)) exprimierenden Retrovirus transduziert. Diese Translokation kommt zu 10-15% bei den humanen AML-Fällen (Yan *et al.*, 2006; Kumar, 2011).

Lin<sup>-</sup>-Zellen von *GFI1*-WT-, *GFI1*-KD- und *Gfi1*-KO-Mäusen wurden isoliert und mittels eines AML1-ETO9a exprimierenden Retrovirus transduziert. Neben dem AML1-ETO9a-Protein exprimiert das Virus auch das *GFP*, sodass erfolgreich infizierte Zellen bei ultravioletter Induktion grün fluoreszieren. GFP wird unabhängig vom Onkofusionsprotein exprimiert, da es über eine *IRES* (Interne ribosomale Eintrittsstelle) verbunden ist (Yan *et al.*, 2006). Diese Sequenz erlaubt ein autonomes Binden der Ribosomen und verhindert so einen artifiziellen Effekt von *GFP* auf das Onkogen. Nach erfolgreicher Transduktion wurden die Zellen sortiert und in Flüssigkultur oder in semisolidem Medium ausplattiert (Abbildung 58).

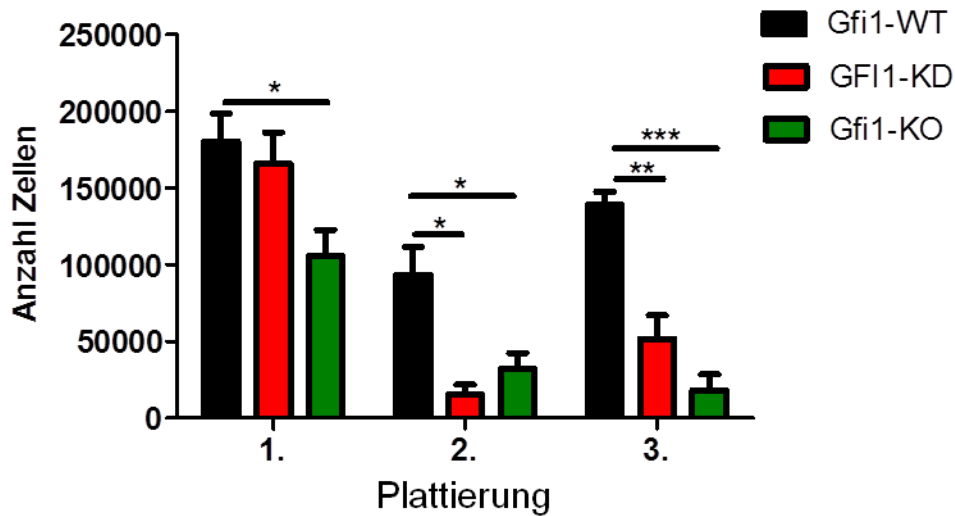


**Abbildung 58: Schematische Darstellung der Isolation von Lin<sup>-</sup>-Zellen der jeweiligen Mausgenotypen und Transduktion der Zellen mit einem AML1-ETO9a exprimierenden Retrovirus.** Die Zellen wurden mittels MACS isoliert und mit einem AML1-ETO9a exprimierenden Retrovirus transduziert. Danach wurden die Zellen sortiert und in Methylcellulose oder Flüssigkultur ausgesät.

Nach 7 Tagen wurden die Zellen aus der Flüssigkultur erstmalig ausgezählt. Es ist in Abbildung 59 zu erkennen, dass *GFI1*-KD- und *Gfi1*-KO-Mäuse im Vergleich zu *Gfi1*-WT-Tieren weniger Zellen expandiert hatten. Die Zellzahl der transduzierten *Gfi1*-WT-Zellen wuchs im Durchschnitt (in den ausgesäten Triplikaten) auf 180.000 Zellen an, wohingegen die *Gfi1*-KO-Mäuse eine durchschnittliche Zellzahl von 105.000 Zellen und *GFI1*-KD-Mäuse von 166.000 Zellen zeigten (Abbildung 59). Für die zweite Plattierung wurden wiederum 5000 Zellen pro Genotyp ausgesät und nach 7 Tagen gezählt. Auffallend war hier, dass nun die *Gfi1*-WT-Mäuse signifikant die meisten Zellen aufwiesen und die *GFI1*-KO-Mäuse die wenigsten (Abbildung 59). Bei der dritten Plattierung kam es bei den *Gfi1*-WT-Zellen zu einer 28-fachen Proliferationszunahme. Die *Gfi1*-KD-Zellen wuchsen nur um das zehnfache und bei den *GFI1*-KO-Zellen konnte eine knapp vierfache Proliferationszunahme verzeichnet werden. Die Expression des Onkofusionsproteins AML1-ETO9a führt demnach zu

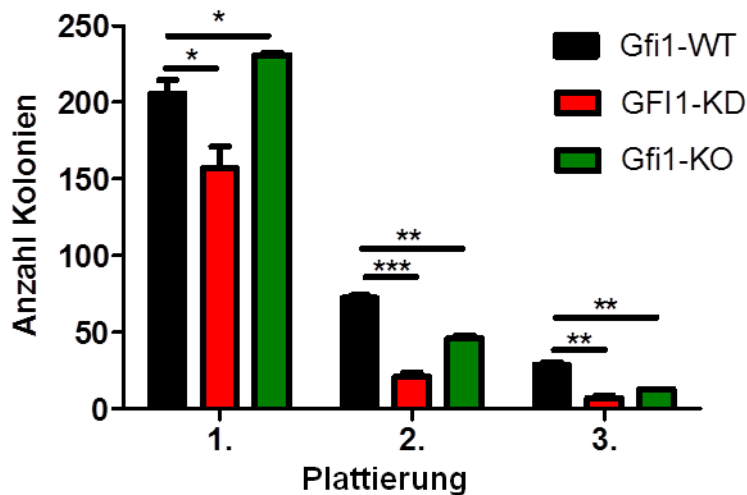


einer stark erhöhten Proliferation von Lin<sup>-</sup>-Zellen beim *Gfi1*-WT, wohingegen eine Wachstumsabnahme bei den *Gfi1*-KO- und *GFI1*-KD-Tieren verzeichnet wurde.



**Abbildung 59: Anwesenheit des Onkofusionsproteins AML1-ETO9a verstärkte die Proliferation von Lin<sup>-</sup>-Zellen der *Gfi1*-WT-Mäuse.** Graphische Darstellung des Proliferationsverhaltens von AML1-ETO9a transfizierten Zellen in Flüssigkultur. Nachdem die Lin<sup>-</sup>-Zellen aus dem KM isoliert worden waren, wurden diese transfiziert und sortiert. Es wurden jeweils 5000 Zellen in Flüssigmedium ausgesät. Nach 7 Tagen wurde die Zellzahl bestimmt. Die Zellen der *Gfi1*-WT-Genotyps zeigte im Gegensatz zu den *GFI1*-KD- und *Gfi1*-KO-Zellen im Verlauf der drei Plattierungen ein gesteigertes Proliferationsverhalten. \* $p < 0,041$ ; \*\* $p < 0,008$ ; \*\*\* $p < 0,0009$ . Gezeigt wird ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt drei Versuchen. *Gfi1*-WT = *Gfi1*-WT-AML1-ETO9a, *GFI1*-KD = *GFI1*-KD-AML1-ETO9a, *GFI1*-KO = *Gfi1*-KO-AML1-ETO9a.

Um die Eigenschaft der Zellen bezüglich ihrer Koloniebildung zu untersuchen, wurde ein sogenanntes *CFU-Assay* (**Colony Forming Unit Assay**) angesetzt. Dieser Test prüft das Koloniebildungspotenzial, genauer gesagt, das multipotente lineage-vermittelte Wachstums- und Proliferationspotential von Vorläuferzellen. Dazu wurden jeweils 1.000 GFP<sup>+</sup>-Zellen in semisolidem Medium ausgesät und die Koloniezahl nach 7 Tagen bestimmt.



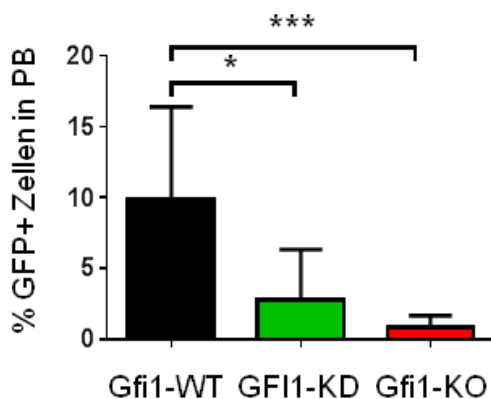
**Abbildung 60: Verminderte GFI1-Expression inhibiert die Koloniebildung von Lin<sup>-</sup>Zellen in Anwesenheit des Onkofusionsprotein AML1-ETO9a.** Graphische Darstellung der Koloniebildung von AML1-ETO9a transfizierten Zellen in Methylcellulose. Nachdem die Lin<sup>-</sup>Zellen aus dem KM isoliert wurden, wurden diese transfiziert und sortiert. Es wurden jeweils 1000 Zellen in Methylcellulose ausgesät. Nach 7-10 Tagen wurde die Koloniezahl bestimmt. Die Zellen vom Gfi1-WT zeigten im Gegensatz zu den GFI1-KD- und Gfi1-KO-Zellen im Verlauf der drei Plattierungen eine höhere Anzahl an Kolonien. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,00084$ ; \*\*\* $p = 0,00008$ . Gezeigt wird ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt drei Versuchen. WT= Gfi1-WT-AML1-ETO9a, GFI1-KD= GFI1-KD-AML1-ETO9a, Gfi1-KO= Gfi1-KO-AML1-ETO9a.

Nach der ersten Plattierung ist zu erkennen, dass die Zellen von der Gfi1-KO-Maus die meisten Kolonien gebildet hatten. Die Zellen der GFI1-KD-Maus hatten im Vergleich zu den Zellen der Gfi1-WT- und Gfi1-KO-Maus die wenigsten Kolonien gebildet. Für die zweite Plattierung wurden wieder 1.000 Zellen der verschiedenen Genotypen ausgesät und nach weiteren 7 Tagen wurde die Anzahl der gebildeten Kolonien gezählt. Hier ist zu erkennen, dass sich die Koloniebildung im Vergleich zu der ersten Plattierung um fast 75% bei allen Proben verringerte. Die Zellen des Gfi1-WT-Genotyps bildeten im Durchschnitt nur noch 75 Kolonien, die Zellen des Gfi1-KO- nur noch 50 und die des GFI1-KD-Genotyps bildeten nur noch 25 Kolonien aus. Nach erneutem Aussäen von 1.000 Zellen der verschiedenen Mäusstämme wurde die Kolonieanzahl ein letztes Mal bestimmt. Bei der dritten Plattierung reduzierten sich die Kolonieanzahlen ein weiteres mal. Die Zellen der Gfi1-WT-maus bildeten im Durchschnitt nur noch 29 Kolonien, die Zellen der Gfi1-KO- nur noch 13 Kolonien und die der GFI1-KD-Maus bildeten lediglich noch 7 Kolonien. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Zellen des GFI1-KD-Genotyps die geringste Koloniebildung und die Zellen des Gfi1-WT-Genotyps im Verlauf des Versuches die

stärkste Koloniebildung aufwies (Abbildung 60). Somit beeinflussen verschiedene *GFI1*-Expressionslevel die Koloniebildung von *AML1-ETO9a* transfizierten murinen Lin<sup>-</sup>-Zellen.

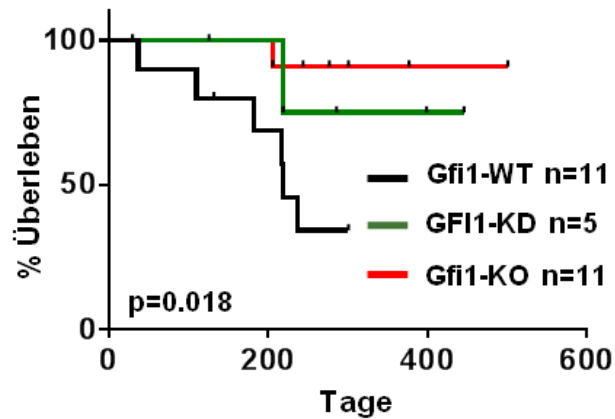
### 7.2.7 *GFI1* ist essentiell für die AML-Progression *in vivo*

Des Weiteren wurden Lin<sup>-</sup>-Zellen von *GFI1*-WT-, *GFI1*-KD- und *Gfi1*-KO-Mäusen isoliert und mit einem *AML1-ETO9a* exprimierenden Retrovirus transduziert (GFP-gekoppelt) und in letal bestrahlte Empfängermäuse transplantiert. Bereits einen Monat nach Transplantation konnte im peripheren Blut ein deutlicher Unterschied am prozentualen Anteil der GFP<sup>+</sup>-Zellen detektiert werden. Die *Gfi1*-WT-*AML1-ETO9a* Mäuse zeigten im Durchschnitt 10% GFP<sup>+</sup>-Zellen. Im Vergleich dazu, zeigten *GFI1*-KD-*AML1-ETO9a* Mäuse nur 3% und *Gfi1*-KO-*AML1-ETO9a* Mäuse nur 1% an GFP<sup>+</sup>-Zellen im peripheren Blut (Abbildung 61).



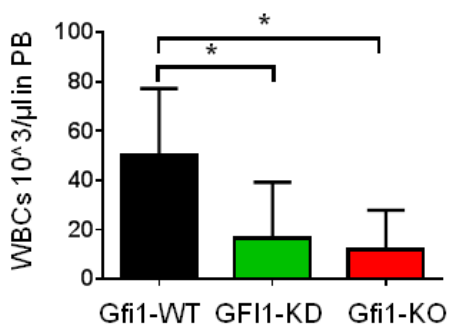
**Abbildung 61: Verschiedene *Gfi1*-Expressionslevel beeinflussen die AML-Progression in Mäusen.** Graphische Abbildung des prozentualen Anteils an GFP<sup>+</sup>-Zellen und somit leukämischen Zellen im peripheren Blut (PB) von Mäusen einem Monat nach Transplantation. Die *Gfi1*-WT-*AML1-ETO9a*-Mäuse zeigten im Durchschnitt 10% GFP<sup>+</sup>-Zellen. Im Vergleich dazu, zeigten *GFI1*-KD-*AML1-ETO9a* Mäuse nur 3% und *Gfi1*-KO-*AML1-ETO9a* Mäuse nur 1% an GFP<sup>+</sup>-Zellen. \* $p=0,023$ ; \*\*\* $p=0,0006$

Nachfolgend wurde das AML-freie-Überleben der Mäuse beobachtet. Anhand der Kaplan-Meier Kurve ist zu erkennen, dass die Mäuse, welche mit *Gfi1*-WT-*AML1-ETO9a*-Zellen transplantiert wurden, schneller an einer AML erkrankten. Im Gegensatz dazu scheint ein reduziertes *GFI1*-Expressionslevel (*GFI1*-KD) und eine fehlende Expression von *GFI1* (*Gfi1*-KO) die AML-Entwicklung zu behindern oder zu verlangsamen (Abbildung 62).



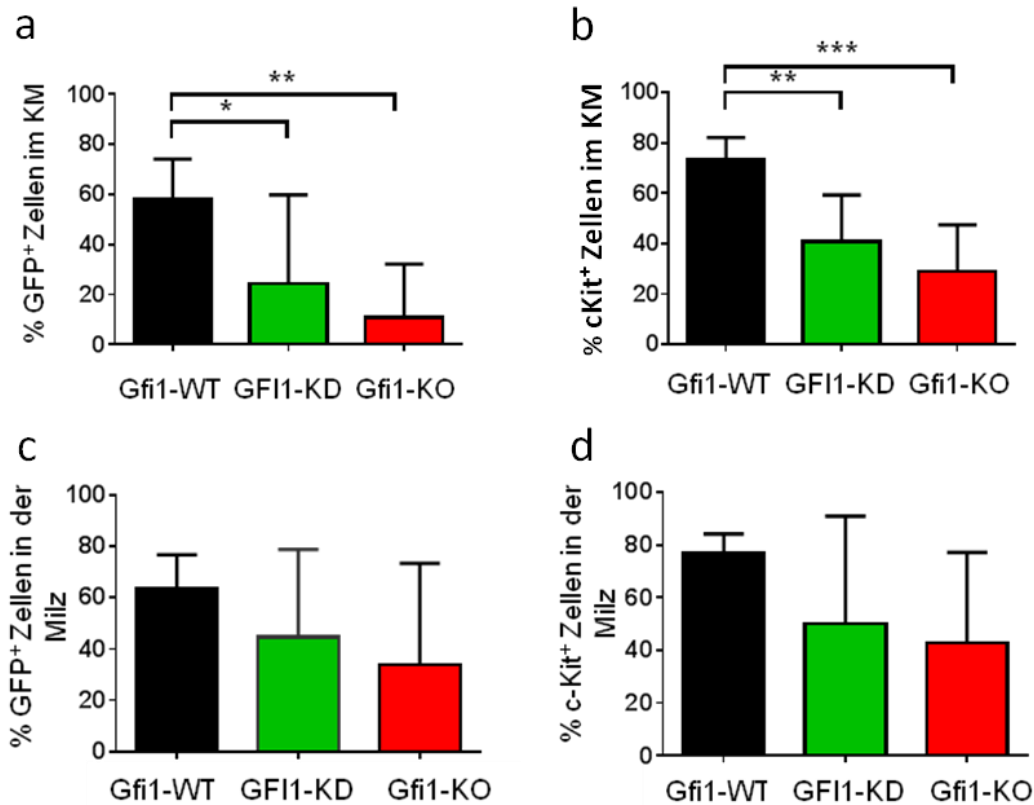
**Abbildung 62: Verschiedene GFI1-Expressionslevel beeinflussen die Manifestation und Progression einer AML in vivo.** Die Kaplan-Meier-Kurve zeigt, dass transplantierte Mäuse mit AML1-ETO9a und normaler Gfi1-Expression (Gfi1-WT) eher eine AML entwickelten als Mäuse mit verringertem GFI1-Expressionslevel. Gfi1-WT= Gfi1-WT-AML1-ETO9a (n=11); GFI1-KD= GFI1-KD-AML1-ETO9a (n=5), Gfi1-KO= Gfi1-KO-AML1-ETO9a (n=11).

Sowohl das KM als auch die Milz und das Blut der erkrankten Mäuse wurden hinsichtlich einer AML mittels Durchflusszytometrie untersucht. Auffallend war, dass die transplantierten Gfi1-WT-AML1-ETO9a-Mäuse einen deutlich höheren Anteil an weißen Blutzellen (WBCs) im peripheren Blut aufwiesen, als die GFI1-KD- und Gfi1-KO-AML1-ETO9a transplantierten Mäuse. Im Durchschnitt hatten Gfi1-WT-AML1-ETO9a-Mäuse 50.000 WBCs im Blut, GFI1-KD-AML1-ETO9a-Mäuse nur 18.000 und GFI1-KO-Mäuse 16.000 WBCs (Abbildung 63).



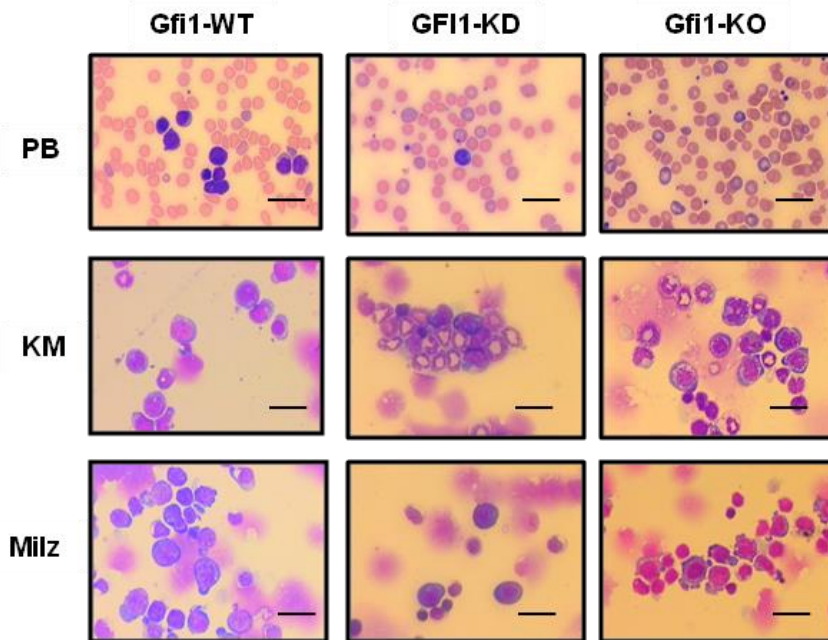
**Abbildung 63: Gfi1-WT Mäuse zeigten einen signifikant höheren Anteil an Blasten im PB als Mäuse mit geringere Gfi1-Expressionslevel.** Im Vergleich zu den Gfi1-WT - Mäusen zeigen die GFI1-KD- und Gfi1-KO-Mäuse einen deutlich geringeren Anteil an Blasten im peripheren Blut. Im Durchschnitt hatten Gfi1-WT Mäuse ca. 50000 WBCs im Blut, GFI1-KD-Mäuse nur 18000 und GFI1-KO-Mäuse ca. 16000 WBCs. \*p<0,037 Gfi1-WT= Gfi1-WT-AML1-ETO9a (n=6); GFI1-KD= GFI1-KD-AML1-ETO9a (n=5), Gfi1-KO= Gfi1-KO-AML1-ETO9a (n=10).

Außerdem zeigten die *Gfi1*-WT-*AML1-ETO9a*-Mäuse einen signifikant höheren Anteil an GFP<sup>+</sup>-Zellen im KM im Vergleich zu den *GFI1*-KD- und *Gfi1*-KO-*AML1-ETO9a*-Mäusen (Abbildung 64a). Bei den transplantierten *Gfi1*-WT-*AML1-ETO9a*-Mäusen konnten fast viermal so viele GFP<sup>+</sup>-Zellen im KM detektiert werden, als bei den *GFI1*-KO-*AML1-ETO9a*-Mäusen. Diese Tendenz konnte auch in den Milzen der transplantierten Mäuse beobachtet werden (Abbildung 64c). Außerdem wiesen die *Gfi1*-WT-*AML1-ETO9a*-Mäuse einen deutlich höheren Anteil (74%) an cKit<sup>+</sup>-Zellen im KM auf (Abbildung 64b). *GFI1*-KD-*AML1-ETO9a*-Mäuse hatten einen Mittelwert der cKit<sup>+</sup>-Zellen von 41% und bei den *Gfi1*-KO-*AML1-ETO9a*-Mäuse konnte ein Mittelwert von 29% detektiert werden. Diese Tendenz konnte auch in den Milzen der verschiedenen Mäuse beobachtet werden (Abbildung 64d).



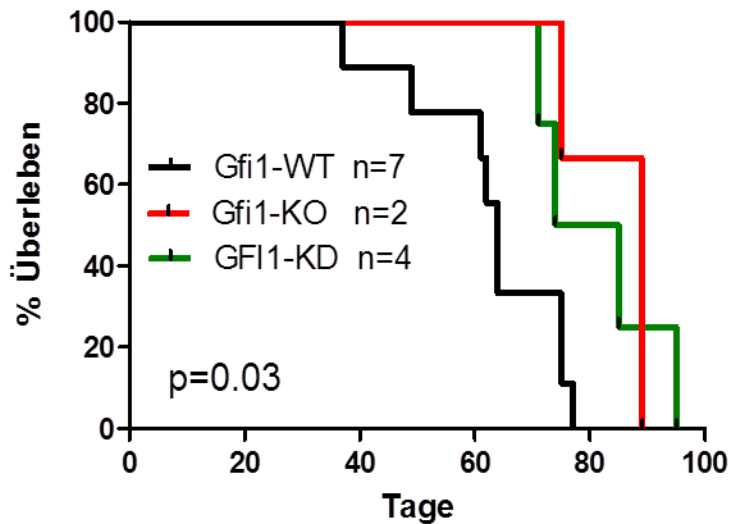
**Abbildung 64: Graphische Darstellung der GFP<sup>+</sup>- und cKit<sup>+</sup>-Zellen im KM und in der Milz der transplantierten Mäuse mit AML1-ETO9a.** a) Graphische Darstellung des prozentualen Anteils von GFP<sup>+</sup>-Zellen im KM der AML1-ETO9a transplantierten Mäuse. Die Gfi1-WT-Mäuse hatten dreimal so viele GFP<sup>+</sup>-Zellen im KM als die GFI1-KD- und sechsmal so viele wie die Gfi1-KO-Mäuse. \* $p=0,045$ ; \*\* $p=0,0024$  b) Graphische Darstellung des prozentualen Anteils von cKit<sup>+</sup>-Zellen im KM der AML-ETO9a transplantierten Mäuse. Die Gfi1-WT-Mäuse hatten fast doppelt so viele cKit<sup>+</sup>-Zellen im KM als die GFI1-KD- und der Gfi1-KO-Mäuse. \*\* $p=0,0015$ ; \*\*\* $p=0,0006$ . c) Graphische Darstellung des prozentualen Anteils von GFP<sup>+</sup>-Zellen in der Milz der AML-ETO9a transplantierten Mäuse. Tendenziell zeigte der Gfi1-WT-Genotyp im Vergleich zum GFI1-KD- und Gfi1-KO-Genotyp den höchsten prozentualen Anteil an GFP<sup>+</sup> Zellen in der Milz. d) Graphische Darstellung des prozentualen Anteils an cKit<sup>+</sup>-Zellen in der Milz der AML1-ETO9a transplantierten Mäuse. Im Vergleich zu GFI1-KD- und Gfi1-KO-Mäusen zeigten die Gfi1-WT-Mäuse tendenziell den höchsten prozentualen Anteil an cKit<sup>+</sup>-Zellen. Gfi1-WT= Gfi1-WT-AML1-ETO9a (n=7); GFI1-KD= GFI1-KD-AML1-ETO9a (n=5), Gfi1-KO= Gfi1-KO-AML1-ETO9a (n=7).

Es ist zu vermuten, dass das Onkofusionsprotein *AML1-ETO9a* den Transkriptionsfaktor *GFI1* benötigt, damit sich eine AML manifestiert. Sowohl das Blut, als auch Cytospins von KM und Milzzellen der verschiedenen Mäuse wurden hinsichtlich der Existenz von Blasten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass auch hier die *Gfi1*-WT-AML1-ETO9a-Mäuse mehr Blasten im peripheren Blut aufwiesen, als die *GFI1*-KD- oder *Gfi1*-KO-AML1-ETO9a-Mäuse. Im KM und in der Milz konnte dies nicht beobachtet werden (Abbildung 65).



**Abbildung 65: Höhere *GFI1*-Expressionslevel führten zu einer Erhöhung an Blasten im peripheren Blut.** Gezeigt werden Ausstriche vom peripheren Blut (PB), KM- und Milzzytospins. Ausstriche von *Gfi1*-WT-Material zeigte im Vergleich zu *GFI1*-KD- und *Gfi1*-KO-Material eine erhöhte Anzahl an Blasten im peripheren Blut. Im KM und in der Milz konnte kein Unterschied detektiert werden. Die Markierung entspricht 20  $\mu$ m. *Gfi1*-WT= *Gfi1*-WT-AML1-ETO9a; *GFI1*-KD= *GFI1*-KD-AML1-ETO9a, *Gfi1*-KO= *Gfi1*-KO-AML1-ETO9a.

Um zu bestätigen, dass es sich bei den erkrankten Mäusen wirklich um eine AML handelte, wurde eine sekundäre Transplantation durchgeführt. Dazu wurden KM-Zellen dieser Mäuse in subletal betrahlte Mäuse transplantiert. Auch hier erkrankten die transplantierten *Gfi1*-WT-AML1-ETO9a-Mäuse signifikant schneller ( $p=0.03$ ) an einer AML als die *GFI1*-KD-AML1-ETO9a- und die *Gfi1*-KO-AML1-ETO9a-Mäuse (Abbildung 66).



**Abbildung 66: Überleben der sekundär transplantierten AML1-ETO9a-Mäuse.** KM-Zellen der primär transplantierten AML1-ETO9a-Mäuse wurden in subletal bestrahlte Empfängermäuse transplantiert. Gfi1-WT= Gfi1-WT-AML1-ETO9a; GFI1-KD= GFI1-KD-AML1-ETO9a, Gfi1-KO= Gfi1-KO-AML1-ETO9a.

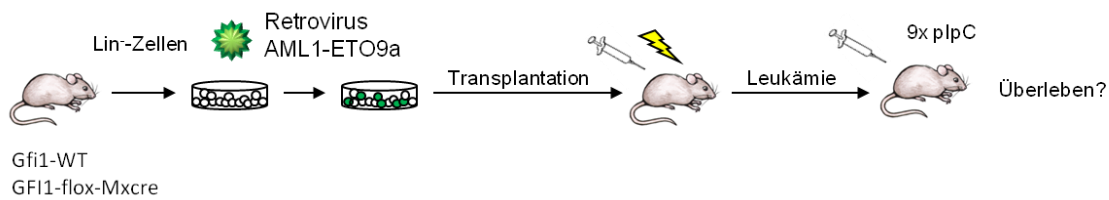
Diese Ergebnisse zeigen, dass das Expressionslevel von *GFI1* eine wesentliche Rolle im AML1-ETO9a-Modell bei der Entwicklung einer AML sowohl *in vitro* als auch *in vivo* spielte.

### 7.2.8 Die Deletion von *GFI1* implizierte eine Verzögerung in der AML-Progression

Vorherige Ergebnisse zeigten, dass *GFI1* eine Rolle bei der Progression der AML spielt. Reduzierte Expressionslevel verzögerten die Entwicklung der AML im AML1-ETO9a-Mausmodell. Es stellte sich die Frage, ob die Reduktion des *GFI1*-Expressionslevels bzw. der Verlust von *GFI1* auch Auswirkungen *in vivo* hat, falls eine AML bereits manifestiert ist. Um dies zu untersuchen, wurden Lin<sup>-</sup>-Zellen von *Gfi1*-WT- und *Gfi1*-flox-Mxcre-Mäusen isoliert und mittels des AML1-ETO9a exprimierenden Retrovirus transduziert. Bei den *Gfi1*-flox-Mxcre-Mäusen ist das *Gfi1*-Gen durch loxP-Stellen flankiert. Durch die Gabe von plpC lässt sich das *Gfi1*-Gen in den Mxcre transgenen Mäusen deletieren, indem plpC die Cre-Rekombinase aktiviert und diese dann die an den loxP-Stellen das Gen herausschneidet. Nach Transduktion mit dem AML1-ETO9a exprimierenden Retrovirus wurden die Zellen in letal bestrahlte Mäuse transplantiert (Abbildung 67). Die Mäuse wurden täglich auf

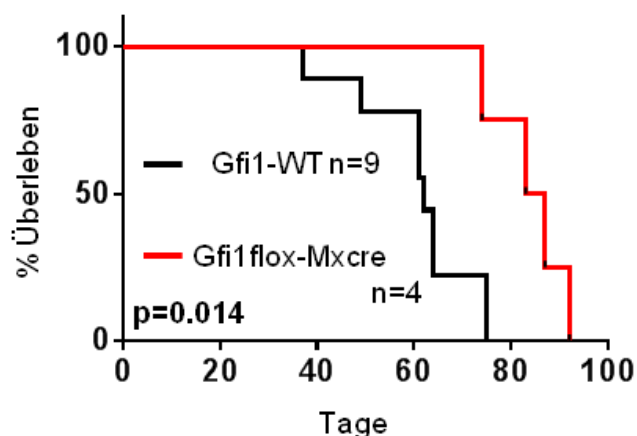


typische Krankheitsanzeichen kontrolliert. Die visuelle Kontrolle wurde durch wöchentliche Blutabnahme unterstützt. Ab dem Zeitpunkt einer beginnenden AML wurde mit der Injektion von plpC begonnen, um das Gfi1-Gen zu deletieren.



**Abbildung 67: Schematische Darstellung des Gfi1-flox-Mxcre-AML1-ETO9a-Transplantationsmodells.** Lin<sup>-</sup>-Zellen von Gfi1-WT- und Gfi1-flox-Mxcre-Mäusen wurden isoliert und mit einem AML1-ETO9a exprimierenden Retrovirus transduziert. Nach Transduktion wurden die Zellen in letal bestrahlte Mäuse transplantiert. Ab dem Zeitpunkt einer beginnenden AML wurden die Mäuse jeden zweiten Tag mit plpC (2 mg/ml; 250 µl) i.p. injiziert.

Anhand der Kaplan-Meier-Kurve kann gezeigt werden, dass die Mäuse, bei denen das Gfi1-Expressionslevel reduziert wurde (Gfi1-flox-Mxcre), ein signifikant längeres Überleben aufwiesen (p=0.014) als die Mäuse mit normaler Gfi1-Expression (Abbildung 68). Gfi1-WT-AML1-ETO9a-Mäuse hatten ein medianes Überleben von 64 Tagen, und Mäuse mit reduziertem Gfi1-Expressionslevel hatten ein medianes Überleben von 84 Tagen.



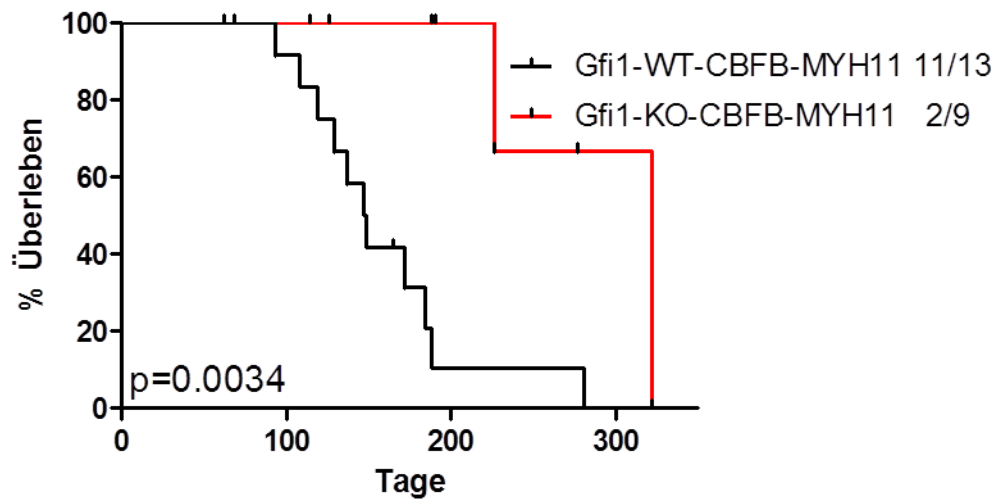
**Abbildung 68: Die Deletion des Gfi1-Gens verzögerte die AML-Progression im AML1-ETO9a-Mausmodell.** Letal bestrahlte Mäuse wurden mit Gfi1-WT- (n=9) und Gfi1-flox-Mxcre-AML1-ETO9a-Zellen (n=4) transplantiert. Nachdem eine beginnende AML festgestellt werden konnte wurden sowohl die Gfi1-WT- als auch die Gfi1-flox-Mxcre-AML1-ETO9a-Mäuse neunmal (jeden zweiten Tag) mit plpC injiziert. Durch die Gabe von plpC konnte das Gfi1-Gen entfernt werden. Es ist zu erkennen, dass Mäuse mit deletiertem Gfi1-Gen ein signifikant längeres Überleben aufwiesen als Gfi1-WT-AML1-ETO9a-Mäuse. Gfi1-WT= Gfi1-WT-AML1-ETO9a, Gfi1 flox-Mxcre= Gfi1-flox-Mxcre-AML1-ETO9a.

Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Deletion des *Gfi1*-Gens während einer beginnenden AML-Progression zu einer Verzögerung der Erkrankung führt.

### **7.2.9 Der *Gfi1*-KO verzögerte die AML-Progression im *CBFB-MYH11*-MxCre-Mausmodell**

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von *GFI1* essentiell für die Progression und Manifestation einer AML in Anwesenheit des Onkoproteins AML1-ETO9a ist. Roudaia et al. (2009) konnten weiterhin zeigen, dass CBF $\beta$  wichtig für die AML-ETO-Aktivität ist (Roudaia et al., 2009). Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde ein weiteres Mausmodell verwendet. Hierbei handelt es sich um das *CBFB-MYH11*-Mausmodell. Das Onkofusionsprotein CBFB-MYH11 als resultat einer Inversion 16 (inv(16) ist bei 10% von AML-Patienten nachweisbar (Claxton et al., 1994; Liu et al., 1996). In diesem Mausmodell kann die Expression von *CBFB-MYH11* konditionell durch die Gabe von plpC induziert werden. Die *Gfi1*-WT- und *Gfi1*-KO-Mäuse wurden mit den *CBFB-MYH11*-Mäusen verkreuzt. Transgene Mäuse im Alter zwischen 6-8 Wochen wurden dann mit plpC injiziert, um die Expression von *CBFB-MYH11* zu induzieren. Die Mäuse wurden täglich hinsichtlich typischer Krankheitsanzeichen untersucht und gegebenenfalls euthanasiert und analysiert.

Bei Betrachtung des AML-freien-Überlebens ist deutlich zu erkennen, dass die Expression von *GFI1* wichtig für die Progression einer AML im *CBFB-MYH11*-Mausmodell war. Das mediane AML-freie-Überleben betrug bei den *Gfi1*-WT-*CBFB-MYH11*-Mäusen 148 Tage, wohingegen *Gfi1*-KO-*CBFB-MYH11*-Mäuse ein medianes AML-freies-Überleben von 322 Tagen aufwiesen (Abbildung 69). Außerdem entwickelten lediglich 2 von 9 *Gfi1*-KO-*CBFB-MYH11*-Mäusen eine AML. Im Gegensatz dazu erkrankten 11 von 13 *Gfi1*-WT-*CBFB-MYH11*-Mäusen an einer AML. Dies entspricht einer AML-Inzidenz von 85%. Im Vergleich betrug die AML-Inzidenz der *Gfi1*-KO-*CBFB-MYH11*-Mäuse nur 22%.



**Abbildung 69: Der Gfi1-KO verzögerte die AML-Progression im CBFB-MYH11-Mausmodell.** Die Kaplan-Meier-Kurve zeigt das AML-frei-Überleben der Gfi1-WT- und Gfi1-KO-CBFB-MYH11 transgenen Mäuse. Mäuse im Alter von 6 bis 8 Wochen wurden 9-mal mit *plpC* injiziert um die Expression des Onkofusionsproteins CBFB-MYH11 zu induzieren. Es ist zu erkennen, dass die Gfi1-WT-CBFB-MYH11-Mäuse schneller an einer AML erkrankten als die Gfi1-KO-CBFB-MYH11-Mäuse. Die Zahlen hinter den verschiedenenen Mausstämmen gibt die Anzahl an AML-erkrankter Mäuse im Verhältnis zu der Gesamtanzahl an. Demnach sind 11 von 13 Gfi1-WT-CBFB-MYH11-Mäusen an einer AML erkrankt.

## 8 Diskussion

Die Leukämogenese ist ein komplexer Prozess regulatorischer Fehlfunktionen von zellulärer Proliferation und Differenzierung. Dieser Prozess kann sowohl in hämatopoetischen Zellen als auch in Zellen derer Umgebung, dem sogenannten „Stroma“ stattfinden. Transkriptionsfaktoren, die essentiell für die Regulation der Genexpression sind, können dabei eine ausschlaggebende Rolle spielen. Dies trifft insbesondere auf solche Transkriptionsfaktoren zu, die in der normalen Hämatopoese bedeutsam sind, wie z. B. *GFI1*. *GFI1* ist neben der Entwicklung der Vorläuferzellen hin zu den reifen Zellen auch für die Aufrechterhaltung der Quieszenz verantwortlich (Hock *et al.*, 2004; Zeng *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2009). Es konnte bereits gezeigt werden, dass *GFI1* eine essentielle Rolle in der Entwicklung der ALL spielt (Khandanpour and Moroy, 2013) und dass Mutationen im *GFI1*-Gen zu einer SCN führen (Person *et al.*, 2003). Ferner konnte gezeigt werden, dass eine Variante von *GFI1* (*GFI1*<sup>36N</sup>) für die Entwicklung der AML prädisponiert (Khandanpour *et al.*, 2010). Außerdem zeigte eine Studie einer kleinen Kohorte von MDS-Patienten, dass es einen Zusammenhang zwischen reduzierten *GFI1*-Expressionsleveln und der Prognose geben könnte (Huh *et al.*, 2009). Diese Hinweise gaben Anlass zu den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, bei der es das Ziel war die Rolle verschiedener *GFI1*-Expressionslevel und deren Auswirkung auf die Genese, Progression und die Prognose der AML zu untersuchen.

### 8.1 Geringe *GFI1*-Expression beeinflusst die Prognose von AML-Patienten

Es wurde zunächst der Einfluss von *GFI1*-Expressionsleveln bei AML-Patienten im Verlauf der Erkrankung untersucht. Die Analyse einer kleinen Kohorte von AML-Patienten der Klinik für Hämatologie des Universitätsklinikums Essen zeigte, dass tatsächlich ein reduziertes *GFI1*-Expressionslevel in den AML-Blasten mit einer schlechteren Prognose korrelierte. Es gab dabei keine Korrelation zwischen AML-Subtypen basierend auf der FAB-Klassifikation (Estey and Dohner, 2006; Dohner *et al.*, 2010), Zytogenetik, Alter oder Geschlecht und geringer *GFI1*-Expression. Dies war überraschend, denn es hätte vermutet werden können, dass eine schlechte Prognose der Patienten mit einem zunehmenden Alter, oder einer laut FAB-Klassifikation definierten schlechten Zytogenetik, mit einer schlechten Prognose einhergeht. Dieses Ergebnis gab Anlass zu der Untersuchung einer weiteren

unabhängigen Kohorte von AML-Patienten (beschrieben von Verhaak et al. (Verhaak et al., 2009)), die bestätigte, dass auch hier ein schlechtes EFS mit einer geringen Expression des *GF11*-Gens assoziiert ist. In dieser Kohorte gab es wiederum keine Korrelation basierend auf dem Alter oder dem Geschlecht. Allerdings konnte hier gezeigt werden, dass Patienten mit geringen *GF11*-Expressionsleveln einen, bezogen auf die Prognose, schlechteren Zytogenetikstatus aufwiesen und dass *CEBP $\alpha$* - oder *NRAS*-Mutationen häufiger bei Patienten mit niedriger *GF11*-Expression auftraten. Eine Erklärung für die Anhäufung von *CEBP $\alpha$* -Mutationen in Patienten mit geringer *GF11*-Expression wäre, dass die *GF11*-Bindungsseiten mit denen von *CEBP*-Proteinen überlappen (Lidonnici et al., 2010) und dass es so zu einer Kollaboration oder zu einer Konkurrenz der beiden Proteine kommen kann. Es konnte bereits gezeigt werden, dass dies wiederum zu einer veränderten Transkriptionsaktivität von *CEBP $\epsilon$*  führt (Khanna-Gupta et al., 2007). Demnach wäre anzunehmen, dass es auch zu einer veränderten Transkriptionsaktivität von *CEBP $\alpha$*  führen kann. Des Weiteren zeigte sich eine erhöhte *EVI1*-Expression bei Patienten mit geringer *GF11*-Expression. *EVI1* ist ein Proto-Onkogen und spielt eine essentielle Rolle in der Pathogenese der humanen AML oder des MDS (Jólkowska and Witt). Eine hohe *EVI1*-Expression resultiert in einer schlechten Prognose bei AML-Patienten (Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani et al., 2003). Da eine hohe *EVI1*-Expression mit einer geringen *GF11*-Expression korreliert, ist zu vermuten, dass *GF11* für die Repression der *EVI1*-Transkription verantwortlich ist. Da dieser Befund der bislang durch Literaturdaten noch nicht untermauert ist, müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um diese Vermutung zu bestätigen.

In der Arbeit von Valk et al. (2004) wurde das Gen-Expressionsmuster von AML-Blasten einer AML-Patientenkohorte untersucht (Valk et al., 2004). Valk und Kollegen definierten Patientengruppen aufgrund ihrer Gen-Expressionssignatur und des Vorhandenseins an Onkofusionsgenen sowie spezifischer Krankheitsentitäten und erstellten so verschiedene Cluster. Die Patienten aus Cluster 5 und 10 zeigten ein schlechtes EFS, wo hingegen die Patienten der Cluster 9, 12 und 13 mit einer guten Prognose und einem guten EFS assoziiert werden konnten. In der vorliegenden Dissertation konnte mittels einer Reanalyse hinsichtlich der *GF11*-Expression gezeigt werden, dass die Patienten der Cluster 5 und 10 (schlechte Prognose) eine geringe Menge an *GF11* exprimierten und im Gegensatz dazu die Patienten der Cluster 9, 12 und 13 (gute Prognose) hohe *GF11*-Expressionslevel aufwiesen. Demnach zeigten

Patienten mit einer schlechten Prognose auch geringe *GFI1*-Expressionslevel. Diese Ergebnisse belegen, dass *GFI1* eine wesentliche Rolle in der AML-Progression spielt (Hones *et al.*, 2016).

## **8.2 Der *Knock-down* von *GFI1* führte zu einer Blockade in der myeloiden Differenzierungsreihe**

Um zu untersuchen, ob verringerte *GFI1*-Expressionslevel die Entstehung der AML beeinflussen, wurde zunächst ein Mausstamm mit verringerter *GFI1*-Expression generiert. Diese Mäuse exprimieren nur noch 5-15% des humanen *GFI1* (Hones *et al.*, 2016). Zu Beginn wurde der Phänotyp der *GFI1*-KD-Mäuse untersucht und es konnte festgestellt werden, dass der Phänotyp dieser Mäuse nicht sonderlich vom Phänotyp der bereits etablierten *Gfi1*-KO-Mäuse abweicht. Deshalb wurde der *GFI1*-KD-Mausstamm als auch die bereits etablierten *GFI1*-KI- und *Gfi1*-KO-Mausstämme (Karsunky *et al.*, 2002; Khandanpour *et al.*, 2012) als geeignet für die nachfolgenden Untersuchungen hinsichtlich der AML-Progression angesehen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die *GFI1*-KD-Mäuse eine Monozytose zeigten und die Differenzierung hin zu reifen Granulozyten blockiert wurde. Es ist davon auszugehen, dass dies eine direkte Konsequenz des herunterregulierten *GFI1*-Expressionslevels ist und nicht durch das Einbringen der Neokassette verursacht wurde. Denn auch andere *Gfi1*-defiziente Mausmodelle zeigten diesen Phänotyp obwohl keine Neokassette im Gen vorhanden war (Hock *et al.*, 2003). Auch im P2A-knock-in-Mausmodell, bei dem das Einbringen einer P2A-Mutation in der *Gfi1*-SNAG-Domäne in einem Funktionsverlust von *Gfi1* resultiert (Fiolka *et al.*, 2006), konnte ein Anstieg der Monozyten und eine Blockierung in der Entwicklung der Neutrophilen nachgewiesen werden. Auch in einem konditionalen *Gfi1*-Deletionsmausmodell, bei dem beide *Gfi1*-Allele deletiert werden und das auch keine Neokassette beinhaltet, konnte dieser Phänotyp beobachtet werden (Zhu *et al.*, 2006). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass *Lin*<sup>-</sup>-Zellen, die mit einem Retrovirusvektor transduziert wurden, der die dominant-negative Variante von *GFI1*N382S exprimiert, einen Verlust der Neutrophilen sowie eine Monozytose aufweisen (Zarebski *et al.*, 2008). Demnach ist davon auszugehen, dass eine Reduzierung des *GFI1*-Expressionslevels oder der Verlust von *Gfi1* in Mausmodellen zu einer Monozytose und einer Neutropenie führen.

Ferner konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der KD und der KO der *GFI1/Gfi1*-Expression zu einer Erhöhung der Anzahl der *GMPs* im KM führte. Dies

lässt sich dadurch erklären, dass *Gfi1* in HSCs und in multipotenten Vorläufern, so auch in *GMPs*, exprimiert wird und die Quieszenz der Stammzellen aufrecht erhält (Hock *et al.*, 2004; Zeng *et al.*, 2004).

Um die Koloniebildungsfähigkeit von  $\text{Lin}^-$ -Zellen der verschiedenen Mausstämme zu untersuchen, wurde ein *CFU*-Assay durchgeführt. Hier zeigten Zellen der *GF11*-KD-Mäuse im Vergleich zu den Zellen der *Gfi1*-KO, *Gfi1*-WT und *GF11*-KI-Mäusen eine signifikant erhöhte Anzahl an Kolonien, sowie eine erhöhte Anzahl an Zellen in Methylcellulose und in Flüssigkultur. Die  $\text{Lin}^-$ -Zellen der *Gfi1*-KO-Mäuse bildeten die wenigsten Kolonien in Methylcellulose und hatten auch die geringste Anzahl an Zellen in der Flüssigkultur. Eine Erklärung hierfür wäre, dass *GF11* zum einen die Proliferation von *HSCs* und Vorläuferzellen inhibiert (Kazanjian *et al.*, 2006) und zur Aufrechterhaltung der Quieszenz dient (Hock *et al.*, 2004; Zeng *et al.*, 2004) und zum anderen die Aktivität des proapoptotischen Proteins p53 reguliert, indem es mit p53 interagiert und dadurch die Apoptose hemmt (Khandanpour *et al.*, 2013). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass *Gfi1* das pro-apoptotische Protein Bax inhibiert (Grimes *et al.*, 1996). Es lässt sich vermuten, dass verringerte *GF11*-Expressionslevel die Proliferation steigert, da es zu einer Enthemmung der Proliferationskontrolle kommt. Im Gegensatz dazu wäre es denkbar, dass der Verlust von *Gfi1* die Proliferationsfähigkeit der Stammzellen beeinträchtigt. Außerdem lässt sich vermuten, dass die  $\text{Lin}^-$ -Zellen der *Gfi1*-KO-Mäuse eine erhöhte Apoptoserate aufweisen, da kein *Gfi1* mehr vorhanden ist, um die Aktivität von p53 und Bax zu inhibieren (Grimes *et al.*, 1996; Khandanpour *et al.*, 2013). Somit könnte *GF11*/*Gfi1* eine dosisabhängige Funktion in der Expansionsfähigkeit von Vorläuferzellen haben. Dies wäre in weiteren Versuchen zu untersuchen.

### **8.3 *GF11*-KD und der Verlust des *Gfi1*-Gens beschleunigten die AML-Progression im *MLL-AF9*-Mausmodell**

Um die Vermutung, dass der KD der *GF11*-Expression eine AML-Entstehung beschleunigen kann, wurden weitere Untersuchungen gemacht. Bisher war sowohl in Mäusen als auch im Menschen gezeigt worden, dass AML-Stammzellen aus *GMPs* hervorgehen können (Ye *et al.*, 2015) und dass ein Differenzierungsdefizit der Zellen in der myeloiden Reihe ein Kennzeichen der AML ist (Goardon *et al.*, 2011; Khandanpour *et al.*, 2012). Zum einen konnte jetzt in dieser Arbeit gezeigt werden,

dass der KD der *GFI1*-Expression zu einem Differenzierungsblock im myeloiden Kompartiment führte und zum anderen in einer Erhöhung von *GMPs* im KM resultiert. Diese zwei Faktoren können die Wahrscheinlichkeit zur Bildung einer AML erhöhen.

Um dies genauer zu untersuchen, wurden *Lin<sup>-</sup>*-Zellen der verschiedenen *GFI1/Gfi1*-Mausstämme mittels eines humanen *MLL-AF9* (t(9;11)(p22;q23)) exprimierenden Retrovirus transduziert. Diese Translokation wird häufig bei AML-Patienten beobachtet und es ist bekannt, dass das daraus resultierende Fusionsprotein eine AML in Mäusen induzieren kann (Krivtsov *et al.*, 2006). Sowohl der Proliferationsassay als auch der Koloniebildungsassay zeigten eine signifikant erhöhte Anzahl an Zellen oder Kolonien beim *GFI1*-KD-Genotyp im Vergleich zu den *GFI1*-KI- und *Gfi1*-KO-Mäusen. Die verschiedenen durchgeführten Versuche zu den Proliferationsassays und dem Koloniebildungsassays variierten in der Anzahl der Zellen oder der Kolonien von Versuch zu Versuch. Grund dafür war mit großer Wahrscheinlichkeit eine unterschiedliche Vitalität der Zellen. Denn diese wurden bei der Transduktion und dem Sortieren hohem Stress ausgesetzt. Jedoch zeigten die verschiedenen Versuche immer die gleiche Tendenz. Auch der Transplantationsversuch mit den *MLL-AF9* transduzierten *Lin<sup>-</sup>*-Zellen zeigte ein kürzeres Überleben der Mäuse, die mit den *GFI1*-KD-*MLL-AF9*-Zellen transplantiert wurden im Vergleich zu den Mäusen, die mit den *GFI1*-KI-*MLL-AF9*-Zellen transplantiert wurden. Allerdings zeigten die Mäuse, die mit den *Gfi1*-KO-*MLL-AF9*-Zellen transplantiert wurden, auch ein signifikant verkürztes Überleben im Vergleich zu den transplantierten *GFI1*-KI-*MLL-AF9*-Mäusen. Eine Erklärung hierfür wäre, dass der Verlust von *Gfi1* zu einer Erhöhung von *Id2* führt und so die Expansion von unreifen myeloischen Zellen gesteigert wird (Li *et al.*, 2010), was wiederum die AML-Progression erleichtern könnte. Allerdings zeigte die Deletion von *Gfi1* eine reduzierte Anzahl an *Lin<sup>-</sup>*-Zellen im Kolonie- und Proliferationsassay. Dies würde den Beobachtungen im Überlebensassay widersprechen. Ein Grund hierfür könnte der starke onkogene Einfluss des Onkofusionsproteins *MLL-AF9* sein. Auch Pession *et al.* (2003) vermuten, dass die *MLL-AF9*-Expression aggressiv genug ist, um eine schwere AML auszulösen, ohne großen Einfluss auf die Apoptose zu haben (Pession *et al.*, 2003). Um dieses Ergebnis weiter zu verifizieren, wurde ein weiteres *MLL-AF9*-Mausmodell verwendet. Hierbei handelte es sich um Mäuse, die transgen für die *MLL-AF9*-Translokation sind. Auch hier erkrankten die heterozygoten *GFI1*-KD-*MLL-AF9*-Mäuse schneller an einer AML als die heterozygoten *GFI1*-KI-*MLL-AF9*-Mäuse.



Ein möglicher Grund könnte, ein Differenzierungsdefizit, der durch die verminderte Expression von *GFI1* verursacht wurde, sein. Es ist bekannt, dass *GFI1* unter physiologischen Bedingungen die Expression des *HOXA9*-Gens reprimiert (Kroon *et al.*, 1998; Thorsteinsdottir *et al.*, 2002), demnach kann der KD der *GFI1*-Expression zu einer Überexpression des *HOXA9*-Gens führen. Diese Konstellation kann in Kombination mit dem Onkofusionsprotein MLL-AF9 zu einer beschleunigten AML-Progression im Mausmodell führen. Es ist anzumerken, dass die transplantierten *GFI1*-KD-MLL-AF9-Mäuse im Vergleich zu den *GFI1*-KI- und *Gfi1*-KO-MLL-AF9-Mäusen sowohl im PB als auch im KM die meisten Blasten aufwiesen. Das bedeutet, dass ein verringertes *GFI1*-Expressionslevel die Formation von Blasten steigert. Mögliche molekulare Mechanismen, die diese Beobachtung erklären können, werden im Teil 8.5 diskutiert.

### **8.4 *GFI1*-KD und der Verlust eines *GFI1*-Allels beschleunigte die AML-Progression im *NUP98/HOXD13*-Mausmodell**

Barzi und Sekeres haben gezeigt, dass ca. 33% der MDS-Patienten im späteren Verlauf der Erkrankung eine AML entwickeln (Barzi and Sekeres, 2010).

Ferner zeigten Mori *et al.*, dass Chromosom1-Deletionen mit der Progression des MDS und der AML assoziiert sind (Mori *et al.*, 2003). Es sollte untersucht werden, ob der *GFI1*-Lokus, der sich auf Chromosom 1p22 befindet, betroffen ist. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Maciejewski wurde die genaue minimale deletierte Region von fünf MDS-Patienten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass alle Patienten eine Deletion im *GFI1*-Lokus aufwiesen. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass der KD der *GFI1*-Expression die AML-Progression und Manifestation beschleunigt. In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob verschiedene *GFI1*-Expressionslevel auch hier die AML-Progression auf dem Boden eines MDS beeinflussen.

Im vorangegangenen Teil untersuchten wir den Einfluss eines verminderten *GFI1*-Expressionslevels in einem etablierten AML-Mausmodell. Dies sollte auch für das etablierte *NUP98/HOXD13*-MDS-Mausmodell untersucht werden.

Dazu wurden die verschiedenen *GFI1/Gfi1*-Mausstämme mit den transgenen *NUP98/HOXD13*-Mäusen gekreuzt. Diese Mäuse exprimieren das humane *NUP98/HOXD13*-Onkofusionsprotein (Lin *et al.*, 2005) und rekapitulieren somit die

t(2;11)(q31;p15)-Translokation. Die Mäuse zeigen typische Symptome eines MDS, wie Dysplasie sowie erhöhte Apoptose, und 90% der transgenen Mäuse entwickeln im späteren Verlauf eine AML (Lin *et al.*, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass der KD der *GFI1*-Expression im Vergleich zu den *GFI1*-KI-, *Gfi1*-WT- oder *Gfi1*-KO-Mäusen die AML-Inzidenz erhöhte und die Latenzzeit bis zur AML-Entwicklung signifikant verkürzte. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass auch der Verlust eines *GFI1*-Allels die Entstehung einer AML im *NUP98/HOXD13*-Modell beschleunigte. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass eine geringe *GFI1*-Expression mit einer Anreicherung an *GMPs* (Ye *et al.*, 2015) und einem Differenzierungsblock in der myeloiden Reihe einhergeht (Goardon *et al.*, 2011; Khandanpour *et al.*, 2012). Dies verstärkt demnach die Dysplasie des MDS und kann so die Wahrscheinlichkeit zur Entwicklung einer AML erhöhen. Ein weiterer Grund kann eine veränderte Expression der *GFI1*-Zielgene sein. Anders als beim *MLL-AF9*-Mausmodell zeigten Mäuse, die kein *Gfi1* mehr exprimierten, eine Verzögerung und eine Inhibierung der AML-Progression. Grund hierfür könnte sein, dass durch den Verlust von *Gfi1* kein p53 mehr inhibiert werden kann und die Apoptoserate, die schon durch das MDS erhöht ist (Lin *et al.*, 2005), noch weiter erhöht wird, so dass sich keine AML manifestieren kann. Es wäre möglich, dass eine verminderte Expression von *GFI1/Gfi1* die Apoptose dennoch inhibiert, der komplette Verlust von *Gfi1* jedoch zu einer deutlichen Erhöhung der Apoptoserate führt (siehe 8.5). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *GFI1/Gfi1* eine dosisabhängige Rolle in der humanen und murinen MDS spielt.

### **8.5 Eine geringe *GFI1*-Expression korrelierte mit verminderter Apoptose, veränderter Genexpression und veränderten Histon-Acetylierungsmustern**

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, den Mechanismus, welcher verantwortlich für den Einfluss der verschiedenen *GFI1*-Expressionsevel auf die Leukämieentwicklung ist, genauer zu erklären. Khandanpour *et al.* (2013) konnten bereits zeigen, dass *GFI1* die Apoptose hemmen kann, indem es an p53 bindet (Khandanpour *et al.*, 2013). Deshalb wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit der Einfluss verschiedener *GFI1/Gfi1*-Expressionslevel auf die Apoptose untersucht.

In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass der Verlust von *Gfi1* mit einer Erhöhung der p53-induzierten Apoptoserate und ein KD der *GFI1*-Expression mit einer Verringerung der Apoptoserate in *GMPs* und Thymozyten einherging. Dies bestätigt die Ergebnisse bereits publizierter Daten (Khandanpour and Moroy, 2013; Khandanpour *et al.*, 2013). Demnach scheinen verminderte *GFI1*-Expressionslevel ausreichend zu sein, um die p53-induzierte Apoptose zu restringieren, wohingegen der Verlust von *Gfi1* führt zu einer deutlichen Erhöhung der Apoptoserate führt. Somit spielt *GFI1/Gfi1* auch hier eine dosisabhängige Rolle.

Es ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor *GFI1* als Repressor fungiert, indem er mit histonmodifizierenden Enzymen interagiert (Zweidler-Mckay *et al.*, 1996; Duan *et al.*, 2005). Deshalb sollten in dieser Arbeit mögliche epigenetische Veränderungen untersucht werden. In Kooperation mit dem "Institute de recherches cliniques de Montréal" (IRCM) in Kanada wurden die epigenetischen Effekte in leukämischen KM-Zellen von *NUP98/HOXD13*-Mäusen mit verschiedenen *GFI1*-Genotypen untersucht. Es wurde das *NUP98/HOXD13*-Mausmodell gewählt, da dieses Modell die charakteristischen Merkmale einer humanen AML rekapituliert (Lin *et al.*, 2005). Die Kollegen konnten zeigen, dass die leukämischen Zellen der *GFI1*-KD-*NUP98/HOXD13*-Mäuse eine Anreicherung von Genen, die nach Valk *et al.* (2004) zu dem von ihnen so definierten Cluster 5 gehören, aufwiesen. Dieses Cluster umfasst eine humane AML-Subgruppe (61 Patienten), die laut Gen-Expressionsprofil alle dem Subtyp M4 und M5 (FAB) angehören, und dies korrelierte mit einer schlechten Prognose (Valk *et al.*, 2004). Aufgrund dessen lässt sich sagen, dass die *GFI1*-KD-*NUP98/HOXD13*-Mäuse den genetischen Zustand einer Gruppe von AML-Patienten mit schlechter Prognose rekapitulieren können. Es ist bekannt, dass *GFI1* in der Lage ist, Genexpressionsprogramme durch Histonmodifikationen zu steuern, indem es HDACs zu ihren Zielgenpromotoren rekrutiert und dies zu einer Deacetylierung des Histons H3 an Lysine 9 (H3K9) führt (Saleque *et al.*, 2007). Die Kooperationspartner des IRCM zeigten mittels Chromatin-Immunpräzipitation bei leukämischen *NUP98/HOXD13*-Zellen, dass die verminderte *GFI1*-Expression zu einer erhöhten H3K9-Acetylierung und somit zu einer erhöhten Expression von *GFI1*-Zielgenen, welche eine wichtige Rolle in der Progression von Leukämien spielen, führt. Es ist anzunehmen, dass reduzierte *GFI1*-Expressionslevel zu einer verringerten Rekrutierung von HDACs zu *GFI1*-Zielgenen führen und dies Grund für die reduzierte Deacetylierung ist. Weitere Analysen der Kollegen des IRCM zeigten,

dass Signalwege, die in der Krebsentwicklung eine wichtige Rolle einnehmen, in *GFI1*-KD-Zellen im Vergleich zu *GFI1*-KI-Zellen eine erhöhte Aktivierung zeigten (Hones *et al.*, 2016). Dies bekräftigt die Funktion von *GFI1* als Onkosuppressor der AML im *NUP98/HOXD13*-Mausmodell.

### 8.6 Epigenetische Therapie als neuer Therapieansatz für leukämische Zellen mit geringer *GFI1*-Expression

Eine epigenetische Therapie mit HDACis (Vorinostat) wird bei Patienten mit myeloiden Krankheiten angewandt, die zum Beispiel aufgrund eines schlechten Allgemeinzustandes nicht mit der konventionellen Therapie (Chemotherapie, Bestrahlung und Stammzelltransplantation) behandelt werden können (Lane and Chabner, 2009; Silva *et al.*, 2013). Allerdings sind die Ergebnisse bisher oft enttäuschend gewesen (Lane and Chabner, 2009; Silva *et al.*, 2013; Kirschbaum *et al.*, 2014).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass sowohl die verschiedenen leukämischen murinen AML-Zellen als auch die verwendeten humanen AML-Zellen mit niedriger *GFI1*-Expression besser auf die Behandlung mit CTK7a (HATi) reagieren als auf die Behandlung mit Vorinostat (HDACi). Dies kann dadurch erklärt werden, dass geringe *GFI1*-Expressionslevel die Deacetylierung von *GFI1*-Zielgenen beeinträchtigen können. Es ist anzunehmen, dass sich unter diesen Zielgenen auch Onkogene befinden, die aufgrund der fehlenden Deacetylierung überexprimiert werden könnten und dies die Entstehung einer AML fördert. Deshalb würde eine weitere induzierte Inhibierung der Deacetylierung durch HDACis keinen therapeutischen Effekt erzielen. Um diese Vermutung zu untermauern, wäre es von Nöten die behandelten Zellen mittels ChIP-Sequenzierung zu untersuchen. Damit könnte festgestellt werden, ob es durch die Behandlung des HATi (CTK7a) zu einer veränderten Acetylierungsrate führt.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit durch die Experimente mit *den GFI1*-KD-*MLL-AF9* transplantierten Mäusen gezeigt werden, dass der oben beschriebene Effekt auch *in vivo* beobachtet werden konnte. Die Mäuse, welche mit CTK7a behandelt wurden, zeigten ein signifikant längeres Überleben, im Vergleich zu den Mäusen, die mit Vorinostat oder DMSO behandelt wurden. Dieses Ergebnis stützt die These, dass eine Behandlung mit HATis (CTK7a) die erhöhte Acetylierung und so auch die

Expression von GFI1-Zielgenen (z. B. Onkogene) revertieren könnte. Dieser Versuch wurde nur einmal durchgeführt und muss daher wiederholt werden um die Ergebnisse zu verifizieren. Außerdem wäre es interessant KM-Proben dieser Mäuse mittels ChIP-Sequenzierung zu untersuchen, um festzustellen ob es zu Veränderungen in der Acetylierung und der mRNA-Expression der GFI1-Zielgene kommt.

### **8.7 Hochregulation der *GFI1*-Expression führte zur terminaler Differenzierung und erhöhter Apoptose im *MLL-AF9*-Mausmodell**

Die bis hier beschriebenen Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass niedrige Expressionslevel von *GFI1* die AML-Entwicklung beschleunigen. Daraus ergab sich die Vermutung, dass eine Revertierung des *GFI1*-KD-Phänotyps eine Auswirkung auf die AML-Entwicklung oder die AML-Progression haben könnte.

Das dazu ausgewählte *GFI1*-KD-MxCre-System sollte erlauben, diese Frage zu beantworten. Die Ergebnisse von diesen Experimenten, in denen der *GFI1*-KD nach der Progression einer AML revertiert wurde, bestätigten die Vermutung, dass die Hochregulation der *GFI1*-Expression eine Art *Rescue-Effekt* darstellen könnte. Denn die Erhöhung des *GFI1*-Expressionslevels resultierte in einer gesteigerten Differenzierung der unreifen KM-Zellen hin zu Granulozyten. Dies war zu erwarten, denn bereits veröffentlichte Daten zeigten, dass GFI1 essentiell für die Bildung von Granulozyten ist (Yucel *et al.*, 2004). Es ist bekannt, dass GFI1 die Entwicklung zwischen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen reguliert, indem es als Antagonist zum Transkriptionsfaktor PU.1 fungiert (Laslo *et al.*, 2006; Spooner *et al.*, 2009). Zusätzlich konnte hier gezeigt werden, dass ein gesteigertes *GFI1*-Expressionslevel mit einer erhöhten Apoptoserate einhergeht. Dies ist verwunderlich, denn publizierte Daten zeigten, dass GFI1 die Apoptoserate minimiert, indem es an p53 bindet (Khandanpour *et al.*, 2013).

Obwohl es bisher unklar ist, ob gesunde Zellen und AML-Zellen unterschiedlich sensitiv auf eine Hochregulation des *GFI1*-Expressionslevels reagieren, wäre es vorstellbar, dass eine Hochregulation von GFI1/Gfi1 einen therapeutischen Ansatz in der Therapie der AML darstellen könnte. Es wäre denkbar, dass ein zielgerichteter Proteasom-Inhibitor, gegen den Ubiquitin-Proteasom-Komplex, der für den Abbau von GFI1 verantwortlich ist, eine Hochregulierung von *GFI1* bewirken könnte.

Marteijn *et al.* konnten zeigen, dass die Ubiquitin-Ligase Triad1 die Ubiquitinierung von Gfi1 *in vitro* hemmt (Marteijn *et al.*, 2007). Weitere grundlegende Studien zu diesem Ansatz könnten einen neuen therapeutischen Ansatz in der Therapie von AML-Patienten mit geringer *GFI1*-Expression darstellen.

### **8.8 GFI1 ist essentiell für die AML-Entwicklung in AML1-ETO9a transduzierten Zellen**

Vorliegende Ergebnisse dieser Dissertation zeigten bereits, dass verschiedene *GFI1*-Expressionsevel unterschiedliche Auswirkungen auf die AML-Progression und Entwicklung im *MLL-AF9*- und *NUP98/HOXD13*-Mausmodell hatten. Um diese Beobachtung zu verifizieren, wurde ein weiteres AML-Modell verwendet, das AML1-ETO9a-Modell. In diesem wurden Lin<sup>-</sup>-Zellen mittels ekotropher retroviraler Transduktion mit einem *AML1-ETO9a* exprimierenden Retrovirus transduziert. Diese AML1-ETO9a (t(8;21)) Translokation kann bei 10-15% der humanen AML-Patienten nachgewiesen werden und stellt somit eine weitere große Gruppe der AML-Fälle dar. Aus diesem Grund, wurde dieses Modell als gut geeignet für weitere Untersuchungen angesehen (Yan *et al.*, 2006; Kumar, 2011). Anhand der hier durchgeführten *in vitro*-Assays (CFU-Assay und Flüssigkulturassay) konnte gezeigt werden, dass *GFI1/Gfi1* essentiell für die onkogene Funktion von AML-ETO9a zu sein scheint. Denn im Verlauf der verschiedenen Plattierungen der transduzierten Zellen reduzierte sich die Anzahl der Kolonien der *GFI1-KD-AML1-ETO9a*- und der *Gfi1-KO-AML1-ETO9a*-Zellen im Vergleich zu den *Gfi1-WT-AML1-ETO9a*-Zellen signifikant. Eine Erklärung für diese Beobachtungen liefert möglicherweise die Arbeit von McGhee *et al.* (2003). Diese Autoren konnten zeigen, dass Gfi1 mit AML1-ETO sowohl *in vitro* als auch *in vivo* an der nuklearen Matrix kolokalisiert war und so dessen Funktion als Onkogen unterstützt (McGhee *et al.*, 2003).

### **8.9 GFI1 ist essentiell für die AML-Progression *in vivo***

Um zu untersuchen, ob *GFI1/Gfi1* auch eine Rolle bei der AML-Progression mit AML1-ETO9a *in vivo* spielt, wurden Lin<sup>-</sup>-Zellen von *GFI1-WT*-, *GFI1-KD*- und *Gfi1-KO*-Mäusen isoliert und mit einem *AML1-ETO9a*-exprimierenden Retrovirus transduziert. Diese leukämischen Zellen wurden in letal bestrahlte Empfängermäuse

transplantiert. Die hier erzielten Ergebnisse zeigen, dass eine Manifestation der leukämischen Zellen und die Progression einer AML signifikant schneller in den transplantierten Mäusen mit normalen *Gfi1*-Expressionsleveln (*Gfi1*-WT-AML1-ETO9a) auftraten. Der KD und der KO der *GFI1/Gfi1*-Expression verzögerte und inhibierte sogar die AML-Entwicklung. Mäuse, die mit *Gfi1*-WT-AML1-ETO9a-Zellen transplantiert wurden, zeigten bereits vier Wochen nach der Transplantation eine signifikant höhere Anzahl an GFP<sup>+</sup>-Zellen im PB im Vergleich zu den Mäusen, die mit *GFI1*-KD- oder *Gfi1*-KO-AML1-ETO9a-Zellen transplantiert wurden. Dies deutet darauf hin, dass leukämische AML-ETO9a-Zellen mit physiologischer *Gfi1*-Expression einen Proliferationsvorteil haben. Außerdem zeigten die *Gfi1*-WT-AML1-ETO9a transplantierten Mäuse im Vergleich zu den *GFI1*-KD- und *Gfi1*-KO-AML1-ETO9a transplantierten Mäuse eine deutlich höhere Anzahl an WBCs im PB, sowie eine signifikant erhöhte Anzahl an GFP<sup>+</sup>-Zellen und cKit<sup>+</sup>-Zellen im KM. Auch diese Ergebnisse lassen vermuten, dass *GFI1/Gfi1* essentiell für die Progression und die Manifestation einer AML im AML1-ETO9a-Mausmodell ist. Auch der konditionale KO der *Gfi1*-Expression bei einer bereits manifestierten AML im AML1-ETO9a-Transplantationsmausmodell verlängerte das Überleben dieser Mäuse signifikant, was die oben aufgestellte These bekräftigt. Andere Arbeiten konnten bereits zeigen, dass *Gfi1* an die NHR2 (*nerve homology region 2*)-Domäne des ETO-Transkripts bindet und so wichtig für dessen onkogene Funktion ist (McGhee *et al.*, 2003; Khandanpour *et al.*, 2010). Diese NHR2-Region ist wichtig für die AML1-ETO9a-induzierte AML ist (Liu *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2009; Wichmann *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2013). Bisher nicht publizierte Daten von Marneth *et al.* zeigten, dass *GFI1* in humanen AML1-ETO<sup>+</sup>-AML-Proben hoch exprimiert wird. Diese Ergebnisse bestätigen die hier gemachte Annahme, dass *GFI1/Gfi1* eine essentielle Rolle in der Manifestation und Progression der AML im AML1-ETO9a-Mausmodell *in vivo* einnimmt.

### 8.10 Der *Gfi1*-KO verzögert die AML-Progression im *CBFB-MYH11*-Mausmodell

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Expression von *GFI1/Gfi1* essentiell für die Progression und Manifestation einer AML in Anwesenheit des Onkoproteins AML1-ETO9a ist, wurde analysiert, ob es auch eine Rolle im *CBFB-MYH11*-Modell spielt. Roudaia *et al.* (2009) konnten zeigen, dass der *core binding factor β* (CBfβ)

essentiell für die AML1-ETO-Aktivität ist (Roudaia *et al.*, 2009). Des Weiteren ist bekannt, dass Gfi1 ein Zielgen von CBF ist (Kuo *et al.*, 2009). Es sollte daher in dieser Arbeit analysiert werden, ob auch Gfi1 eine Rolle im *CBFB-MYH11*-Modell spielt. Das Onkofusionsprotein CBFB-MYH11 (inv(16)/t(16;16)) tritt bei 10% bei der AML-Patienten auf (Claxton *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1996) weshalb es eine weitere wichtige Studiengruppe darstellt. In dem in dieser Arbeit verwendeten Mausmodell kann die Expression von *CBFB-MYH11* konditionell durch die Gabe von plpC induziert werden. Bei Betrachtung des AML-freien-Überlebens war deutlich zu erkennen, dass die *Gfi1*-WT-*CBFB-MYH11*-Mäuse ein signifikant verkürztes Überleben aufwiesen im Vergleich zu den *Gfi1*-KO-*CBFB-MYH11*-Mäusen. Dies lässt annehmen, dass *Gfi1* auch hier einen wichtigen Einfluss auf die Progression der AML im *CBFB-MYH11*-Mausmodell hat. Der *Gfi1*-KO verzögerte und verhinderte die AML-Progression im *CBFB-MYH11*-Mausmodell. Es ist zu vermuten, dass Gfi1 als CBF-Zielgen als Onkogen fungiert. Abschließend lässt sich sagen, dass GFI1 eine dosis- und kontextabhängige Rolle in der Entstehung und der Progression humaner und muriner Leukämien einnimmt.



## 9 Ausblick

Die in dieser Dissertation dargestellten Ergebnisse zeigen, dass verschiedene *GFI1/Gfi1*-Expressionslevel unterschiedliche Auswirkungen auf die AML-Progression und Entwicklung in unterschiedlichen AML-Modellen haben. Geringe Expressionslevel von *GFI1* in AML-Patienten korrelieren mit einer schlechten Prognose. Eine geringe *GFI1*-Expression führt vermutlich zu epigenetischen Veränderungen, die möglicherweise eine veränderte Genexpression im Kontext der LSC-Signatur nach sich zieht. Um diese Vermutungen verifizieren zu können, wären weitere Untersuchungen bezogen auf epigenetische Veränderungen vonnöten.

In Kooperation mit dem Labor von Prof. Tarik Möröy im IRCM in Kanada konnte mittels ChIP-Sequenzierung gezeigt werden, dass es in den leukämischen Zellen mit reduziertem *GFI1*-Expressionslevel in den *NUP98/HOXD13*-Mäusen zu einer erhöhten Acetylierung am Histon H3K9 kommt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Acetylierung mit einer messbaren Erhöhung der mRNA-Level von *GFI1*-Zielgenen einhergeht. Diese Zielgene spielen in Signalwegen der Krebsentstehung und insbesondere der Leukämieentstehung eine Rolle. Es wäre von Interesse mittels ChIP-Sequenzierung Proben der Mäuse aus dem *MLL-AF9*- und dem *AML1-ETO9a*-Modell zu untersuchen, um auch hier den dahinterstehenden Mechanismus genauer zu definieren. Zusätzlich wäre es aufschlussreich auch humane AML-Proben mittels ChIP-Sequenzierung zu untersuchen. Da der KO von *Gfi1* im *MLL-AF9*-Modell die Progression einer AML fördert und im *NUP98/HOXD13*-Modell und *AML1-ETO9a*-Modell verlangsamt bzw. inhibiert, wäre es interessant herauszufinden, welche Mechanismen in Abwesenheit von *Gfi1* in den verschiedenen AML-Modellen ablaufen.

Da in den Ergebnissen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass *Gfi1* essentiell für die Entwicklung einer AML im *AML1-ETO9a*- und *CBFB-MYH11*-Modell ist, wäre es interessant zu prüfen, ob eine Hemmung von *Gfi1* mittels shRNA die Proliferation von leukämischen Zellen, welche die Translokation (t(8;21)) oder die Inversion 16 (inv(16)/t(16;16)) aufweisen, zur Folge hat. Außerdem wäre eine Analyse der Genexpression von *GFI1* in humanen AML1-ETO-positiven-Patienten interessant um die hier gemachten Ergebnisse zu bestätigen.

Die epigenetische Therapie bei MDS- und AML-Patienten, die sich nicht für eine herkömmliche Therapie eignen, gewann in den letzten Jahren immer mehr an

Bedeutung. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass leukämische Zellen mit geringer *GF11*-Expression resistent gegenüber einer Behandlung mit HDACis (Vorinostat) sind. Dies lässt sich dadurch erklären, dass geringe *GF11*-Expressionslevel eine effiziente Deacetylierung von *GF11*-Zielgenen verhindern. Es ist nicht auszuschließen, dass sich unter diesen Genen auch Onkogene befinden. Demnach würde eine induzierte Inhibierung der Deacetylierung durch HDACis den Mechanismus nicht revertieren und keinen Effekt zeigen. Erste Mausversuche zeigten, die Behandlung mit HATis (CTK7a) diesen Mechanismus revertieren könnte. Trotzdem sollten in Zukunft weitere Untersuchungen *in vivo* durchgeführt werden um dieses Ergebnis zu bestätigen. Da es bis jetzt keine Studien gibt, in denen Vorinostat oder CTK7a als alleiniges Agens bei der Behandlung von MDS-Patienten eingesetzt wurde, wären interventionale Studien nötig.

## 10 Zusammenfassung

Aus den Daten dieser Arbeit lässt sich schließen, dass der Transkriptionsfaktor GF11/Gfi1 eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und der Manifestation einer AML einnimmt. AML-Patienten mit geringer *GF11*-Expression in den Blasten zeigten ein signifikant verkürztes EFS und OS. Dies konnte durch die Analyse einer unabhängigen Kohorte von Valk *et al.* bestätigt werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der KD der *GF11*-Expression zu einem Differenzierungsblock im myeloiden Kompartiment im KM von Mäusen führt. Außerdem konnte beobachtet werden, dass der KO und der KD der *Gfi1/GF11*-Expression im *MLL-AF9*-Mausmodell zu einer beschleunigten AML-Progression führt. Hingegen führt eine Hochregulation von *GF11* in einer bereits bestehenden AML zu einer erhöhten Differenzierung der KM-Zellen und zum Verlust der Monozytose.

Im *NUP98/HOXD13*-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass der KO der *Gfi1*-Expression die AML-Progression verhindert und der KD der *GF11*-Expression diese beschleunigt. Auf molekularer Ebene konnten wir mit Hilfe der Kooperationspartner des IRCM in Kanada mittels Chromatin-Immünpräzipitation zeigen, dass es in leukämischen *GF11-KD-NUP98/HOXD13*-Zellen zu einer erhöhten H3K9-Acetylierung und somit zu einer erhöhten Expression von GF11-Zielgenen kommt, die eine wichtige Rolle in der Leukämieentwicklung spielen. Eine Analyse der Genexpressionsdaten (*Gene Set Enrichment Analysis*) zeigte weiterhin, dass die leukämischen Zellen der *GF11-KD-NUP98/HOXD13*-Mäuse eine Anreicherung von Genen, die nach Valk *et al.* (2004) zu dem von ihnen so definierten "Cluster 5" gehören, aufweisen. Aufgrund dessen lässt sich sagen, dass die *GF11-KD-NUP98/HOXD13*-Mäuse den genetischen Zustand von AML-Patienten mit schlechter Prognose rekapitulieren können.

Auch in den *AML1-ETO9a*- und *CBFB-MYH11*-Mausmodellen ist die Anwesenheit von Gfi1 essentiell für die Entwicklung und die Manifestation einer AML. GF11/Gfi1 spielt eine dosis- und kontextabhängige Rolle in der Progression der AML in den hier erwendeten Mausmodellen.

Folglich eröffnen die hier gezeigten Daten einen neuen Blick auf die Behandlung von AML mit epigenetischen Therapeutika. Es konnte *in vitro* sowohl in murinen als auch in humanen leukämischen Zellen gezeigt werden, dass Zellen mit geringem *GF11*-

Expressionslevel besser auf die Behandlung mit dem HATi CTK7a ansprechen. Erste Mausversuche zeigten dies auch *in vivo*.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *GF11/Gfi1* eine dosis- und kontextabhängige Rolle in der Progression der AML in den hier verwendeten Mausmodellen spielt und dass die *GF11/Gfi1*-Expressionslevel als neuer prognostischer Faktor einen Vorteil in der epigenetischen Therapie von MDS/AML-Patienten darstellen würde.

## 11 Summary

The presented data of this doctoral thesis suggest that the transcription factor GF11/Gfi1 plays an important role in the progression and manifestation of AML. AML patients with low *GF11* expression in their blasts showed an inferior prognosis and a shortend EFS and OS. Furthermore, the KD of *GF11* resulted in a block of differentiation in the bone marrow of mice. The KO and the KD of *GF11/Gfi1* lead to an enhanced AML progression in the *MLL-AF9* mouse model. In addition, upregulation of *Gfi1* resulted in an increase of differentiation of bone marrow cells and a decrease of monocytosis in a persisting AML.

It could be shown that the KO of *Gfi1* impeded AML progression whereas the KD of *GF11* accelerated AML progression in the *NUP98/HOXD13* mouse model. In cooperation with the the IRCM in Canada it could also be shown that H3K9 acetylation at GF11 target genes is increased in the bone marrow of *GF11-KD-NUP98/HOXD13* mice. Further analysis of gene expression (Gene Set Enrichment Analysis) showed an upregulation of those genes that belong to "cluster 5" which were defined by Valk et al. as a subgroup of AML patients with poor prognosis. These data suggest, that the *GF11-KD-NUP98/HOXD13* mice recapitulate the situation of AML patients with an inferior prognosis very well.

Moreover, the essential role of GF11/Gfi1 for AML progression and manifestation in *AML1-ETO9a-* and *CBFB-MYH1-* mouse models could be demonstrated.

Furthermore the here depicted results open up new vistas in treating AML patients with epigenetic drugs. As well as in murine as in human leucemic bone marrow cells it could be shown that cells with low *GF11* expression responded better to the treatment with the HATi CTK7a. This could be also confirmed in first *in vivo* experiments.

Taken together, the presented data suggest that GF11/Gfi1 plays a level- and dose-dependent role in progression of AML in the here used mouse models and that different GF11/Gfi1 expression levels could be exploited as new prognostic factor in order to establish a new epigenetic therapy for MDS/AML patients.

## 12 Anhang

## 12.1 Tabellen

**Tabelle 10: Patienten der Kohorte aus dem Universitätsklinikum Essen.** GFI1 gering enthält die Patienten, die weniger als 5% GFI1 exprimieren. GFI1 medium enthält alle Patienten, die zwischen 6%-60% GFI1 exprimierten. GFI1 hoch schließt alle Patienten ein, die 61%-100% GFI1 exprimieren. Zytogenetik geringes Risiko: *inv(16)*, *t(8;21)*; Zytogenetik mittleres Risiko: Komplexe Abberationen ( $\geq 4$  Anomalien), Chromosom 3q; 5,7, Anomalien, *inv(3)*, *t(6;11)*, *t(10;11)*, *t(11q23)*, *t(9;22)*; Zytogenetik mittleres Risiko: alle anderen Aberrationen (Schanz et al., 2012). Gezeigt wird der "Standard error of the mean". Der "Student's t-test" wurde für die Signifikanz der Werte gewählt. Für die Signifikanz der prozentualen Unterschiede wurde der "two sample t-test" benutzt. n.m.= nicht möglich

	Gfi1 niedrig	GFI1 mittel	GFI1 hoch	GFI1 mittel + hoch	p-Wert zwischen niedrig und mittel	p-Wert zwischen niedrig und hoch	p-Wert zwischen niedrig und mittel + hoch
<b>% gesamt</b>	13 (n=4)	70 (n=21)	17 (n=5)	87 (n=26)	-	-	-
<b>Mittelwert Alter</b>	60,5 ± 4,2	56,2 ± 2,9	47,2 ± 9,2	54,5 ± 20,9	0,54	0,27	0,44
<b>Geschlecht (% männlich)</b>	50 (n=2)	48 (n=10)	60 (n=3)	50 (n=13)	0,94	0,77	1
<b>niedriges zytogenetisches Risiko</b>	0 (n=0)	19 (n=4)	40 (n=2)	23 (n=6)	0,35	0,19	0,29
<b>mittleres zytogenetisches Risiko</b>	100 (n=4)	67 (n=14)	60 (n=3)	65 (n=17)	0,19	0,19	0,17
<b>hohes zytogenetisches Risiko</b>	0 (n=0)	5 (n=1)	0 (n=0)	4 (n=1)	0,65	n.m.	0,69
<b>Patienten ohne Information</b>	0 (n=0)	10 (n=2)	0 (n=0)	8 (n=2)	0,52	n.m.	0,56
<b>FAB M0</b>	0 (n=0)	0 (n=0)	0 (n=0)	0 (n=0)	n.m.	n.m.	n.m.
<b>FAB M1</b>	25 (n=1)	20 (n=4)	40 (n=2)	24 (n=6)	0,82	0,65	0,93
<b>FAB M2</b>	25 (n=1)	20 (n=4)	20 (n=1)	15 (n=4)	0,59	0,86	0,62
<b>FAB M4</b>	0 (n=0)	28 (n=6)	20 (n=1)	27 (n=7)	0,24	0,37	0,25
<b>FAB M4E</b>	0 (n=0)	5 (n=1)	0 (n=0)	4 (n=1)	0,65	n.m.	0,69
<b>FAB M5</b>	50 (n=2)	14 (n=3)	20 (n=1)	15 (n=4)	0,11	0,37	0,11
<b>FAB M6</b>	0 (n=0)	0 (n=0)	0 (n=0)	0 (n=0)	n.m.	n.m.	n.m.
<b>Patienten ohne Information</b>	0 (n=0)	20 (n=4)	0 (n=0)	15 (n=4)	0,34	n.m.	0,41

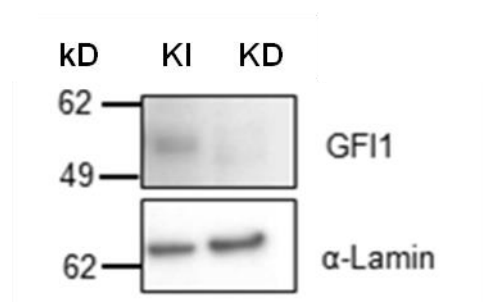
**Tabelle 11: Patienten der Kohorte von Verhaak et al. (2009) (Verhaak et al., 2009).** GFI1 niedrig enthält alle Patienten, die weniger als 5% GFI1 exprimieren. GFI1 mittel enthält alle Patienten, die 6% bis 60% GFI1 exprimieren. GFI1 hoch schließt alle Patienten ein, die 61% bis 100% GFI1 exprimieren. Niedriges zytogenetisches Risiko: inv(16), t(8;21), t(15;17). Hohes zytogenetisches Risiko: Komplexe Aberrationen ( $\geq 4$  Anomalien), Chromosom 3q, 5, 7 Anomalien, inv (3), t(6;11), t(10;11), t(11q23), t(9;22). Mittleres zytogenetisches Risiko: alle anderen Aberrationen. Gezeigt wird der "Standard error of the mean". Der "Student's t-test" wurde für die Signifikanz der Werte gewählt. Für die Signifikanz der prozentualen Unterschiede wurde der "two sample t-test" benutzt. n.m.= nicht möglich

	GFI1 niedrig	GFI1 mittel	GFI1 hoch	GFI1 mittel+ hoch	p-Wert zwischen niedrig und hoch	p-Wert zwischen niedrig und mittel	p-Wert zwischen niedrig und mittel + hoch
<b>% gesamt</b>	11 (n=32)	82 (n=233)	7 (n=20)	89 (n=253)	-	-	-
<b>Mittelwert Alter</b>	45,5 $\pm$ 2,2	43,24 $\pm$ 0,8	38,8 $\pm$ 2,3	42,9 $\pm$ 0,77	0,43	0,46	0,55
<b>Geschlecht (% männlich)</b>	47 (n=15)	56 (n=130)	65 (n=13)	57 (n=143)	0,21	0,34	0,28
<b>niedriges zytogenetisches Risiko</b>	8 (n=2)	19 (n=36)	65 (n=11)	22 (n=47)	0,0006	0,36	0,066
<b>mittleres zytogenetisches Risiko</b>	44 (n=1)	64 (n=125)	29 (n=5)	61 (n=130)	0,5	0,045	0,066
<b>hohes zytogenetisches Risiko</b>	48 (n=12)	16 (n=31)	6 (n=1)	15 (n=32)	0,0001	<0,0001	<0,0001
<b>KRAS-Mutation</b>	3 (n=1)	1 (n=3)	0 (n=0)	1 (n=3)	0,44	0,34	0,33
<b>IDH1-Mutation</b>	3 (n=1)	10 (n=23)	5 (n=1)	10 (n=24)	0,71	0,2	0,2
<b>IDH2-Mutation</b>	9 (n=3)	9 (n=21)	5 (n=1)	10 (n=24)	0,6	1	1
<b>FLT3-TKD-Mutation</b>	0 (n=0)	14 (n=32)	5 (n=1)	13 (n=33)	0,21	0,025	0,03
<b>NRAS-Mutation</b>	22 (n=7)	9 (n=20)	10 (n=2)	9 (n=22)	0,27	0,026	0,024
<b>FLT3-ITD-Mutation</b>	3 (n=1)	33 (n=76)	15 (n=3)	31 (n=79)	0,12	0,0006	0,001
<b>CEBPA-Mutation</b>	22 (n=7)	9 (n=22)	0 (n=0)	4 (n=22)	0,029	0,026	0,0001
<b>NPM1-Mutation</b>	6 (n=2)	37 (n=87)	15 (n=3)	36 (n=90)	0,26	0,0006	0,0001
<b>EVI1-Expression</b>	22 (n=7)	4 (n=9)	0 (n=0)	4 (n=9)	0,029	0,0001	0,0001
<b>FAB M0</b>	19 (n=6)	2 (n=5)	0 (n=0)	2 (n=5)	0,43	0,0097	<0,0001
<b>FAB M1</b>	34 (n=11)	22 (n=52)	20 (n=4)	22 (n=56)	0,28	0,13	0,13
<b>FAB M2</b>	3 (n=1)	22 (n=52)	55 (n=11)	25 (n=63)	0,0001	0,012	0,005
<b>FAB M4</b>	9 (n=3)	22 (n=51)	10 (n=2)	21 (n=53)	0,9	0,089	0,11
<b>FAB M4E</b>	6 (n=2)	0 (n=0)	0 (n=0)	0 (n=0)	0,27	0,0002	0,0001
<b>FAB M5</b>	19 (n=6)	22 (n=52)	15 (n=3)	22 (n=55)	0,71	0,7	0,7
<b>FAB M6</b>	0 (n=0)	1 (n=2)	0 (n=0)	0 (n=0)	n.m.	0,57	n.m.
<b>RAEB</b>	0 (n=0)	2 (n=4)	0 (n=0)	0 (n=0)	n.m.	0,42	n.m.
<b>RAEB-T</b>	0 (n=0)	4 (n=10)	0 (n=0)	0 (n=0)	n.m.	0,25	n.m.
<b>Patienten ohne Information</b>	10 (n=3)	3 (n=7)	11 (n=2)	5 (n=9)	0,91	0,055	0,25

**Tabelle 12: Cox-Regressionstabelle der prognostischen Faktoren der Kohorte von Verhaak et al. (2009).** Die Cox-Regressionsmultivariantente Analyse wurde mit der Patientenkohorte von Verhaak et al. (2009) macht. Mit einbezogen wurden die GFI1-Expression. Diese Analyse wurde mit Hilfe des SPSS-Programms (Version 19; IBM, Düsseldorf) gemacht.

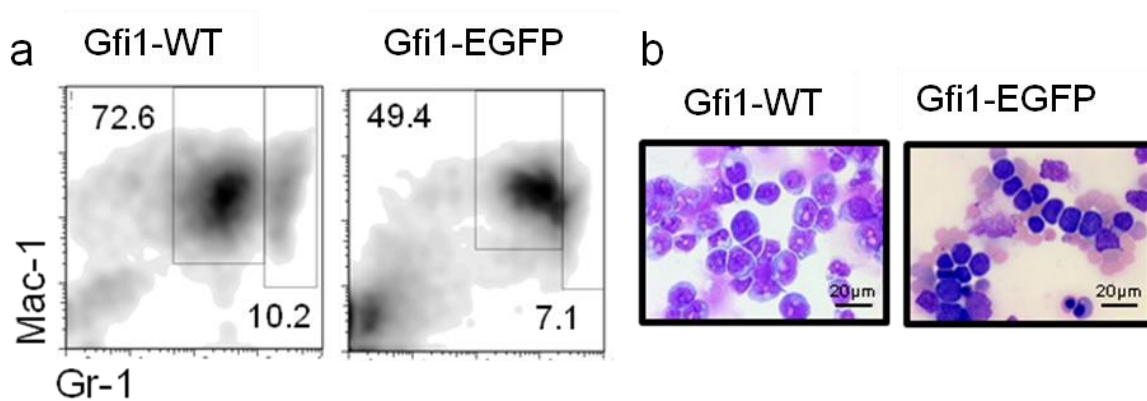
	p-Wert	Hazard Ratio	Weniger 95% Confidence Interval	Mehr 95% Confidence Interval
Karyotyp (gute Prognose)	0,17	0,67	0,4	1,2
NRAS- Mutation (präsent)	0,9	1,03	0,6	1,7
NPM1- Mutation (präsent)	0,02	0,6	0,4	0,9
EVI1- Expression (präsent)	0,09	1,7	0,9	3,2
CEBPA- Mutation (präsent)	0,04	0,5	0,27	0,98
Gfi1- Expression (niedrige Expression)	0,05	3,1	1,01	9,2

## 12.2 Abbildungen

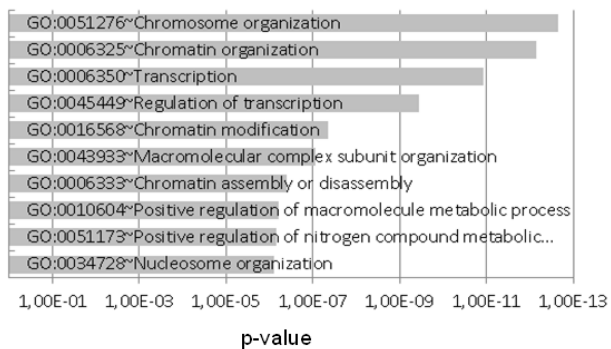


**Abbildung 70: Western Blot des nukleären Extrakts aus KM-Zellen von GFI1-KI- und GFI1-KD-NUP98/HOXD13-Mäusen.** Aus den KM der verschiedenen Mäuse wurde der nukleäre Extrakt separiert und mit 10µg Protein ein Western Blot angefertigt. Die Extrakte aus GFI1-KD-NUP98/HOXD13-Mäuse zeigten eine deutlich reduzierte Menge an GFI1-Protein (55kDa). Als Kontrolle für die Beladung des Gels wurde das Lamin B-Protein (67kDa) benutzt.

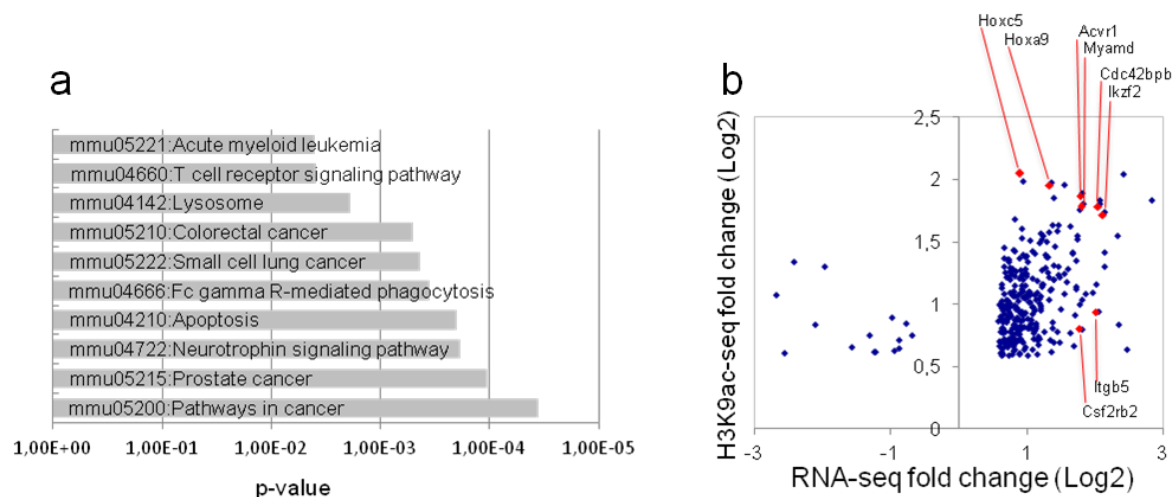




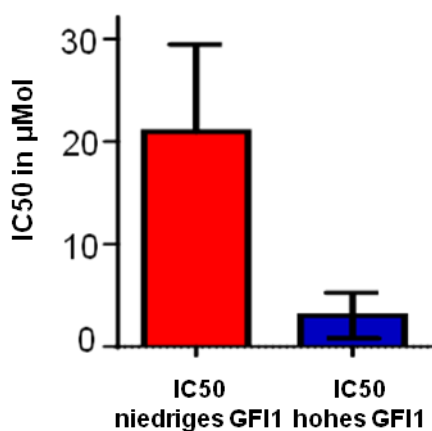
**Abbildung 71: Durchflusszytometrische Analyse und Cytospinns von Gfi1-EGFP-NUP98/HOXD13-Mäusen.** a) Durchflusszytometrische Analyse der Mac-1<sup>+</sup>- und Gr-1<sup>+</sup>-Zellen des KMs der NUP98/HOXD13-transgenen Mäuse. b) Cytospinns vom KM der transgenen NUP98/HOXD13-Mäuse. Gfi1-WT= Gfi1-WT-NUP98/HOXD13, Gfi1-EGFP= Gfi1-EGFP-NUP98/HOXD13.



**Abbildung 72: Der GFI1-KD in NUP98/HOXD13-Mäusen beeinflusst Gene der Chromosomen- und Chromatinorganisation und der Transkriptionsregulation.** Gezeigt werden Gene, die in GFI1-KD-NUP98/HOXD13-Mäusen im Vergleich zu GFI1-KI-NUP98/HOXD13-Mäusen eine erhöhte Acetylierung zeigen. Generiert wurden die Daten mit der Gene Ontology (GO) und der DAVID Software vom Möröy Labor des IRCM in Kanada.



**Abbildung 73: Der GFI1-KD in NUP98/HOXD13-Mäusen beeinflusst Gene, die eine Rolle in der Leukämieentwicklung spielen. a)** KEGG Signalweg von GFI1-Zielgenen zeigte eine erhöhte Acetylierung und Genexpression in leukämischen GFI1-KD Proben im Vergleich zu GFI1-KI Proben. Es wurde die DAVID Software benutzt. GFI1-KD= GFI1-KD-NUP98/HOXD13; GFI1-KI= GFI1-KI-NUP98/HOXD13 **b)** Der Scatter-Plot zeigt die logarithmische relative Veränderung der H3K9-Acetylierung der ChIP-Sequenzierung zwischen GFI1-KD- und GFI1-KI-NUP98/HOXD13- KM von AML Proben im Bezug auf die Veränderung der mRNA-Level. Daten generiert vom IRCM, Möröy Labor in Kanada.



**Abbildung 74: IC50-Konzentration von Vorinostat ist höher bei AML-Zellen mit geringer GFI1-Expression. IC50-Konzentration für Vorinostat bei AML-Zelllinien mit hohen und niedrigen GFI1-Expressionen. \*p=0,0186 (niedriges GFI1: n=3 (CESS, ML2, GDM1); hohes GFI1: n=4; (MonoMac6, HL-60, Kasumi-1, THP1, P31FUJ)) (Garnett et al., 2012)**

### 12.3 Referenzen

- Adolfsson, J., R. Mansson, N. Buza-Vidas, A. Hultquist, K. Liuba, C. T. Jensen, D. Bryder, L. Yang, O. J. Borge, L. A. Thoren, K. Anderson, E. Sitnicka, Y. Sasaki, M. Sigvardsson and S. E. Jacobsen 2005. Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell*, 121(2): 295-306.
- Akashi, K., D. Traver, T. Miyamoto and I. L. Weissman 2000. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, 404(6774): 193-197.
- Antonsson, B., S. Montessuit, S. Lauper, R. Eskes and J. C. Martinou 2000. Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *The Biochemical journal*, 345 Pt 2: 271-278.
- Arif, M., B. M. Vedamurthy, R. Choudhari, Y. B. Ostwal, K. Mantelingu, G. S. Kodaganur and T. K. Kundu 2010. Nitric oxide-mediated histone hyperacetylation in oral cancer: target for a water-soluble HAT inhibitor, CTK7A. *Chemistry & biology*, 17(8): 903-913.
- Aul, C., A. Giagounidis and U. Germing 2010. [Myelodysplastic syndromes]. *Der Internist*, 51(2): 169-182; quiz 183-164.
- Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, S., C. Erpelinck, W. L. van Putten, P. J. Valk, S. van der Poel-van de Luytgaarde, R. Hack, R. Slater, E. M. Smit, H. B. Beverloo, G. Verhoef, L. F. Verdonck, G. J. Ossenkoppele, P. Sonneveld, G. E. de Greef, B. Lowenberg and R. Delwel 2003. High EVI1 expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia: a study of 319 de novo AML patients. *Blood*, 101(3): 837-845.
- Barzi, A. and M. A. Sekeres 2010. Myelodysplastic syndromes: a practical approach to diagnosis and treatment. *Cleveland Clinic journal of medicine*, 77(1): 37-44.
- Bejar, R., R. Levine and B. L. Ebert 2011. Unraveling the molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(5): 504-515.
- Bennett, J. M., D. Catovsky, M. T. Daniel, G. Flandrin, D. A. Galton, H. R. Gralnick and C. Sultan 1985. Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group. *Annals of internal medicine*, 103(3): 460-462.
- Bennett, J. M., D. Catovsky, M. T. Daniel, G. Flandrin, D. A. Galton, H. R. Gralnick and C. Sultan 1991. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *British journal of haematology*, 78(3): 325-329.
- Bird, A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & development*, 16(1): 6-21.
- Bullinger, L., K. Dohner, E. Bair, S. Frohling, R. F. Schlenk, R. Tibshirani, H. Dohner and J. R. Pollack 2004. Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*, 350(16): 1605-1616.
- Cammenga, J., S. Horn, U. Bergholz, G. Sommer, P. Besmer, W. Fiedler and C. Stocking 2005. Extracellular KIT receptor mutants, commonly found in core binding factor AML, are constitutively active and respond to imatinib mesylate. *Blood*, 106(12): 3958-3961.
- Care, R. S., P. J. Valk, A. C. Goodeve, F. M. Abu-Duhier, W. M. Geertsma-Kleinekoort, G. A. Wilson, M. A. Gari, I. R. Peake, B. Lowenberg and J. T. Reilly 2003. Incidence and prognosis of c-KIT and FLT3 mutations in core binding factor (CBF) acute myeloid leukaemias. *British journal of haematology*, 121(5): 775-777.
- Castilla, L. H., L. Garrett, N. Adya, D. Orlic, A. Dutra, S. Anderson, J. Owens, M. Eckhaus, D. Bodine and P. P. Liu 1999. The fusion gene Cbfb-MYH11 blocks myeloid differentiation and predisposes mice to acute myelomonocytic leukaemia. *Nature genetics*, 23(2): 144-146.
- Celton, M., A. Forest, G. Gosse, S. Lemieux, J. Hebert, G. Sauvageau and B. T. Wilhelm 2014. Epigenetic regulation of GATA2 and its impact on normal karyotype acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 28(8): 1617-1626.
- Chen, W., A. R. Kumar, W. A. Hudson, Q. Li, B. Wu, R. A. Staggs, E. A. Lund, T. N. Sam and J. H. Kersey 2008. Malignant transformation initiated by MLL-AF9: gene dosage and critical target cells. *Cancer cell*, 13(5): 432-440.

- Christensen, J. L. and I. L. Weissman 2001. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(25): 14541-14546.
- Claxton, D. F., P. Liu, H. B. Hsu, P. Marlton, J. Hester, F. Collins, A. B. Deisseroth, J. D. Rowley and M. J. Siciliano 1994. Detection of fusion transcripts generated by the inversion 16 chromosome in acute myelogenous leukemia. *Blood*, 83(7): 1750-1756.
- Debes, J. D., T. J. Sebo, C. M. Lohse, L. M. Murphy, D. A. Haugen and D. J. Tindall 2003. p300 in prostate cancer proliferation and progression. *Cancer research*, 63(22): 7638-7640.
- Dohner, H., E. H. Estey, S. Amadori, F. R. Appelbaum, T. Buchner, A. K. Burnett, H. Dombret, P. Fenaux, D. Grimwade, R. A. Larson, F. Lo-Coco, T. Naoe, D. Niederwieser, G. J. Ossenkoppele, M. A. Sanz, J. Sierra, M. S. Tallman, B. Lowenberg and C. D. Bloomfield 2010. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, 115(3): 453-474.
- Doulatov, S., F. Notta, E. Laurenti and J. E. Dick 2012. Hematopoiesis: a human perspective. *Cell stem cell*, 10(2): 120-136.
- Duan, Z., A. Zarebski, D. Montoya-Durango, H. L. Grimes and M. Horwitz 2005. Gfi1 coordinates epigenetic repression of p21Cip/WAF1 by recruitment of histone lysine methyltransferase G9a and histone deacetylase 1. *Molecular and cellular biology*, 25(23): 10338-10351.
- Duvic, M., R. Talpur, X. Ni, C. Zhang, P. Hazarika, C. Kelly, J. H. Chiao, J. F. Reilly, J. L. Ricker, V. M. Richon and S. R. Frankel 2007. Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood*, 109(1): 31-39.
- Egger, G., G. Liang, A. Aparicio and P. A. Jones 2004. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 429(6990): 457-463.
- Ehninger, G., H. Link and W. E. Berdel, 2008. Akute myeloische Leukämie: Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie, Prognose; mit 29 Tabellen. Deutscher Ärzteverlag.
- Eppert, K., K. Takenaka, E. R. Lechman, L. Waldron, B. Nilsson, P. van Galen, K. H. Metzeler, A. Poepl, V. Ling, J. Beyene, A. J. Canty, J. S. Danska, S. K. Bohlander, C. Buske, M. D. Minden, T. R. Golub, I. Jurisica, B. L. Ebert and J. E. Dick 2011. Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nature medicine*, 17(9): 1086-1093.
- Eskes, R., S. Desagher, B. Antonsson and J. C. Martinou 2000. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Molecular and cellular biology*, 20(3): 929-935.
- Estey, E. and H. Dohner 2006. Acute myeloid leukaemia. *Lancet*, 368(9550): 1894-1907.
- Fadok, V. A. and P. M. Henson 2003. Apoptosis: giving phosphatidylserine recognition an assist--with a twist. *Current biology : CB*, 13(16): R655-657.
- Fialkow, P. J. 1976. Clonal origin of human tumors. *Biochimica et biophysica acta*, 458(3): 283-321.
- Finnin, M. S., J. R. Donigian, A. Cohen, V. M. Richon, R. A. Rifkind, P. A. Marks, R. Breslow and N. P. Pavletich 1999. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature*, 401(6749): 188-193.
- Fiolka, K., R. Hertzano, L. Vassen, H. Zeng, O. Hermesh, K. B. Avraham, U. Duhrsen and T. Moroy 2006. Gfi1 and Gfi1b act equivalently in haematopoiesis, but have distinct, non-overlapping functions in inner ear development. *EMBO reports*, 7(3): 326-333.
- Frohling, S., C. Scholl, D. G. Gilliland and R. L. Levine 2005. Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(26): 6285-6295.
- Garcia-Manero, G. 2008. Demethylating agents in myeloid malignancies. *Current opinion in oncology*, 20(6): 705-710.
- Garcia-Manero, G., H. Yang, C. Bueso-Ramos, A. Ferrajoli, J. Cortes, W. G. Wierda, S. Faderl, C. Koller, G. Morris, G. Rosner, A. Loboda, V. R. Fantin, S. S. Randolph, J. S. Hardwick, J. F. Reilly, C. Chen, J. L. Ricker, J. P. Secrist, V. M. Richon, S. R. Frankel and H. M. Kantarjian 2008. Phase 1 study of the histone deacetylase inhibitor vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid [SAHA]) in patients with advanced leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood*, 111(3): 1060-1066.

- Garnett, M. J., E. J. Edelman, S. J. Heidorn, C. D. Greenman, A. Dastur, K. W. Lau, P. Greninger, I. R. Thompson, X. Luo, J. Soares, Q. Liu, F. Iorio, D. Surdez, L. Chen, R. J. Milano, G. R. Bignell, A. T. Tam, H. Davies, J. A. Stevenson, S. Barthorpe, S. R. Lutz, F. Kogera, K. Lawrence, A. McLaren-Douglas, X. Mitropoulos, T. Mironenko, H. Thi, L. Richardson, W. Zhou, F. Jewitt, T. Zhang, P. O'Brien, J. L. Boisvert, S. Price, W. Hur, W. Yang, X. Deng, A. Butler, H. G. Choi, J. W. Chang, J. Baselga, I. Stamenkovic, J. A. Engelman, S. V. Sharma, O. Delattre, J. Saez-Rodriguez, N. S. Gray, J. Settleman, P. A. Futreal, D. A. Haber, M. R. Stratton, S. Ramaswamy, U. McDermott and C. H. Benes 2012. Systematic identification of genomic markers of drug sensitivity in cancer cells. *Nature*, 483(7391): 570-575.
- Gatta, G., R. Capocaccia, C. Stiller, P. Kaatsch, F. Berrino and M. Terenziani 2005. Childhood cancer survival trends in Europe: a EUROCARE Working Group study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(16): 3742-3751.
- Gilks, C. B., S. E. Bear, H. L. Grimes and P. N. Tsichlis 1993. Progression of interleukin-2 (IL-2)-dependent rat T cell lymphoma lines to IL-2-independent growth following activation of a gene (Gfi-1) encoding a novel zinc finger protein. *Molecular and cellular biology*, 13(3): 1759-1768.
- Gilliland, D. G. and J. D. Griffin 2002. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*, 100(5): 1532-1542.
- Giordano, A. and M. L. Avantaggiati 1999. p300 and CBP: partners for life and death. *Journal of cellular physiology*, 181(2): 218-230.
- Goardon, N., E. Marchi, A. Atzberger, L. Quek, A. Schuh, S. Soneji, P. Woll, A. Mead, K. A. Alford, R. Rout, S. Chaudhury, A. Gilkes, S. Knapper, K. Beldjord, S. Begum, S. Rose, N. Geddes, M. Griffiths, G. Standen, A. Sternberg, J. Cavenagh, H. Hunter, D. Bowen, S. Killick, L. Robinson, A. Price, E. Macintyre, P. Virgo, A. Burnett, C. Craddock, T. Enver, S. E. Jacobsen, C. Porcher and P. Vyas 2011. Coexistence of LMPP-like and GMP-like leukemia stem cells in acute myeloid leukemia. *Cancer cell*, 19(1): 138-152.
- Gong, J., B. Wu, T. Guo, S. Zhou, B. He and X. Peng 2014. Hyperleukocytosis: A report of five cases and review of the literature. *Oncology letters*, 8(4): 1825-1827.
- Grant, S., C. Easley and P. Kirkpatrick 2007. Vorinostat. *Nature reviews. Drug discovery*, 6(1): 21-22.
- Grimes, H. L., T. O. Chan, P. A. Zweidler-McKay, B. Tong and P. N. Tsichlis 1996. The Gfi-1 proto-oncoprotein contains a novel transcriptional repressor domain, SNAG, and inhibits G1 arrest induced by interleukin-2 withdrawal. *Molecular and cellular biology*, 16(11): 6263-6272.
- Grimes, H. L., C. B. Gilks, T. O. Chan, S. Porter and P. N. Tsichlis 1996. The Gfi-1 proto-oncoprotein represses Bax expression and inhibits T-cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(25): 14569-14573.
- Haberland, M., R. L. Montgomery and E. N. Olson 2009. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nature reviews. Genetics*, 10(1): 32-42.
- Halkidou, K., L. Gaughan, S. Cook, H. Y. Leung, D. E. Neal and C. N. Robson 2004. Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *The Prostate*, 59(2): 177-189.
- Hamblin, T. 1992. Clinical features of MDS. *Leukemia research*, 16(1): 89-93.
- Hebbes, T. R., A. W. Thorne and C. Crane-Robinson 1988. A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *The EMBO journal*, 7(5): 1395-1402.
- Hellenbrecht, A., N. Messerer and N. Gokbuget 2003. Häufigkeit von Leukämien bei Erwachsenen in Deutschland. *Kompetenznetz Leukämien Stand*.
- Hock, H., M. J. Hamblen, H. M. Rooke, J. W. Schindler, S. Saleque, Y. Fujiwara and S. H. Orkin 2004. Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells. *Nature*, 431(7011): 1002-1007.
- Hock, H., M. J. Hamblen, H. M. Rooke, D. Traver, R. T. Bronson, S. Cameron and S. H. Orkin 2003. Intrinsic requirement for zinc finger transcription factor Gfi-1 in neutrophil differentiation. *Immunity*, 18(1): 109-120.

- Holzenberger, M., C. Lenzner, P. Leneuve, R. Zaoui, G. Hamard, S. Vaulont and Y. L. Bouc 2000. Cre-mediated germline mosaicism: a method allowing rapid generation of several alleles of a target gene. *Nucleic acids research*, 28(21): E92.
- Hones, J. M., L. Botezatu, A. Helness, C. Vadnais, L. Vassen, F. Robert, S. M. Hergenhan, A. Thivakaran, J. Schutte, Y. S. Al-Matary, R. F. Lams, J. Fraszczak, H. Makishima, T. Radivoyevitch, B. Przychodzen, S. V. da Conceicao Castro, A. Gorgens, B. Giebel, L. Klein-Hitpass, K. Lennartz, M. Heuser, C. Thiede, G. Ehninger, U. Duhrsen, J. Maciejewski, T. Moroy and C. Khandanpour 2016. GFI1 as a novel prognostic and therapeutic factor for AML/MDS. *Leukemia*.
- Horner, M., L. Ries, M. Krapcho, N. Neyman, R. Aminou, N. Howlader, S. Altekruse, E. Feuer, L. Huang and A. Mariotto, 2009. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006, National Cancer Institute. Bethesda, MD.
- Huggett, J., K. Dheda, S. Bustin and A. Zumla 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and immunity*, 6(4): 279-284.
- Huh, H. J., S. L. Chae, M. Lee, K. S. Hong, Y. C. Mun, C. M. Seong, W. S. Chung and J. W. Huh 2009. CD34, RAB20, PU.1 and GFI1 mRNA expression in myelodysplastic syndrome. *International journal of laboratory hematology*, 31(3): 344-351.
- Huret, J. L., M. Ahmad, M. Arsaban, A. Bernheim, J. Cigna, F. Desangles, J. C. Guignard, M. C. Jacquemot-Perbal, M. Labarussias, V. Leberre, A. Malo, C. Morel-Pair, H. Mossafa, J. C. Potier, G. Texier, F. Viguie, S. Yau Chun Wan-Senon, A. Zasadzinski and P. Dessen 2013. Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology in 2013. *Nucleic acids research*, 41(Database issue): D920-924.
- Jófkowska, J. and M. Witt The *EVI-1* gene &#x2014; its role in pathogenesis of human leukemias. *Leukemia research*, 24(7): 553-558. Available from [http://dx.doi.org/10.1016/S0145-2126\(00\)00031-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0145-2126(00)00031-X) [Accessed 2016/05/18].
- Jones, P. A. and S. B. Baylin 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature reviews. Genetics*, 3(6): 415-428.
- Jones, P. A. and S. B. Baylin 2007. The epigenomics of cancer. *Cell*, 128(4): 683-692.
- Jones, P. L., G. J. Veenstra, P. A. Wade, D. Vermaak, S. U. Kass, N. Landsberger, J. Strouboulis and A. P. Wolffe 1998. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature genetics*, 19(2): 187-191.
- Karsunky, H., H. Zeng, T. Schmidt, B. Zevnik, R. Kluge, K. W. Schmid, U. Duhrsen and T. Moroy 2002. Inflammatory reactions and severe neutropenia in mice lacking the transcriptional repressor Gfi1. *Nature genetics*, 30(3): 295-300.
- Kazanjan, A., E. A. Gross and H. L. Grimes 2006. The growth factor independence-1 transcription factor: new functions and new insights. *Critical reviews in oncology/hematology*, 59(2): 85-97.
- Kazanjan, A., D. Wallis, N. Au, R. Nigam, K. J. Venken, P. T. Cagle, B. F. Dickey, H. J. Bellen, C. B. Gilks and H. L. Grimes 2004. Growth factor independence-1 is expressed in primary human neuroendocrine lung carcinomas and mediates the differentiation of murine pulmonary neuroendocrine cells. *Cancer research*, 64(19): 6874-6882.
- Kelly, L. M. and D. G. Gilliland 2002. Genetics of myeloid leukemias. *Annual review of genomics and human genetics*, 3: 179-198.
- Kelly, W. K. and P. A. Marks 2005. Drug insight: Histone deacetylase inhibitors--development of the new targeted anticancer agent suberoylanilide hydroxamic acid. *Nature clinical practice. Oncology*, 2(3): 150-157.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie and A. R. Currie 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4): 239-257.
- Khandanpour, C., J. Krongold, J. Schutte, F. Bouwman, L. Vassen, M. C. Gaudreau, R. Chen, F. J. Calero-Nieto, E. Diamanti, R. Hannah, S. E. Meyer, H. L. Grimes, B. A. van der Reijden, J. H. Jansen, C. V. Patel, J. K. Peeters, B. Lowenberg, U. Duhrsen, B. Gottgens and T. Moroy 2012. The human GFI136N variant induces epigenetic changes at the *Hoxa9* locus and accelerates K-RAS driven myeloproliferative disorder in mice. *Blood*, 120(19): 4006-4017.

- Khandanpour, C. and T. Moroy 2013. Growth factor independence 1 (Gfi1) as a regulator of p53 activity and a new therapeutical target for ALL. *Oncotarget*, 4(3): 374-375.
- Khandanpour, C., J. D. Phelan, L. Vassen, J. Schutte, R. Chen, S. R. Horman, M. C. Gaudreau, J. Krongold, J. Zhu, W. E. Paul, U. Duhrsen, B. Gottgens, H. L. Grimes and T. Moroy 2013. Growth factor independence 1 antagonizes a p53-induced DNA damage response pathway in lymphoblastic leukemia. *Cancer cell*, 23(2): 200-214.
- Khandanpour, C., E. Sharif-Askari, L. Vassen, M. C. Gaudreau, J. Zhu, W. E. Paul, T. Okayama, C. Kosan and T. Moroy 2010. Evidence that growth factor independence 1b regulates dormancy and peripheral blood mobilization of hematopoietic stem cells. *Blood*, 116(24): 5149-5161.
- Khandanpour, C., C. Thiede, P. J. Valk, E. Sharif-Askari, H. Nuckel, D. Lohmann, B. Horsthemke, W. Siffert, A. Neubauer, K. H. Grzeschik, C. D. Bloomfield, G. Marcucci, K. Maharry, M. L. Slovak, B. A. van der Reijden, J. H. Jansen, H. K. Schackert, K. Afshar, S. Schnittger, J. K. Peeters, F. Kroschinsky, G. Ehninger, B. Lowenberg, U. Duhrsen and T. Moroy 2010. A variant allele of Growth Factor Independence 1 (GFI1) is associated with acute myeloid leukemia. *Blood*, 115(12): 2462-2472.
- Khanna-Gupta, A., H. Sun, T. Zibello, H. M. Lee, R. Dahl, L. A. Boxer and N. Berliner 2007. Growth factor independence-1 (Gfi-1) plays a role in mediating specific granule deficiency (SGD) in a patient lacking a gene-inactivating mutation in the C/EBPepsilon gene. *Blood*, 109(10): 4181-4190.
- Kirschbaum, M., I. Gojo, S. L. Goldberg, C. Bredeson, L. A. Kujawski, A. Yang, P. Marks, P. Frankel, X. Sun, A. Tosolini, J. E. Eid, G. M. Lubiniecki and J. P. Issa 2014. A phase 1 clinical trial of vorinostat in combination with decitabine in patients with acute myeloid leukaemia or myelodysplastic syndrome. *British journal of haematology*, 167(2): 185-193.
- Kogan, S. C., J. M. Ward, M. R. Anver, J. J. Berman, C. Brayton, R. D. Cardiff, J. S. Carter, S. de Coronado, J. R. Downing, T. N. Fredrickson, D. C. Haines, A. W. Harris, N. L. Harris, H. Hiai, E. S. Jaffe, I. C. MacLennan, P. P. Pandolfi, P. K. Pattengale, A. S. Perkins, R. M. Simpson, M. S. Tuttle, J. F. Wong and H. C. Morse, 3rd 2002. Bethesda proposals for classification of nonlymphoid hematopoietic neoplasms in mice. *Blood*, 100(1): 238-245.
- Kondo, M., I. L. Weissman and K. Akashi 1997. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*, 91(5): 661-672.
- Kosan, C. and M. Godmann 2016. Genetic and Epigenetic Mechanisms That Maintain Hematopoietic Stem Cell Function. *Stem cells international*, 2016: 5178965.
- Kouzarides, T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4): 693-705.
- Krivtsov, A. V., D. Twomey, Z. Feng, M. C. Stubbs, Y. Wang, J. Faber, J. E. Levine, J. Wang, W. C. Hahn, D. G. Gilliland, T. R. Golub and S. A. Armstrong 2006. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature*, 442(7104): 818-822.
- Kroon, E., J. Kros, U. Thorsteinsdottir, S. Baban, A. M. Buchberg and G. Sauvageau 1998. Hoxa9 transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with Meis1a but not Pbx1b. *The EMBO journal*, 17(13): 3714-3725.
- Kumar, C. C. 2011. Genetic abnormalities and challenges in the treatment of acute myeloid leukemia. *Genes & cancer*, 2(2): 95-107.
- Kuo, M. C., D. C. Liang, C. F. Huang, Y. S. Shih, J. H. Wu, T. L. Lin and L. Y. Shih 2009. RUNX1 mutations are frequent in chronic myelomonocytic leukemia and mutations at the C-terminal region might predict acute myeloid leukemia transformation. *Leukemia*, 23(8): 1426-1431.
- Kuo, Y. H., S. F. Landrette, S. A. Heilman, P. N. Perrat, L. Garrett, P. P. Liu, M. M. Le Beau, S. C. Kogan and L. H. Castilla 2006. Cbf beta-SMMHC induces distinct abnormal myeloid progenitors able to develop acute myeloid leukemia. *Cancer cell*, 9(1): 57-68.
- Kuo, Y. H., S. K. Zaidi, S. Gornostaeva, T. Komori, G. S. Stein and L. H. Castilla 2009. Runx2 induces acute myeloid leukemia in cooperation with Cbfbeta-SMMHC in mice. *Blood*, 113(14): 3323-3332.
- Lane, A. A. and B. A. Chabner 2009. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(32): 5459-5468.

- Laslo, P., C. J. Spooner, A. Warmflash, D. W. Lancki, H. J. Lee, R. Sciammas, B. N. Gantner, A. R. Dinner and H. Singh 2006. Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates. *Cell*, 126(4): 755-766.
- Lessard, J. and G. Sauvageau 2003. Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature*, 423(6937): 255-260.
- Li, H., M. Ji, K. D. Klarmann and J. R. Keller 2010. Repression of Id2 expression by Gfi-1 is required for B-cell and myeloid development. *Blood*, 116(7): 1060-1069.
- Liang, G., J. C. Lin, V. Wei, C. Yoo, J. C. Cheng, C. T. Nguyen, D. J. Weisenberger, G. Egger, D. Takai, F. A. Gonzales and P. A. Jones 2004. Distinct localization of histone H3 acetylation and H3-K4 methylation to the transcription start sites in the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(19): 7357-7362.
- Lidonnici, M. R., A. Audia, A. R. Soliera, M. Prisco, G. Ferrari-Amorotti, T. Waldron, N. Donato, Y. Zhang, R. V. Martinez, T. L. Holyoake and B. Calabretta 2010. Expression of the transcriptional repressor Gfi-1 is regulated by C/EBP $\alpha$  and is involved in its proliferation and colony formation-inhibitory effects in p210BCR/ABL-expressing cells. *Cancer research*, 70(20): 7949-7959.
- Lin, Y. W., C. Slape, Z. Zhang and P. D. Aplan 2005. NUP98-HOXD13 transgenic mice develop a highly penetrant, severe myelodysplastic syndrome that progresses to acute leukemia. *Blood*, 106(1): 287-295.
- Liu, P. P., C. Wijmenga, A. Hajra, T. B. Blake, C. A. Kelley, R. S. Adelstein, A. Bagg, J. Rector, J. Cotelingam, C. L. Willman and F. S. Collins 1996. Identification of the chimeric protein product of the CFBF-MYH11 fusion gene in inv(16) leukemia cells. *Genes, chromosomes & cancer*, 16(2): 77-87.
- Liu, Y., M. D. Cheney, J. J. Gaudet, M. Chruszcz, S. M. Lukasik, D. Sugiyama, J. Lary, J. Cole, Z. Dauter, W. Minor, N. A. Speck and J. H. Bushweller 2006. The tetramer structure of the Nervy homology two domain, NHR2, is critical for AML1/ETO's activity. *Cancer cell*, 9(4): 249-260.
- Liu, Y., S. E. Elf, Y. Miyata, G. Sashida, Y. Liu, G. Huang, S. Di Giandomenico, J. M. Lee, A. Deblasio, S. Menendez, J. Antipin, B. Reva, A. Koff and S. D. Nimer 2009. p53 regulates hematopoietic stem cell quiescence. *Cell stem cell*, 4(1): 37-48.
- Lowenberg, B., J. R. Downing and A. Burnett 1999. Acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*, 341(14): 1051-1062.
- Luger, K., A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent and T. J. Richmond 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648): 251-260.
- Marks, P. A. 2007. Discovery and development of SAHA as an anticancer agent. *Oncogene*, 26(9): 1351-1356.
- Marteijn, J. A., L. T. van der Meer, L. van Emst, S. van Reijmersdal, W. Wissink, T. de Witte, J. H. Jansen and B. A. Van der Reijden 2007. Gfi1 ubiquitination and proteasomal degradation is inhibited by the ubiquitin ligase Triad1. *Blood*, 110(9): 3128-3135.
- McGhee, L., J. Bryan, L. Elliott, H. L. Grimes, A. Kazanjian, J. N. Davis and S. Meyers 2003. Gfi-1 attaches to the nuclear matrix, associates with ETO (MTG8) and histone deacetylase proteins, and represses transcription using a TSA-sensitive mechanism. *Journal of cellular biochemistry*, 89(5): 1005-1018.
- Mori, N., R. Morosetti, H. Mizoguchi and H. P. Koeffler 2003. Progression of myelodysplastic syndrome: allelic loss on chromosomal arm 1p. *British journal of haematology*, 122(2): 226-230.
- Moroy, T. and C. Khandanpour 2011. Growth factor independence 1 (Gfi1) as a regulator of lymphocyte development and activation. *Seminars in immunology*, 23(5): 368-378.
- Morrison, S. J. and I. L. Weissman 1994. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity*, 1(8): 661-673.
- Nolan, T., R. E. Hands and S. A. Bustin 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature protocols*, 1(3): 1559-1582.
- Peart, M. J., G. K. Smyth, R. K. van Laar, D. D. Bowtell, V. M. Richon, P. A. Marks, A. J. Holloway and R. W. Johnstone 2005. Identification and functional significance of genes regulated by



- structurally different histone deacetylase inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(10): 3697-3702.
- Person, R. E., F. Q. Li, Z. Duan, K. F. Benson, J. Wechsler, H. A. Papadaki, G. Eliopoulos, C. Kaufman, S. J. Bertolone, B. Nakamoto, T. Papayannopoulou, H. L. Grimes and M. Horwitz 2003. Mutations in proto-oncogene GFI1 cause human neutropenia and target ELA2. *Nature genetics*, 34(3): 308-312.
- Pession, A., V. Martino, R. Tonelli, C. Beltramini, F. Locatelli, G. Biserni, M. Franzoni, F. Freccero, L. Montemurro, L. Pattacini and G. Paolucci 2003. MLL-AF9 oncogene expression affects cell growth but not terminal differentiation and is downregulated during monocyte-macrophage maturation in AML-M5 THP-1 cells. *Oncogene*, 22(54): 8671-8676.
- Piaton, E., M. Fabre, I. Goubin-Versini, M. F. Bretz-Grenier, M. Courtade-Saidi, S. Vincent, G. Belleannee, F. Thivolet, J. Boutonnat, H. Debaque, J. Fleury-Feith, P. Vielh, C. Egele, J. P. Bellocq, J. F. Michiels and B. Cochand-Priollet 2016. Guidelines for May-Grunwald-Giemsa staining in haematology and non-gynaecological cytopathology: recommendations of the French Society of Clinical Cytology (SFCC) and of the French Association for Quality Assurance in Anatomic and Cytologic Pathology (AFAQAP). *Cytopathology : official journal of the British Society for Clinical Cytology*.
- Pronk, C. J., D. J. Rossi, R. Mansson, J. L. Attema, G. L. Norddahl, C. K. Chan, M. Sigvardsson, I. L. Weissman and D. Bryder 2007. Elucidation of the phenotypic, functional, and molecular topography of a myeloerythroid progenitor cell hierarchy. *Cell stem cell*, 1(4): 428-442.
- Richon, V. M., T. W. Sandhoff, R. A. Rifkind and P. A. Marks 2000. Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(18): 10014-10019.
- Ries, L., D. Harkins, M. Krapcho, A. Mariotto, B. Miller and E. Feuer 1975. Retrieved January 24, 2007. SEER cancer statistics review, 2003: 2006.
- Rodel, B., K. Tavassoli, H. Karsunky, T. Schmidt, M. Bachmann, F. Schaper, P. Heinrich, K. Shuai, H. P. Elsasser and T. Moroy 2000. The zinc finger protein Gfi-1 can enhance STAT3 signaling by interacting with the STAT3 inhibitor PIAS3. *The EMBO journal*, 19(21): 5845-5855.
- Rosenbauer, F., K. Wagner, J. L. Kutok, H. Iwasaki, M. M. Le Beau, Y. Okuno, K. Akashi, S. Fiering and D. G. Tenen 2004. Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1. *Nature genetics*, 36(6): 624-630.
- Roudaia, L., M. D. Cheney, E. Manuylova, W. Chen, M. Morrow, S. Park, C. T. Lee, P. Kaur, O. Williams, J. H. Bushweller and N. A. Speck 2009. CBFbeta is critical for AML1-ETO and TEL-AML1 activity. *Blood*, 113(13): 3070-3079.
- Roumier, C. and M. H. Cheok 2009. Pharmacogenomics in acute myeloid leukemia. *Pharmacogenomics*, 10(11): 1839-1851.
- Rubnitz, J. E., B. Gibson and F. O. Smith 2010. Acute myeloid leukemia. *Hematology/oncology clinics of North America*, 24(1): 35-63.
- Saleque, S., J. Kim, H. M. Rooke and S. H. Orkin 2007. Epigenetic regulation of hematopoietic differentiation by Gfi-1 and Gfi-1b is mediated by the cofactors CoREST and LSD1. *Molecular cell*, 27(4): 562-572.
- Salipante, S. J., M. E. Rojas, B. Korkmaz, Z. Duan, J. Wechsler, K. F. Benson, R. E. Person, H. L. Grimes and M. S. Horwitz 2009. Contributions to neutropenia from PFAAP5 (N4BP2L2), a novel protein mediating transcriptional repressor cooperation between Gfi1 and neutrophil elastase. *Molecular and cellular biology*, 29(16): 4394-4405.
- Schanz, J., H. Tuchler, F. Sole, M. Mallo, E. Luno, J. Cervera, I. Granada, B. Hildebrandt, M. L. Slovak, K. Ohyashiki, C. Steidl, C. Fonatsch, M. Pfeilstocker, T. Nosslinger, P. Valent, A. Giagounidis, C. Aul, M. Lubbert, R. Stauder, O. Krieger, G. Garcia-Manero, S. Faderl, S. Pierce, M. M. Le Beau, J. M. Bennett, P. Greenberg, U. Germing and D. Haase 2012. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30(8): 820-829.

- Scheijen, B., J. Jonkers, D. Acton and A. Berns 1997. Characterization of pal-1, a common proviral insertion site in murine leukemia virus-induced lymphomas of c-myc and Pim-1 transgenic mice. *Journal of virology*, 71(1): 9-16.
- Schmidt, T., M. Zornig, R. Beneke and T. Moroy 1996. MoMuLV proviral integrations identified by Sup-F selection in tumors from infected myc/pim bitransgenic mice correlate with activation of the gfi-1 gene. *Nucleic acids research*, 24(13): 2528-2534.
- Schnittger, S., T. M. Kohl, T. Haferlach, W. Kern, W. Hiddemann, K. Spiekermann and C. Schoch 2006. KIT-D816 mutations in AML1-ETO-positive AML are associated with impaired event-free and overall survival. *Blood*, 107(5): 1791-1799.
- Seita, J. and I. L. Weissman 2010. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine*, 2(6): 640-653.
- Sharma, S., T. K. Kelly and P. A. Jones 2010. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, 31(1): 27-36.
- Shi, Y. 2007. Histone lysine demethylases: emerging roles in development, physiology and disease. *Nature reviews. Genetics*, 8(11): 829-833.
- Shivdasani, R. and S. Orkin 1996. The transcriptional control of hematopoiesis [see comments]. *Blood*, 87(10): 4025-4039. Available from <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/87/10/4025.full.pdf>.
- Shroyer, N. F., D. Wallis, K. J. Venken, H. J. Bellen and H. Y. Zoghbi 2005. Gfi1 functions downstream of Math1 to control intestinal secretory cell subtype allocation and differentiation. *Genes & development*, 19(20): 2412-2417.
- Silva, G., B. A. Cardoso, H. Belo and A. M. Almeida 2013. Vorinostat induces apoptosis and differentiation in myeloid malignancies: genetic and molecular mechanisms. *PloS one*, 8(1): e53766.
- Smith, J. N. and L. M. Calvi 2013. Concise review: Current concepts in bone marrow microenvironmental regulation of hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 31(6): 1044-1050.
- Smith, M., M. Barnett, R. Bassan, G. Gatta, C. Tondini and W. Kern 2004. Adult acute myeloid leukaemia. *Critical reviews in oncology/hematology*, 50(3): 197-222.
- Song, J., J. H. Noh, J. H. Lee, J. W. Eun, Y. M. Ahn, S. Y. Kim, S. H. Lee, W. S. Park, N. J. Yoo, J. Y. Lee and S. W. Nam 2005. Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 113(4): 264-268.
- Spangrude, G. J. 1989. Enrichment of murine haemopoietic stem cells: diverging roads. *Immunology today*, 10(10): 344-350.
- Spooner, C. J., J. X. Cheng, E. Pujadas, P. Laslo and H. Singh 2009. A recurrent network involving the transcription factors PU.1 and Gfi1 orchestrates innate and adaptive immune cell fates. *Immunity*, 31(4): 576-586.
- Steidl, U., C. Steidl, A. Ebralidze, B. Chapuy, H. J. Han, B. Will, F. Rosenbauer, A. Becker, K. Wagner, S. Koschmieder, S. Kobayashi, D. B. Costa, T. Schulz, K. B. O'Brien, R. G. Verhaak, R. Delwel, D. Haase, L. Trumper, J. Krauter, T. Kohwi-Shigematsu, F. Griesinger and D. G. Tenen 2007. A distal single nucleotide polymorphism alters long-range regulation of the PU.1 gene in acute myeloid leukemia. *The Journal of clinical investigation*, 117(9): 2611-2620.
- Suda, T., K. Takubo and G. L. Semenza 2011. Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell stem cell*, 9(4): 298-310.
- Sun, X. J., Z. Wang, L. Wang, Y. Jiang, N. Kost, T. D. Soong, W. Y. Chen, Z. Tang, T. Nakadai, O. Elemento, W. Fischle, A. Melnick, D. J. Patel, S. D. Nimer and R. G. Roeder 2013. A stable transcription factor complex nucleated by oligomeric AML1-ETO controls leukaemogenesis. *Nature*, 500(7460): 93-97.
- Takai, D. and P. A. Jones 2002. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(6): 3740-3745.

- Thorsteinsdottir, U., A. Mamo, E. Kroon, L. Jerome, J. Bijl, H. J. Lawrence, K. Humphries and G. Sauvageau 2002. Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cell expansion. *Blood*, 99(1): 121-129.
- Trumpp, A., M. Essers and A. Wilson 2010. Awakening dormant haematopoietic stem cells. *Nature reviews. Immunology*, 10(3): 201-209.
- Valk, P. J., D. T. Bowen, M. E. Frew, A. C. Goodeve, B. Lowenberg and J. T. Reilly 2004. Second hit mutations in the RTK/RAS signaling pathway in acute myeloid leukemia with inv(16). *Haematologica*, 89(1): 106.
- Valk, P. J., R. G. Verhaak, M. A. Beijnen, C. A. Erpelinck, S. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, J. M. Boer, H. B. Beverloo, M. J. Moorhouse, P. J. van der Spek, B. Lowenberg and R. Delwel 2004. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*, 350(16): 1617-1628.
- van der Meer, L. T., J. H. Jansen and B. A. van der Reijden 2010. Gfi1 and Gfi1b: key regulators of hematopoiesis. *Leukemia*, 24(11): 1834-1843.
- van Riel, B. and F. Rosenbauer 2014. Epigenetic control of hematopoiesis: the PU.1 chromatin connection. *Biological chemistry*, 395(11): 1265-1274.
- Verhaak, R. G., B. J. Wouters, C. A. Erpelinck, S. Abbas, H. B. Beverloo, S. Lugthart, B. Lowenberg, R. Delwel and P. J. Valk 2009. Prediction of molecular subtypes in acute myeloid leukemia based on gene expression profiling. *Haematologica*, 94(1): 131-134.
- Wang, X., Y. Zhang, X. Zhang, W. Tian, W. Feng and T. Chen 2012. The curcumin analogue hydrazinocurcumin exhibits potent suppressive activity on carcinogenicity of breast cancer cells via STAT3 inhibition. *International journal of oncology*, 40(4): 1189-1195.
- Watt, F. and P. L. Molloy 1988. Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes & development*, 2(9): 1136-1143.
- Welinder, E. and C. Murre 2011. Ldb1, a new guardian of hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Immunol*, 12(2): 113-114. Available from <http://dx.doi.org/10.1038/ni0211-113>.
- Wichmann, C., Y. Becker, L. Chen-Wichmann, V. Vogel, A. Vojtkova, J. Herglotz, S. Moore, J. Koch, J. Lausen, W. Mantele, H. Gohlke and M. Grez 2010. Dimer-tetramer transition controls RUNX1/ETO leukemogenic activity. *Blood*, 116(4): 603-613.
- Wilson, A., E. Laurenti and A. Trumpp 2009. Balancing dormant and self-renewing hematopoietic stem cells. *Current opinion in genetics & development*, 19(5): 461-468.
- Wilson, A. and A. Trumpp 2006. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nature reviews. Immunology*, 6(2): 93-106.
- Wu, M., S. H. Kim, I. Datta, A. Levin, G. Dyson, J. Li, S. Kaypee, M. M. Swamy, N. Gupta, H. J. Kwon, M. Menon, T. K. Kundu and G. P. Reddy 2015. Hydrazinobenzoylcurcumin inhibits androgen receptor activity and growth of castration-resistant prostate cancer in mice. *Oncotarget*, 6(8): 6136-6150.
- Wyllie, A. H., J. F. Kerr and A. R. Currie 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *International review of cytology*, 68: 251-306.
- Yan, M., E. Y. Ahn, S. W. Hiebert and D. E. Zhang 2009. RUNX1/AML1 DNA-binding domain and ETO/MTG8 NHR2-dimerization domain are critical to AML1-ETO9a leukemogenesis. *Blood*, 113(4): 883-886.
- Yan, M., E. Kanbe, L. F. Peterson, A. Boyapati, Y. Miao, Y. Wang, I. M. Chen, Z. Chen, J. D. Rowley, C. L. Willman and D. E. Zhang 2006. A previously unidentified alternatively spliced isoform of t(8;21) transcript promotes leukemogenesis. *Nature medicine*, 12(8): 945-949.
- Yang, X. J. 2004. The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases. *Nucleic acids research*, 32(3): 959-976.
- Ye, M., H. Zhang, H. Yang, R. Koche, P. B. Staber, M. Cusan, E. Levantini, R. S. Welner, C. S. Bach, J. Zhang, A. V. Krivtsov, S. A. Armstrong and D. G. Tenen 2015. Hematopoietic Differentiation Is Required for Initiation of Acute Myeloid Leukemia. *Cell stem cell*, 17(5): 611-623.
- Yokota, S., H. Kiyoi, M. Nakao, T. Iwai, S. Misawa, T. Okuda, Y. Sonoda, T. Abe, K. Kahsima, Y. Matsuo and T. Naoe 1997. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in

- acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines. *Leukemia*, 11(10): 1605-1609.
- Yucel, R., C. Kosan, F. Heyd and T. Moroy 2004. Gfi1:green fluorescent protein knock-in mutant reveals differential expression and autoregulation of the growth factor independence 1 (Gfi1) gene during lymphocyte development. *The Journal of biological chemistry*, 279(39): 40906-40917.
- Zarebski, A., C. S. Velu, A. M. Baktula, T. Bourdeau, S. R. Horman, S. Basu, S. J. Bertolone, M. Horwitz, D. A. Hildeman, J. O. Trent and H. L. Grimes 2008. Mutations in growth factor independent-1 associated with human neutropenia block murine granulopoiesis through colony stimulating factor-1. *Immunity*, 28(3): 370-380.
- Zeng, H., R. Yucel, C. Kosan, L. Klein-Hitpass and T. Moroy 2004. Transcription factor Gfi1 regulates self-renewal and engraftment of hematopoietic stem cells. *The EMBO journal*, 23(20): 4116-4125.
- Zhao, J. A., L. Peng, C. Z. Geng, Y. P. Liu, X. Wang, H. C. Yang and S. J. Wang 2014. Preventive effect of hydrazinocurcumin on carcinogenesis of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinoma in male SD rats. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 15(5): 2115-2121.
- Zhu, J., D. Jankovic, A. Grinberg, L. Guo and W. E. Paul 2006. Gfi-1 plays an important role in IL-2-mediated Th2 cell expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(48): 18214-18219.
- Zornig, M., T. Schmidt, H. Karsunky, A. Grzeschiczek and T. Moroy 1996. Zinc finger protein GFI-1 cooperates with myc and pim-1 in T-cell lymphomagenesis by reducing the requirements for IL-2. *Oncogene*, 12(8): 1789-1801.
- Zweidler-Mckay, P. A., H. L. Grimes, M. M. Flubacher and P. N. Tsichlis 1996. Gfi-1 encodes a nuclear zinc finger protein that binds DNA and functions as a transcriptional repressor. *Molecular and cellular biology*, 16(8): 4024-4034.

### 13 Danksagung

An dieser Stelle danke ich Herrn Dr. Cyrus Khandanpour für die Bereitstellung des interessanten Themas, die Betreuung und dafür, dass ich meine Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen konnte. Dieser Dank gilt natürlich auch Herrn Prof. Dr. Ulrich Dührsen. Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bertram Opalka bedanken, der jederzeit ein offenes Ohr für mich hatte und mir mit Rat und Tat zur Seite stand. Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des hämatologischen Forschungslabors für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die freundliche Aufnahme. Besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Lacramioara Botezatu für die Unterstützung bei der experimentellen Arbeit und ihrer Freundschaft bedanken. Ein ganz herzlicher Dank gilt auch Frau Renata Köster und Frau Aniththa Thivakaran für ihre Unterstützung, ihre Hilfsbereitschaft und für ihre Freundschaft. Ich danke Frau Dr. Judith Schütte für ihren stetigen Optimismus und die fachlichen Diskussionen. Ich danke auch Herrn Yahya Al-Matary für seine Hilfe.

Ich danke meiner Masterstudentin Frau Sophia Hergenhan für die Unterstützung, die aufbauenden Worte und ihre Freundschaft. Ein herzlicher Dank gilt auch Lars Michel für die fachlichen Diskussionen und den Spaß.

Ich möchte mich auch bei Frau Stefanie Weber, Herrn Michael Möllman, Frau Dr. Anita Hollenbeck und Herrn Benedikt Pelzer für ihre Ratschläge, Hilfe und netten Gespräche bedanken.

Ich danke Klaus Lennartz und Herrn Dr. Andre Görgens für die durchflusszytometrische Sortierung meiner Zellen.

Folglich gilt mein Dank auch allen Mitarbeitern des ZTL für die schöne und unkomplizierte Zusammenarbeit.

Natürlich danke ich meinen Eltern dafür, dass sie immer für mich da waren und für den Rückhalt. Ein besonderer Dank gilt Sebastian Hönes, dem besten Bruder der Welt, für anregende Diskussionen, fachliche Unterstützung und seine aufbauenden Worte.

Ein herzlicher Dank gilt auch meinem Freund Martin, der gerade auf der Zielgeraden für mich da war und mich immer unterstützt hat.

## **14 Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

## 15 Eigene Publikationen aus dieser Arbeit

### 15.1 Publiziert:

#### **GFI1 as a novel prognostic and therapeutic factor for AML/MDS**

J.M. Hönes<sup>†</sup>, L. Botezatu<sup>†</sup>, A. Helness, C. Vadnais, L.Vassen, F. Robert, S.M. Hergenhan, A.Thivakaran, J. Schütte, Y. S. Al-Matary, R. F. Lams, J. Fraszczak, H. Makishima, T. Radivoyevitch, B. Przychodzen, S. Vitoriano da Conceição Castro, A. Görgens, B. Giebel, L. Klein-Hitpass, K. Lennartz, M. Heuser, C. Thiede, G. Ehninger, U. Dührsen, JP. Maciejewski, T. Möröy, C. Khandanpour

Leukemia 2016; April 8

<sup>†</sup> geteilte Erstautorschaft

### 15.2 Eingereicht:

#### **GFI1 is a therapeutic target in *AML1-ETO* positive acute myeloid leukemia**

Anna E. Marneth<sup>†</sup>, Lacramioara Botezatu<sup>†</sup>, Judith M. Hönes<sup>†</sup>, Jimmy C.L. Israël, Joost H. Martens, Robert F. Lams, Saskia M. Bergevoet, Laura Groothuis, Amit Mandoli, Gerwin Huls, Joop H. Jansen, Ulrich Dührsen, Bert A. van der Reijden and Cyrus Khandanpour

<sup>†</sup> geteilte Erstautorschaft

eingereicht am 29.04.2016 als *Letter* zu Blood

#### **Enforced GFI1 expression impedes human and murine leukemic cell growth**

Judith M. Hönes<sup>†</sup>, Lacramioara Botezatu<sup>†</sup>, Symone Vitoriano da Conceição Castro, Judith Schütte, Karen B. I. Fischer, Yahya S. Al-Matary, Aniththa Thivakaran, Lothar Vassen, André Görgens, Ulrich Dührsen, Bernd Giebel, and Cyrus Khandanpour

<sup>†</sup> geteilte Erstautorschaft

eingereicht am 20.05.2016 bei Scientific Reports

## **16 Erklärungen**

### **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, gem. §6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema "Die Rolle verschiedener GF11-Expressionslevel in der Progression von MDS und AML" zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und ich den Antrag von Judith Hönes befürworte.

Essen, den \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Bertram Opalka

### **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als hier angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den \_\_\_\_\_

Judith Hönes

### **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den \_\_\_\_\_

Judith Hönes