

Die Rolle von GFI1 in der Genomstabilität

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für

Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Daria Frank

aus Oberkirch

Dezember 2020

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden in der Klinik für Hämatologie am Universitätsklinikum Essen sowie in der Medizinischen Klinik A am Universitätsklinikum Münster durchgeführt.

1. Gutachter: PD Dr. Cyrus Khandanpour
2. Gutachter: Prof. Dr. Matthias Gunzer

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Dominik Boos

Tag der mündlichen Prüfung: 06.04.2021

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/74284

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20231031-094141-6

Alle Rechte vorbehalten.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	7
Abbildungsverzeichnis.....	11
Tabellenverzeichnis.....	16
1 Einleitung.....	17
1.1 Hämatopoese.....	17
1.2 Myelodysplastisches Syndrom und akute myeloische Leukämie	18
1.3 Growth Factor Independence 1	22
1.3.1 Struktur und Funktion von GFI1	22
1.3.2 Die Rolle von GFI1 in der AML	25
1.4 DNA-Reparatur.....	28
1.4.1 DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur.....	28
1.4.1.1 Homologe Rekombination	29
1.4.1.2 Nicht homologes End-Joining.....	30
1.4.2 DNA-Einzelstrang-Reparatur	31
1.4.2.1 Basenexzisionsreparatur.....	31
1.4.3 Reparatur von O ⁶ -Methylguanin.....	33
1.4.4 DNA-Reparatur-Medikamente.....	34
1.4.4.1 Temozolomid.....	34
1.4.4.2 PARP-Inhibitor -Olaparib-.....	37
2 Zielsetzung der Arbeit	39
3 Material und Methoden	41
3.1 Material	41
3.1.1 Verbrauchsmaterial.....	41
3.1.2 Chemikalien und Reagenzien	43
3.1.3 Puffer und Medien.....	46
3.1.4 Kits.....	48
3.1.5 Antikörper	48
3.1.6 Primer	49
3.1.7 Geräte.....	50
3.1.8 Software.....	52
3.2 Methoden	53
3.2.1 Mäuse	53
3.2.1.1 Mausstämme.....	53

3.2.1.1.1	hGFI1-36S- und hGFI1-36N-KI-Mausstamm	53
3.2.1.1.2	hGFI1-KD-Mausstamm	53
3.2.1.1.3	NUP98-HOXD13-Mausstämme	54
3.2.1.2	Haltung der Mäuse	54
3.2.1.3	Genotypisierung der Mäuse	54
3.2.1.4	Bestrahlung der Mäuse	55
3.2.1.5	Primäre Transplantation	55
3.2.1.6	Sekundäre oder nachfolgende Transplantationsrunden	57
3.2.1.7	Serielle Transplantation	58
3.2.1.8	Analyse leukämischer Mäuse	58
3.2.1.8.1	Isolation von Knochenmarkzellen, Thymozyten und Milzzellen	58
3.2.1.8.2	Blutentnahme und Erstellung eines Blutbildes	59
3.2.1.8.3	Charakterisierung der Oberflächenmarker von Knochenmark-, Milz- und peripheren Blutzellen mittels Durchflusszytometrie	59
3.2.1.8.4	Cytospin-Präparation von Knochenmarkzellen	60
3.2.1.9	Einfrieren und Auftauen von Zellen	61
3.2.1.10	Isolation von Lineage ⁻ -Zellen	61
3.2.1.11	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von Knochenmarkzellen	62
3.2.1.12	Vergleichende genomische Hybridisierung (Array-CGH)	62
3.2.2	Zellzahlbestimmung	62
3.2.2.1	Automatische Zellzahlbestimmung	62
3.2.2.2	Manuelle lebend/tot Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau und Neubauerkammer	63
3.2.3	Klonierung von DNA-Fragmenten	63
3.2.3.1	Transformation kompetenter Bakterien	63
3.2.3.2	Herstellen von Einzelkolonien auf Selektivnährboden und Herstellen einer Schüttelkultur	63
3.2.3.3	Isolierung von Plasmid-DNA	64
3.2.4	Virus-Produktion und Bestimmung der Virustiter (Retrovirus)	65
3.2.5	Retrovirale Transduktion von Lin ⁻ -Zellen	66
3.2.6	FACS-Sortierung von transduzierten primären Mauszellen	66
3.2.7	RNA-Methoden	67
3.2.7.1	RNA-Isolation und Konzentrationsbestimmung	67
3.2.7.2	RNA-Sequenzierung	67
3.2.8	DNA-Methoden	67

3.2.8.1	DNA-Isolation und Konzentrationsbestimmung	67
3.2.8.2	cDNA-Synthese	68
3.2.8.3	RT-PCR	68
3.2.8.4	Bisulfit-PCR	69
3.2.8.5	Genotypisierung humaner Proben	70
3.2.9	Protein-Methoden	71
3.2.9.1	Protein-Isolation und Konzentrationsbestimmung	71
3.2.9.2	Herstellung von SDS-Gelen für Western Blot-Analysen	72
3.2.9.3	Western Blot	73
3.2.9.4	Co-Immunpräzipitation	73
3.2.9.5	Proteomik	74
3.2.10	DNA-Reparatur Methoden	74
3.2.10.1	Bestrahlung von Zellen	74
3.2.10.2	γ H2AX-Assay (Immunfluoreszenz)	74
3.2.10.3	Comet-Assay	75
3.2.10.4	RT ² Profiler Array	76
3.2.10.5	Funktioneller MGMT-Assay (Immunfluoreszenz)	77
3.2.10.6	Homologer-Rekombinations-Assay	78
3.2.11	Überprüfung von Therapieoptionen (Medikamentenstudien)	78
3.2.11.1	Methylcellulose-Assay (CFU-Assay) für murine Zellen	79
3.2.11.2	Methylcellulose-Assay (CFU-Assay) für humane Zellen	79
3.2.11.3	Apoptose-Assay	79
3.2.11.4	MTT-Assay (Zellproliferation)	80
3.2.12	Bioinformatische und Statistische Analysen	81
4	Ergebnisse	82
4.1	<i>GFI1</i> -KD- und <i>GFI1-36N</i> -leukämische Zellen sind anfälliger gegenüber genetischen Veränderungen	82
4.1.1	MDS/AML-Patienten mit <i>GFI1-36N</i> -Genotyp haben mehr zytogenetische Aberrationen	82
4.1.2	Murine leukämische Zellen mit geringem <i>GFI1</i> -Level oder mit <i>GFI1-36N</i> -Genotyp zeigen mehr genetische Veränderungen und Veränderungen bei der Expression von DNA-Reparaturgenen	85
4.2	Geringe <i>GFI1</i> -Level und die <i>GFI1-36N</i> -Variante beeinflussen die DNA-Reparatur und erhöhen den DNA-Schaden	102
4.2.1	<i>GFI1</i> -KD- und <i>GFI1-36N</i> -Zellen haben einen höheren DNA-Schaden	102

4.2.2	<i>GF11</i> -KD- sowie <i>GF11-36N</i> -leukämische Zellen haben niedrigere Mgmt-Level	115
4.3	<i>GF11-36N</i> -leukämische Zellen sind empfindlicher gegenüber DNA-Reparatur Medikamenten.....	135
4.3.1	Murine <i>GF11-36N</i> -leukämische Zellen reagieren sensitiver auf die Behandlung mit Temozolomid und in Kombination mit Olaparib.....	136
4.3.2	Humane <i>GF11-36N</i> -leukämische Zellen zeigen <i>in vitro</i> einen höheren Effekt gegenüber Temozolomid und in Kombination mit Olaparib	151
5	Diskussion	153
5.1	Vermehrte genetische Veränderungen durch hohen DNA-Schaden und verringerte DNA-Reparatur in <i>GF11-36N</i> -leukämischen Zellen	153
5.2	Veränderte DNA-Reparatur in <i>GF11-36N</i> - und <i>GF11</i> -KD-leukämischen Zellen	159
5.3	Niedrigeres Mgmt-Level und damit einhergehende verminderte Mgmt-vermittelte Reparatur in <i>GF11-36N</i> -leukämischen Zellen.....	161
5.4	Die veränderte DNA-Reparatur in den <i>GF11-36N</i> -leukämischen Zellen erhöht die Sensitivität gegenüber Temozolomid und Olaparib	167
5.5	Ausblick.....	172
6	Zusammenfassung	176
7	Summary	177
8	Literaturverzeichnis	178
9	Danksagung	197
10	Veröffentlichungen	199
11	Lebenslauf	200
12	Eidesstattliche Erklärungen	203

Abkürzungsverzeichnis

53BP1	-	engl.: <i>Tumor Protein P53 Binding Protein 1</i>
8-OxoG	-	8-Oxoguanin
AF9	-	auch: MLLT3; engl.: <i>mixed-lineage leukemia gene translocated to 3</i>
AFU	-	engl.: <i>arbitrary fluorescence units</i>
ALL	-	akute lymphatische Leukämie
alt-NHEJ	-	alternatives-nicht homologes End-Joining
AML	-	akute myeloische Leukämie
AML1	-	<i>Acute myleoid leukemia 1</i> , auch RUNX1
AML1-ETO	-	Fusionsprotein aus AML1 und ETO
APC	-	Allophycocyanin
APE1/APEX1	-	AP-Endonuklease1
APS	-	Ammoniumperoxodisulfat
ATM	-	Ataxia-telangiectasia mutated kinase
ATR	-	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3 related kinase</i>
BER	-	Basenexzisionsreparatur
BRCA1, 2	-	Brustkrebsgen 1,2; engl.: <i>Breast Cancer 1, 2</i>
BSA	-	Bovines Serumalbumin
CD	-	Oberflächenmarker; engl.: <i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	-	komplementäre DNA
CFU	-	Koloniebildende Einheit; engl.: <i>Colony forming unit</i>
CGH	-	vergleichende genomische Hybridisierung; engl.: <i>comparative genomic hybridization</i>
ChIP	-	Chromatin-Immunpräzipitation
CLP	-	gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle; engl.: <i>common lymphoid progenitor</i>
CMP	-	gemeinsame myeloide Vorläuferzelle; engl.: <i>common myeloid progenitor</i>
Co-IP	-	Co-Immunpräzipitation
Ct	-	Schwellenwert-Zyklus; engl.: <i>Cycle Threshold</i>
CtIP	-	engl.: <i>CtBP (C-terminal binding protein) interacting protein</i>
CTK7a	-	Histon-Acetyltransferase-Inhibitor VII
Cul4b	-	Cullin-4B
DAPI	-	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEG	-	differentiell exprimierte Gene
Del	-	Deletion
DMEM	-	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	-	Dimethylsulfoxid
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i>
Dna2	-	engl.: <i>DNA Replication Helicase/Nuclease 2</i>
DNA-PK	-	DNA-Proteinkinase
DSB	-	Doppelstrangbruch
EDTA	-	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	-	Epithelial-mesenchymale Transition
ETO	-	eight twenty one
ETP	-	frühe T-Zell Vorläuferzellen; engl.: <i>Early T-cell precursor</i>

FAB-System	-	French-American-British-System
FACS	-	engl.: <i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FBS	-	Fetales Kälberserum; engl.: <i>fetal bovine serum</i>
FDA	-	Behörde für Lebens- und Arzneimittel
FDR	-	Falscherkennungsrate; engl.: <i>false discovery rate</i>
FEN1	-	Flap-Endonuklease 1
FISH	-	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
Flt3	-	Fms-like tyrosine kinase 3
FRET	-	Förster-Resonanzenergietransfer
FSC	-	Vorwärtsstreulicht; engl.: <i>forward scatter</i>
G-CSF	-	Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor
GDC	-	Genomische DNA-Kontrolle
Gen1	-	engl.: <i>Flap endonuclease GEN homolog 1</i>
GF11	-	Growth Factor Independence 1 (human)
Gfi1	-	Growth Factor Independence 1 (murin)
GFP	-	grün fluoreszierendes Protein
GMP	-	Granulozyten-Makrophagen-Vorläuferzellen
GSEA	-	engl.: <i>gene set enrichment analysis</i>
Gy	-	Gray
H2AX	-	Histon H2AX
H3K4	-	Histon 3 Lysin 4
H3K9	-	Histon 3 Lysin 9
HGB	-	Hämoglobin
HIF1	-	Hypoxie-induzierter Faktor 1
Hox	-	Homeobox
HOXD13	-	Homeobox D13
Hprt	-	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HR	-	Homologe Rekombination
HSC	-	hämatopoetischen Stammzellen
IC ₅₀	-	mittlere inhibitorische Konzentration
IDH1/2	-	Isocitrat-Dehydrogenasen
IgG	-	Immunglobulin G
IL-3,-6	-	Interleukin-1, -6
IMDM	-	Iscove's Modified Dulbecco's Media
Ins	-	Insertion
IP	-	Immunpräzipitation
IVC	-	individuell ventilierte Käfige
KD	-	Knock-down
kDa	-	Kilodalton
KF	-	Kammerfaktor
KI	-	Knock-in
KM	-	Knochenmark
KMT2A	-	Lysin Methyltransferase 2A
KO	-	Knock-out
KRAS	-	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
Ku	-	Ku70/Ku80-Komplex
LIC	-	Leukämie-initiierende Zellen
LIG1,3, 4	-	DNA-Ligase 1, 3, 4
Lin ⁻ , ⁺	-	Lineage ⁻ , ⁺
LMPP	-	lymphatisch geprägten multipotenten Vorläuferzellen; engl.: <i>lymphoid primed multipotent progenitor</i>

LSD1	-	Lysin-spezifische-Histon-Demethylase-1
MACS	-	Magnetische Zellseparation
MDC-1	-	Mediator of DNA damage checkpoint protein 1
MDS	-	Myelodysplastisches Syndrom
Meis1	-	Meis Homeobox 1
MEP	-	Megakaryozyten-Erythrozyten-Vorläuferzelle
MGMT	-	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
Mid1	-	Midline 1
MLL	-	mixed lineage leukemia
MLL-AF9	-	Fusionsprotein aus MLL und AF9
MMR	-	Mismatch-Reparatur
MPP	-	multipotenten Vorläuferzellen
MRE11	-	<i>meiotic recombination 11 homolog A</i>
MRN	-	MRE11-RAD50-NBS1-Komplex
MSCV	-	Maus-Stammzell-Virus; engl.: <i>murine stem cell virus</i>
MSigDB	-	engl.: <i>Molecular Signatures Database</i>
MTT	-	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazoliumbromid
N3-MeA	-	N3-methyl-Adenin
N7-MeG	-	N7-methyl-Guanin
NBS1	-	Nijmegen-Breakage-Syndrom 1
Ndrp1	-	engl.: <i>N-Myc Downstream Regulated 1</i>
NER	-	Nukleotidexzisionsreparatur
NES	-	normalisierter Anreicherungs Wert engl.: <i>normalized enrichment score</i>
NHEJ	-	nicht homologes End-Joining; engl.: <i>Non-homologous end-joining</i>
Nhej1	-	engl.: <i>Non-Homologous End Joining Factor 1</i>
NK-Zellen	-	natürliche Killerzellen
NoIR	-	keine Bestrahlung engl.: <i>no irradiation</i>
NSG-Mäuse	-	NOD.Cg- <i>Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}</i> -Mäuse
NTHL1	-	<i>Nth Like DNA Glycosylase 1</i>
NUP98	-	Nucleoporin 98
NUP98-HOXD13	-	Fusionsprotein aus Nup98 und HOXD13
O6-BG	-	O6-Benzylguanin
O6BTG	-	O6-(4-Bromothienyl)guanin
O6-MeG	-	O6-Methylguanin
OGG1	-	8-Oxoguanine glycosylase
P/S	-	Penicillin/Streptomycin
PAR	-	Poly (ADP-Ribose)
PARP1, 2	-	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1, 2
PARPi	-	PARP-Inhibitor
PB	-	peripheres Blut
PBS	-	phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	-	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen
PCR	-	Polymerase-Kettenreaktion
PdVF	-	Polyvinylidenfluorid
PDX-Modelle	-	engl.: <i>Patient derived xenografts</i> -Modelle
PE	-	Phycoerythrin
PEI	-	Polyethylenimin
PerCP	-	Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex
PI	-	Propidiumiodid

PLT	-	Thrombozyten/Blutplättchen
PMSF	-	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNKP	-	engl.: <i>Polynucleotide Kinase 3'-Phosphatase</i>
POL	-	Polymerase
Pold2	-	engl.: <i>DNA Polymerase Delta 2, Accessory Subunit</i>
PPC	-	Positive PCR-Kontrolle
Ppm1h	-	engl.: <i>Protein Phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺ Dependent 1H</i>
PRMT1	-	Protein Arginin N-Methyltransferase 1
PS	-	Phosphatidylserin
PTEN	-	engl.: <i>phosphatase and tensin homologue</i>
RAD50	-	engl.: <i>RAD50 Double Strand Break Repair Protein</i>
RAD51	-	RAD51 Rekombinase
RNA	-	Ribonukleinsäure
ROS	-	Reaktive Sauerstoffspezies
RPA	-	Replikationsprotein A
rpm	-	Umdrehungen pro Minute; engl.: <i>rounds per minute</i>
RT	-	Raumtemperatur
RTC	-	Reverse-Transkriptions-Kontrolle
RTEL1	-	Regulator Of Telomere Elongation Helicase 1
RT-PCR	-	quantitative Echtzeit-PCR; engl.: <i>real-time PCR</i>
RUNX1	-	Runt-related transcription factor 1
SCF	-	Stammzellfaktor; engl.: <i>stem cell factor</i>
SCM	-	Stammzellmedium
SD	-	Standardabweichung; engl.: <i>standard deviation</i>
SDS	-	Natriumdodecylsulfat
SEM	-	Standardfehler des Mittelwerts; engl.: <i>standard error of the mean</i>
SNAG-Domäne	-	SNAIL/Gfi-1-Domäne
SNP	-	Einzelnukleotid-Polymorphismus; engl.: <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SPF	-	spezifisch pathogenfrei
SPL	-	Milz, engl.: <i>spleen</i>
SSB	-	Einzelstrangbruch; engl.: <i>single strand break</i>
SSC	-	Seitwärtsstreulicht; engl.: <i>side scatter</i>
Sumo1	-	engl.: <i>Small Ubiquitin Like Modifier 1</i>
TEMED	-	Tetramethylethylendiamin
TMZ	-	Temozolomid
TP53	-	tumor protein p53
Ube2b	-	engl.: <i>Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 B</i>
ubMgmt	-	ubiquitiniertes Mgmt (inaktiv)
UNG	-	Uracil-DNA-Glykosidase
VF	-	Verdünnungsfaktor
WB	-	Western Blot
WBC	-	weißen Blutkörperchen
WHO	-	Weltgesundheitsorganisation
WT	-	Wildtyp
XLF	-	XRCC4-like factor
XRCC1, 2, 3, 4	-	X-ray repair cross-complementing protein 1, 2, 3, 4
ZTE	-	Zentrale Tierexperimentelle Einrichtung
ZTL	-	Zentrales Tierlaboratorium
γH2AX	-	phosphorylierte Form von H2AX

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der Hämatopoese	18
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Struktur von Gfi1	23
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Funktion von Gfi1 als Transkriptionsfaktor	24
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Wirkungsmechanismus von Temozolomid	37
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Gfi1-Lokus	54
Abbildung 6: Schematische Darstellung der primären Transplantation	56
Abbildung 7: Schematische Darstellung der sekundären Transplantation.....	57
Abbildung 8: Schematische Darstellung der seriellen Transplantation	58
Abbildung 9: Beispiele der Genotypisierung von Patientenproben mittels RT-PCR .	71
Abbildung 10: MDS/AML-Patienten mit GF11-36S/N-Genotyp hatten eine höhere Anzahl an Chromosomenaberrationen	84
Abbildung 11: Überlebenskurven der transplantierten Gfi1-WT-, GF11-36S-, GF11-36N- und GF11-KD-MLL-AF9-Mäusen.....	85
Abbildung 12: Auszug einer Knochenmark-Analyse der leukämischen und nicht leukämischen Mäuse.....	87
Abbildung 13: Blutanalysen der leukämischen und nicht leukämischen Mäuse	88
Abbildung 14: Mehr morphologische Veränderungen in GF11-36N- und GF11-KD- leukämischen Zellen als in GF11-36S-leukämischen Zellen	89
Abbildung 15: Beispielbilder der Karyotypen von leukämischen Knochenmarkzellen aus den seriell transplantierten MLL-AF9-Mäusen	90
Abbildung 16: Beispiel eines Array-CGH-Ergebnis: Chromosom X qF4-Deletion	91
Abbildung 17: Mehr Variationen in murinen GF11-36N- und GF11-KD-leukämischen Knochenmarkzellen	93
Abbildung 18: Anzahl an Mutationen geordnet nach funktioneller Klasse in nicht leukämischen Zellen.....	94
Abbildung 19: Anzahl an Mutationen geordnet nach funktioneller Klasse in murinen leukämischen Knochenmarkzellen	95
Abbildung 21: Enrichment Plots ausgewählter, angereicherter Gen-Sets in GF11-36N- gegenüber GF11-36S-nicht leukämischen Zellen.....	96
Abbildung 20: Veränderte Gen-Sets zwischen nicht leukämischen GF11-36N- und GF11-36S-Zellen.....	96

Abbildung 22: Veränderte Gen-Sets zwischen leukämischen GF11-36N- und GF11-36S-Zellen.....	97
Abbildung 23: Enrichment Plots ausgewählter, angereicherter Gen-Sets in GF11-36S- gegenüber GF11-36N-leukämischen Zellen.....	97
Abbildung 24: Heatmap der DEG der DNA-Reparatur oder DNA-Schadensantwort in GF11-36N-leukämischen-Zellen im Vergleich zu GF11-36S-leukämischen Zellen	98
Abbildung 25: Veränderte Gen-Sets zwischen murinen GF11-KD- und GF11-36S-leukämischen Zellen.....	99
Abbildung 26: Enrichment Plots ausgewählter, angereicherter Gen-Sets in GF11-36S-leukämischen Zellen gegenüber GF11-KD-leukämischen Zellen.....	100
Abbildung 27: Heatmap der DEG der DNA-Reparatur oder DNA-Schadensantwort zwischen GF11-KD- und GF11-36S-leukämischen Zellen.	101
Abbildung 28: Test γ H2AX-Assay.....	103
Abbildung 29: Schematischer Versuchsablauf des γ H2AX-Assay.....	103
Abbildung 30: Repräsentative Bilder des γ H2AX-Assays mit bestrahlten Thymozyten	104
Abbildung 31: Höherer DNA-Schaden nach Bestrahlung in GF11-36N- und GF11-KD-Thymozyten als in GF11-36S-Thymozyten.....	106
Abbildung 32: Test Comet-Assay	107
Abbildung 33: Schematische Versuchsdurchführung Comet-Assay.....	107
Abbildung 34: Höherer direkter DNA-Schaden nach Bestrahlung in GF11-36N-Thymozyten als in GF11-36S-Thymozyten.....	108
Abbildung 35: Comet Assay der GF11-KD- und Gfi1-WT-Thymozyten	109
Abbildung 36: Schematischer Versuchsaufbau des Homologen-Rekombinations-Assays.....	110
Abbildung 37: Höhere HR-Rate in GF11-36N-nicht leukämischen Zellen gegenüber GF11-36S-nicht leukämischen Zellen.....	111
Abbildung 38: Geringere HR-Rate in GF11-36N-leukämischen Knochenmarkzellen als in GF11-36S-leukämischen und nicht leukämischen Zellen	112
Abbildung 39: Geringere Mgmt-Expression in GF11-36N- und GF11-KD-Zellen gegenüber GF11-36S-Zellen.....	115
Abbildung 40: Geringere Mgmt-Expression in GF11-36N- und GF11-KD-Thymozyten gegenüber GF11-36S-Thymozyten	116
Abbildung 41: Geringeres Mgmt-Proteinlevel in GF11-36N- und GF11-KD-Thymozyten gegenüber GF11-36S-Thymozyten	118

Abbildung 42: Geringere Mgmt-Expression in GF11-36N-leukämischen Zellen gegenüber GF11-36S-leukämischen Zellen	119
Abbildung 43: Kein Unterschied des Mgmt-Proteinlevel in GF11-36S- und GF11-36N-nicht leukämischen Zellen	119
Abbildung 44: Höheres inaktives und geringeres aktives Mgmt-Proteinlevel in GF11-36N- und GF11-KD- im Vergleich zu GF11-36S-leukämischen Knochenmarkzellen	120
Abbildung 45: Veränderte Proteinlevel in GF11-36N-leukämischen Zellen gegenüber GF11-36S-leukämischen Zellen	122
Abbildung 46: Heatmap der signifikant veränderten Proteine in GF11-36N- gegenüber GF11-36S-leukämischen Knochenmarkzellen.....	122
Abbildung 47: Vergleich zwischen differentiell exprimierten Genen und veränderten Proteinlevel.....	123
Abbildung 48: Netzwerkanalyse der signifikant veränderten „Signalwege“ in GF11-36N- gegenüber GF11-36S-leukämischen Zellen auf Genexpressions- und Proteinebene	124
Abbildung 49: Auszug aus drei ChIP-Sequenzierungs-Analysen zu möglichen Gfi1-Bindestellen an regulatorischen Elementen des NdrG1-Gens	125
Abbildung 50: Kein Unterschied in der Mgmt-Promotor-Methylierung zwischen GF11-36S- und GF11-36N-Thymozyten.....	126
Abbildung 51: Kein Unterschied in der Mgmt-Promotor-Methylierung zwischen GF11-36S- und GF11-36N-nicht leukämischen sowie leukämischen Zellen	127
Abbildung 52: Keine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen GF11 und MGMT mittels Co-IP detektierbar	128
Abbildung 53: Keine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen MGMT und GF11 in humanen leukämischen Zellen mittels Co-IP detektierbar.....	129
Abbildung 54: Schematischer Versuchsaufbau des funktionellen MGMT-Assays..	130
Abbildung 55: Kein Unterschied des O6-MeG-Schadens bzw. der Funktionalität von Mgmt in GF11-36N- gegenüber GF11-36S-nicht leukämischen Zellen	131
Abbildung 56: Repräsentative Bilder des funktionellen Mgmt-Assays mit murinen leukämischen Zellen.....	132
Abbildung 57: Mehr O6-MeG-Schäden nach Behandlung mit TMZ in GF11-36N-leukämischen Zellen gegenüber GF11-36S-leukämischen Zellen.....	133
Abbildung 58: Veränderte Gen-Sets in leukämischen GF11-36N-Zellen im Vergleich zu leukämischen GF11-36S-Zellen nach Behandlung mit TMZ	134

Abbildung 59: Enrichment Plots ausgewählter, angereicherter Gen-Sets in GF11-36N-leukämischen Zellen gegenüber GF11-36S-leukämischen Zellen nach Behandlung mit TMZ	135
Abbildung 60: Stärkerer Effekt von TMZ auf die Zellviabilität von GF11-36N-leukämischen Zellen gegenüber GF11-36S-leukämischen Zellen.....	137
Abbildung 61: TMZ induzierte mehr Apoptose und Zelltod in GF11-36N-leukämischen Zellen als in GF11-36S-leukämischen Zellen	138
Abbildung 62: Schematische Darstellung der Durchführung von CFU-Assays.....	138
Abbildung 63: Selektiver Effekt der Behandlung mit 50 µg/ml TMZ auf murine GF11-36N-leukämische Knochenmarkzellen	139
Abbildung 64: Bilder der Kolonien von nicht leukämischen und leukämischen GF11-36S- und GF11-36N-Zellen nach Behandlung mit 25 µg/ml TMZ.....	140
Abbildung 65: Selektiver Effekt der Behandlung mit 25 µg/ml TMZ auf murine GF11-36N-leukämische Knochenmarkzellen	141
Abbildung 66: 25 µg/ml TMZ hatte einen selektiven Effekt auf GF11-36N- sowie GF11-KD-NUP98-HOXD13-leukämische Zellen	143
Abbildung 67: Die Kombinationsbehandlung mit 50 µg/ml TMZ und 1 µM Olaparib hatte einen starken Effekt auf nicht leukämische und leukämische Zellen	145
Abbildung 68: Die Kombinationsbehandlung mit 25 µg/ml TMZ und 0,5 µM Olaparib hatte einen starken Effekt auf nicht leukämische und leukämische Zellen	146
Abbildung 69: Höherer Effekt der Kombination aus 10 µg/ml TMZ und 0,2 µM Olaparib auf GF11-36N-leukämische Zellen im Vergleich zu GF11-36S- leukämische und nicht leukämische Zellen.....	148
Abbildung 70: Geringer Effekt der Kombinationsbehandlung aus 10 µg/ml TMZ und 0,2 µM Olaparib auf die Anzahl an apoptotischen und toten Zellen in nicht leukämischen Lin ⁻ -Zellen	149
Abbildung 71: Mehr apoptotische und tote Zellen in GF11-36N-leukämischen Zellen nach der Kombinationsbehandlung mit 10 µg/ml TMZ und 0,2 µM Olaparib	150
Abbildung 72: Die Kombinationsbehandlung mit 10 µg/ml Temozolomid und 0,2 µM Olaparib hatte einen höheren Effekt auf primäre humane leukämische Zellen mit GF11-36N-Genotyp	152
Abbildung 73: Überblick zur Entstehung der genomischen Schäden in den GF11-36N-leukämischen Zellen.....	158
Abbildung 74: Schematische Darstellung der möglichen Rolle von GF11 bei der Regulation des Mgmt-Levels und dessen Einfluss auf die DNA-Reparatur.....	166

Abbildung 75: Schematische Darstellung des Wirkmechanismus von TMZ und in Kombination mit PARP-Inhibitoren 169

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien	41
Tabelle 2: Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien	43
Tabelle 3: Liste und Zusammensetzung der verwendeten Puffer	46
Tabelle 4: Liste der verwendeten Medien	47
Tabelle 5: Liste der verwendeten Kits	48
Tabelle 6: Liste der verwendeten Antikörper für die Durchflusszytometrie	48
Tabelle 7: Liste der verwendeten Antikörper für Western Blot und Immunfluoreszenz	49
Tabelle 8: Liste der verwendeten TaqMan-Primer	49
Tabelle 9: Liste der verwendeten PCR-Primer	49
Tabelle 10: Liste der verwendeten Geräte	50
Tabelle 11: Liste der verwendeten Programme	52
Tabelle 12: Übersicht der Antikörper-Kombinationen zur Differenzierung der Knochenmark-, Milz- und Blutzellen.	60
Tabelle 13: Geschlecht und Alter der genotypisierten MDS/AML-Patienten.....	83
Tabelle 14: Liste der Karyotypen von murinen leukämischen Knochenmarkzellen ..	90
Tabelle 15: Array-CGH-Ergebnisse der GF11-36N- und GF11-KD-MLL-AF9 leukämischen Knochenmarkzellen	92
Tabelle 16: Liste der veränderten DNA-Schadensantwortgene in GF11-36N-Zellen im Vergleich mit GF11-36S-Zellen	113
Tabelle 17: Liste der veränderten DNA-Schadensantwortgene in GF11-KD-Zellen im Vergleich mit GF11-36S-Zellen	114

1 Einleitung

1.1 Hämatopoese

Als Hämatopoese wird der Prozess zur Bildung von reifen/differenzierten Blutzellen ausgehend von hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) bezeichnet. Die Charakteristika der HSCs sind auf der einen Seite die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und auf der anderen Seite die Fähigkeit zur Differenzierung in Vorläuferzellen (Multipotenz der HSCs). Aus diesen Vorläuferzellen können alle Zellen des Blutes gebildet werden (Hallek et al., 2007). Die Hämatopoese wird meist als hierarchische Pyramide dargestellt (Abb. 1). Am Anfang dieses hierarchischen Systems befinden sich die pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen in der G₀-Phase des Zellzyklus („Ruhezustand“) (Rossi et al., 2007; Hallek et al., 2007; Seita and Weissman, 2010). Kommt es durch intrinsische Faktoren zur Aktivierung, und dadurch zur Zellteilung der HSCs, kann die Stammzelle unterschiedliche Wege einschlagen. Auf der einen Seite gibt es die Möglichkeit der symmetrischen Zellteilung, bei welcher entweder zwei neue Stammzellen gebildet werden oder zwei neue reifende, weiter differenzierende Tochterzellen entstehen. Auf der anderen Seite gibt es die asymmetrische Zellteilung bei welcher eine neue Stammzelle sowie eine neue reifende Tochterzelle entstehen (Kasper et al., 2016). Die bei der Zellteilung entstehenden Tochterzellen können zu multipotenten Vorläuferzellen (MPP) differenzieren. Diese Vorläuferzellen verlieren die Fähigkeit der Selbsterneuerung, besitzen aber die Fähigkeit in alle Zellen der hämatopoetischen Linien zu differenzieren. Auf der einen Seite können MPPs zu lymphatisch geprägten multipotenten Vorläuferzellen (engl.: *lymphoid primed multipotent progenitor*, LMPP) und weiter über die gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle (engl.: *common lymphoid progenitor* CLP) bis hin zu den reifen T- und B-Zellen sowie natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) differenzieren. Diese Linie wird als lymphoide Linie bezeichnet. Dagegen differenzieren bei der myeloiden Linie die MPPs zuerst in gemeinsame myeloide Vorläuferzellen (engl.: *common myeloid progenitor*, CMP). Diese CMPs können wiederum zu Granulozyten-Makrophagen-Vorläuferzellen (GMP) oder Megakaryozyten-Erythrozyten-Vorläuferzellen (MEP) differenzieren. Die GMPs differenzieren dann zu reifen Granulozyten oder Monozyten, wohingegen die MEPs zu Erythrozyten, Thrombozyten oder Megakaryozyten reifen (Kondo et al., 1997; Akashi et al., 2000; Hallek et al., 2007; Seita and Weissman, 2010; Welinder and Murre, 2011; Harvey, 2012). Die LMPPs besitzen ebenfalls das Potenzial zu GMPs zu differenzieren (Adolfsson et al., 2005) (Abb. 1).

Die Hämatopoese, oder genauer gesagt, die Proliferation und Differenzierung der HSCs sowie der Vorläuferzellen wird durch ein komplexes Zusammenspiel aus Zytokinen, Transkriptionsfaktoren und Zell-Zell-Interaktionen reguliert. Kommt es zu Veränderungen dieses Zusammenspiels und dadurch zu Fehlern bei der Hämatopoese, kann es zu unterschiedlichen hämatopoetischen Erkrankungen, wie Anämien, Myelodysplastischem Syndrom (MDS) oder Leukämien, führen (Sawyers et al., 1991; Orkin, 1995; Schwarzmeier, 1996; Hallek et al., 2007; Jung et al., 2016).

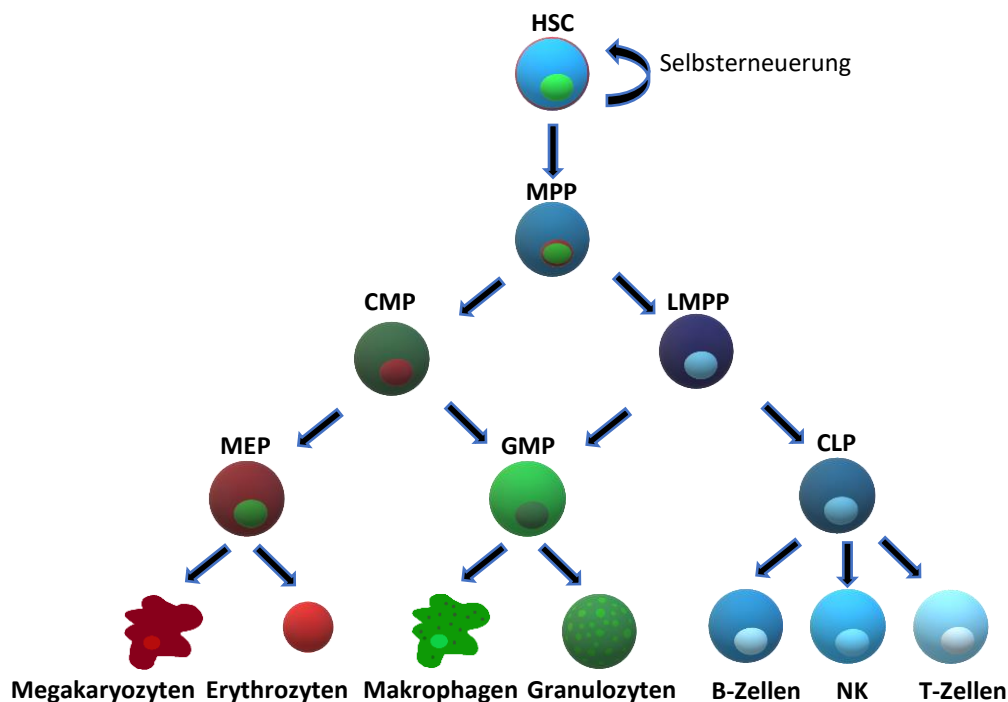


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der Hämatopoese

Die Hämatopoese wird als hierarchische Pyramide dargestellt. An deren Anfang befinden sich die HSCs, welche über Vorläuferzellen zu reifen Zellen differenzieren. HSC: hämatopoetische Stammzelle; MPP: multipotente Vorläuferzelle; CMP: gemeinsame myeloide Vorläuferzelle; LMPP: multipotente lymphatische Vorläuferzelle; MEP: Megakaryozyt-Erythrozyt-Vorläuferzelle; GMP: Granulozyten-Monozyten-Vorläuferzelle; CLP: gemeinsame lymphatische Vorläuferzellen; NK: natürliche Killerzelle; verändert nach: (Adolfsson et al., 2005; Welinder and Murre, 2011).

1.2 Myelodysplastisches Syndrom und akute myeloische Leukämie

Das MDS ist eine prämaligne Erkrankung der pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (Chung et al., 2008; Giagounidis, 2020). Die Inzidenz einer MDS-Erkrankung liegt bei ca. 5 Erkrankungen/100.000 Menschen und nimmt mit höherem Alter zu. Im Alter von >70 Jahren steigt die Inzidenz auf 22-45 Erkrankungen/100.000 Menschen (Greenberg et al., 2011). Außerdem erkranken Männer häufiger an MDS als Frauen (Greenberg et al., 2011; Giagounidis, 2020). Bei MDS-Patienten kommt es häufig zu Anämien oder Zytopenien, darunter Thrombozytopenie sowie Leukopenie.

Infolge dessen leiden die Patienten unter Infektionen und/oder Blutungen (Hamblin, 1992). Das größte Problem des MDS ist ein mögliches Voranschreiten der Erkrankung zur akuten myeloischen Leukämie (AML), weshalb das MDS früher auch als „Präleukämie“ bezeichnet wurde (Greenberg et al., 1997; Giagounidis, 2020).

Die AML ist bei Erwachsenen die häufigste Form der akuten Leukämie, mit einem Anteil aller akuten Leukämien von 80-90% bei Erwachsenen und 15-20% bei Kindern (Ehninger and Aul, 2008). Die Erkrankung kann in allen Altersstufen auftreten jedoch ist die Inzidenz einer AML-Erkrankung in älteren Menschen höher. In Deutschland beträgt das mediane Erkrankungsalter 72 Jahre (Kraywinkel and Spix, 2017). Die Inzidenz einer AML-Erkrankung liegt in den USA bei ca. 4,3/100.000 Menschen (Männer: 5,42, Frauen: 3,41) (Howlader N. et al., 2019). In Deutschland beträgt die Anzahl an jährlichen Neuerkrankungen ca. 4.100 (2013: ca. 2.600 Männer und ca. 2.050 Frauen) (Kraywinkel and Spix, 2017). Die AML ist trotz vieler diagnostischer und therapeutischer Fortschritte in den letzten Jahren, in den meisten Fällen immer noch unheilbar. Dennoch konnte die 5-Jahres-Überlebensrate der AML-Patienten von 1987 bis 2015 um ca. 18% gesteigert werden (Howlader N. et al., 2019). Das relative Fünfjahresüberleben in Deutschland beträgt bei Frauen 25,8% und bei Männern 21,7% und hängt stark vom Alter der Patienten ab (z.B.: 15-34 Jahre: 63,4%, 55-64 Jahren: 34,3%, >75 Jahre: 4,6%) (Kraywinkel and Spix, 2017). Das liegt auf der einen Seite daran, dass ältere Menschen weniger tolerant gegenüber intensiver Behandlungen sind und auf der anderen Seite ist bei älteren Patienten eine deutliche Veränderung der AML-Erkrankung zu sehen (mehr zytogenetische Veränderungen, MDR-1 Expression und höhere Anzahl an CD34⁺-Zellen) (Smith et al., 2004; Estey and Döhner, 2006).

Die AML ist eine maligne Erkrankung des hämatopoetischen Systems (Estey and Döhner, 2006). Die heterogene Erkrankung ist durch die Akkumulation von unreifen und nicht-funktionsfähigen hämatopoetischen Vorläuferzellen (sog. Blasten) der myeloiden Zelllinie im peripheren Blut (PB) und Knochenmark (KM) charakterisiert (Estey and Döhner, 2006). Normalerweise befinden sich die HSCs am Anfang des hierarchischen Systems und differenzieren in reife, funktionsfähige Zellen. Bei der AML hingegen sind Leukämie-initiiierende Zellen (LIC, engl.: *leukemia initiating cells*) Träger der Erkrankung (Bonnet and Dick, 1997). In diesen malignen Zellen kommt es zur Blockierung der Differenzierung und die LICs reagieren nicht mehr auf Signale oder Faktoren, welche die Proliferation und Differenzierung der Zellen regulieren (Bonnet

and Dick, 1997; Estey and Döhner, 2006; Short et al., 2018). Durch den Differenzierungsblock und die unkontrollierte Proliferation kommt es zur Anhäufung von unreifen und nicht-funktionsfähigen Vorläuferzellen im KM und PB. Diese Anhäufung führt in Patienten zu Anämien, Thrombozytopenien und Neutropenien. Die verminderte Anzahl der Zellen, wie z.B. Erythrozyten und Thrombozyten im Blut führt zu Problemen beim Sauerstofftransport, der Blutgerinnung und zur Beeinträchtigung des Immunsystems. Dadurch leiden die Patienten an Symptomen, welche von Müdigkeit, Fieber, Infektionen und Blutungen bis hin zu Organinfiltrationen (wie Leber, Milz, Lymphknoten) reichen (Löwenberg et al., 1999; Estey and Döhner, 2006). Unbehandelt führt eine AML innerhalb von wenigen Tagen/Wochen zum Tod, welcher meist durch Sepsen, starke Blutungen oder Leukostasen eintritt (Smith et al., 2004). Von einer AML wird gesprochen, wenn mehr als 20% Blasten mit myeloiden Oberflächenantigenen (z.B. CD33, CD13) im KM oder Blut der Patienten gefunden werden (Estey and Döhner, 2006). Es gibt zwei verschiedene Möglichkeiten die AML zu klassifizieren, die Klassifizierung nach dem FAB (French-American-British)-System oder das System der Weltgesundheitsorganisation (WHO). Die FAB-Klassifizierung wurde 1976 entwickelt und im Laufe der Jahre erweitert. Die AML wird hierbei in 8 Untergruppen (M0-M7), basierend auf der Morphologie der Blasten, unterteilt (Bennett et al., 1976). Die FAB-Klassifizierung wird aber mehr und mehr durch die modernere Klassifizierung der WHO ersetzt. Bei dieser Klassifizierung werden neben den morphologischen Beschaffenheiten auch genetische und immunologische Eigenschaften der malignen Zellen sowie klinische Informationen betrachtet (Vardiman et al., 2009; Swerdlow et al., 2017). Die WHO beschreibt mehrere genetische Veränderungen, welche mit der *de novo* AML assoziiert sind, darunter:

- RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO): t(8;21)(q22;q22)
- CBF β -MYH11: inv(16)(p13q22) oder t(16,16)(p13;q22)
- PML/RAR α : t(15;17)(q22;q12)
- DEK-NUP214: t(6;9)(p23;q34)
- RPN1-EVI1: inv(3)(q21;q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2)
- MLL 11q23 Anomalien
- AML mit NPM1 Anomalien
- AML mit CEBPA Anomalien

(Vardiman et al., 2002; Vardiman et al., 2009; Arber et al., 2016). Veränderungen im *mixed lineage leukemia (MLL)*-Gen führen zu einer besonders aggressiven AML mit einer schlechten Prognose (Stavropoulou et al., 2016). *MLL* codiert eine

Histon-Methyltransferase (KMT2A), welche direkt an die DNA bindet und die Transkription von u.a. Homeobox (*HOX*)-Genen positiv reguliert (Nakamura et al., 2002). Das *MLL* Gen ist bei 5-10% der AML-Fälle verändert und es wurden über 50 Fusionspartner beschrieben (Krivtsov et al., 2013). Die häufigsten Fusionspartner in der AML sind als Folge der Translokationen t(6;11) AF6 und t(9;11) AF9 (Krauter et al., 2009). AF9 ist ein wichtiger Regulator bei der Aufrechterhaltung der HSC-Eigenschaften und *in vitro* schützt/reguliert AF9 die Stammzeleigenschaften der HSCs (Calvanese et al., 2019). Das Fusionsprotein aus *MLL* und AF9 (*MLL-AF9*) kontrolliert die Myeloproliferation und führt zu einer hochinvasiven AML mit Expression von Genen der Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) oder seltener zu einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL) (Dobson et al., 1999; Stavropoulou et al., 2016).

Ein weiteres Gen, welches Mutationen in verschiedenen hämatopoetischen Erkrankungen (wie MDS, AML, chronische myeloische Leukämie) zeigt, ist *Nucleoporin 98 (NUP98)*. Das *NUP98*-Protein ist bei normaler Funktion ein Teil des Kernporenkomplexes und beim Transport von RNA und Proteinen durch die Kernmembran involviert. Für *NUP98* sind 15 verschiedene Translokationspartner bekannt, darunter *HOXD13* (Slape and Aplan, 2004). *HOXD13* gehört zu der *Hox*-Genfamilie und dessen Proteinprodukt spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Gliedmaßen (Kurban et al., 2011). Pineault und Kollegen haben gezeigt, dass die Knochenmarkstransplantation mit *NUP98-HOXD13* exprimierenden Zellen (Expression durch retrovirale Transduktion) in Mäusen lediglich zu myeloproliferativen Erkrankungen führt, nicht aber zur AML-Entstehung. Erst durch eine zusätzliche deregulierte Expression von *Meis1* (Kofaktor von *HOX*) erkrankten die Mäuse an einer AML (Pineault et al., 2003). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass es in *NUP98-HOXD13*-Mausmodellen zuerst zu einer MDS-Entstehung kommt, welche dann in eine AML übergeht. Der Übergang zur AML fand nur in einem Teil der *NUP98-HOXD13*-Mäuse statt und ging mit einer langen Latenzzeit einher. Dies lässt erneut darauf schließen, dass neben *NUP98-HOXD13* weitere genetische Veränderungen, wie z.B. in *Meis1*, benötigt werden, um eine AML zu entwickeln (Lin et al., 2005). Das *NUP98-HOXD13*-Onkogen könnte demnach in Knochenmarkszellen weniger „potent“ sein, als z.B. *MLL-AF9* (Slape and Aplan, 2004).

In den letzten Jahren wurde immer deutlicher, dass nicht nur genetische Veränderungen zu einer AML führen, sondern auch epigenetische Veränderungen und Mutationen in Transkriptionsfaktoren oder Veränderungen in deren Expression zu

einer AML-Entstehung beitragen können (Rosenbauer et al., 2004; Wouters and Delwel, 2016; Hönes et al., 2016).

1.3 Growth Factor Independence 1

Die Regulation der Genexpression in Zellen ist ein sehr komplexer Prozess und essenziell für jeden biologischen Prozess. Eine wichtige Rolle bei der Expression von Genen spielen Transkriptionsfaktoren (Johnson and McKnight, 1989; Lelli et al., 2012). Transkriptionsfaktoren erkennen spezifische DNA-Sequenzen und binden direkt oder indirekt an die DNA. Mutationen oder Veränderungen von Transkriptionsfaktoren sind mit vielen Krankheiten assoziiert (Yusuf et al., 2012). Ein Transkriptionsfaktor, welcher eine wichtige Rolle bei der Hämatopoese spielt und mit der Entstehung von hämatopoetischen Erkrankungen assoziiert ist, ist Growth Factor Independence 1 (Gfi1). Gfi1 wurde erstmals im Jahre 1993 von Gilks und Kollegen beschrieben (Gilks et al., 1993). Gilks und sein Team zeigten, dass *Gfi1* ein Integrationsort des Moloney murinen Leukämievirus ist, Gfi1 ein Interleukin 2-unabhängiges Wachstum von T-Zellen verursacht und die Progression der T-Zell-Leukämie beeinflusst. Außerdem wurde gezeigt, dass Gfi1 im Thymus, der Milz sowie in den Hoden exprimiert wird (Gilks et al., 1993). Diese Studie lieferte erste Hinweise, dass Gfi1 eine Rolle bei der Entstehung von hämatopoetischen Erkrankungen spielt. Über die Jahre wurde die Rolle von Gfi1 in Blutzellen sowie der normalen und malignen Hämatopoese immer genauer beschrieben. Außerdem wurde gezeigt, dass Gfi1 neben der Rolle in der Hämatopoese auch Funktionen bei der Entwicklung von Haarzellen im Innenohr (Wallis et al., 2003; Hertzano et al., 2004), bei der Differenzierung von sekretorischen Zellen im Darm (Shroyer et al., 2005) und bei der Differenzierung von neuroendokrinen Lungenzellen (Kazanjian et al., 2004) hat. Die Überexpression von *Gfi1* in Lungenkarzinomzellen führt zu einer Tumorbildung in Mäusen (Kazanjian et al., 2004).

1.3.1 Struktur und Funktion von GFI1

Das *Gfi1*-Gen kodiert das 422 Aminosäuren lange Gfi1-Protein mit einem Molekulargewicht von 55 kDa (Zweidler-Mckay et al., 1996; van der Meer et al., 2010). Gfi1 besteht aus drei Domänen (Abb. 2). Am N-Terminus des Gfi1-Proteins ist die 20 Aminosäuren lange SNAG-Domäne lokalisiert. Diese Repressor-Domäne von Gfi1 ist verwandt mit den N-terminalen-Domänen von anderen Transkriptionsfaktoren der Snail-Slug-Proteinfamilie (Grimes et al., 1996). Am C-Terminus des Gfi1-Proteins befindet sich die Zinkfingerdomäne, bestehend aus 6 C₂H₂-Zinkfingern (Zweidler-Mckay et al., 1996; Möröy and Khandanpour, 2011). Die Zinkfinger 3-5 sind für die

Bindung von Gfi1 an die DNA wichtig, wohingegen Zinkfinger 1, 2 und 6 bei der Bindung von Gfi1 mit anderen Proteinen eine Rolle spielen (Zweidler-Mckay et al., 1996; Möröy et al., 2015). Zwischen diesen beiden Domänen liegt die intermediäre Domäne. Die Funktion dieser Domäne ist bisher noch weitestgehend unklar. Es gibt jedoch Studien die zeigen, dass die intermediäre Domäne für Protein-Protein-Interaktionen zuständig ist (Vadnais et al., 2018; Vadnais et al., 2019).

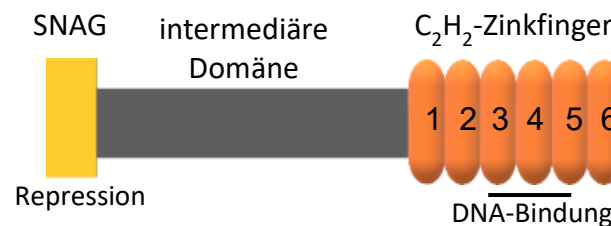


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Struktur von Gfi1

Der Gfi1 Transkriptionsfaktor hat 3 Domänen: SNAG-Domäne am N-Terminus, C₂H₂-Zinkfingerdomäne am C-Terminus und eine dazwischenliegende intermediäre Domäne. Verändert nach: (Möröy and Khandanpour, 2011).

Die Hauptfunktion von Gfi1 als Transkriptionsrepressor beruht auf der Rekrutierung von Histon-modifizierenden Enzymen zu den genregulatorischen Elementen der Zielgene von Gfi1 (Abb. 3). Diese Enzyme formen zusammen mit Gfi1 einen Komplex, welcher durch Gfi1-Bindestellen an die Promotor-Sequenzen der Zielgene bindet (Möröy et al., 2015; Möröy and Khandanpour, 2019). Gfi1 rekrutiert z.B. den Histon-Demethylen-Komplex Lysin-spezifische-Histon-Demethylase-1 (LSD1/CoRest), welcher Methylgruppen des Histons H3 am Lysin 4 entfernt (H3K4) (Saleque et al., 2007; Möröy and Khandanpour, 2019). Des Weiteren werden die Histon-Deacetylasen HDAC-1, -2 und -3 rekrutiert und entfernen Acetylgruppen von verschiedenen Histon H3-Enden (McGhee et al., 2003; Duan et al., 2005). Ein weiteres Enzym, welches von Gfi1 rekrutiert wird, ist die Methyltransferase G9a. Dieses Enzym ist für die Methylierung am Lysin 9 des Histons H3 zuständig (H3K9) (Duan et al., 2005). Durch die Rekrutierung der Histon-modifizierenden Enzyme kommt es zur Repression der Transkription der Gfi1-Zielgene. Unter den Gfi1-Zielen befinden sich Zellzyklusregulatoren, Zytokine, myeloid-spezifische Proteininasen sowie myeloid-kritische Transkriptionsfaktoren (Duan and Horwitz, 2003a, 2003b). Außerdem hat Gfi1 viele Zielgene, welche eine Rolle bei der myeloiden Differenzierung spielen (Phelan et al., 2010; Khandanpour et al., 2012).

Zwei Studien lassen darauf schließen, dass es neben der anerkannten Funktion von Gfi1 eine weitere Funktion gibt, welche unabhängig von der DNA-Bindung ist. Es wurde gezeigt, dass GFI1 LSD-1 nicht nur zu Promotorsequenzen von Zielgenen rekrutiert, sondern auch zum Tumorsuppressor-Protein p53. Aufgrund dessen kommt es zur Demethylierung der C-terminalen Domäne von p53. Durch die Interaktion zwischen Gfi1 und p53 wird die Induktion der Apoptose in T-Zellen kontrolliert (Vadnais et al., 2019). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Gfi1 eine Rolle bei der DNA-Reparatur spielt, indem GFI1 mit PRMT1, MRE11 und 53BP1 bindet (Vadnais et al., 2018). MRE11 ist Teil des MRN-Komplexes, welcher an DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) bindet und weitere Schritte der homologen Rekombination (HR) sowie des nicht homologen End-Joining (engl.: *Non-homologous end-joining*; NHEJ) einleitet (Kobayashi et al., 2004; Rass et al., 2009; Lamarche et al., 2010). 53BP1 ist ein wichtiger Regulator bei der Reparatur von DSB und hilft bei der Entscheidung, ob die Brüche mittels HR oder NHEJ repariert werden (Ward et al., 2003; Bunting et al., 2010). PRMT1 ist eine Arginin-Methyltransferase (Lin et al., 1996), welche unter anderem MRE11 und 53BP1 methyliert (Boisvert et al., 2005; Adams et al., 2005; Vadnais et al., 2018). GFI1 bildet einen Komplex zusammen mit PRMT1 und MRE11 oder 53BP1 und ermöglicht so die Methylierung von MRE11 bzw. 53BP1. Die Methylierung dieser Proteine ist für deren Aktivierung und somit für deren Funktion während der DNA-Reparatur notwendig (Vadnais et al., 2018).

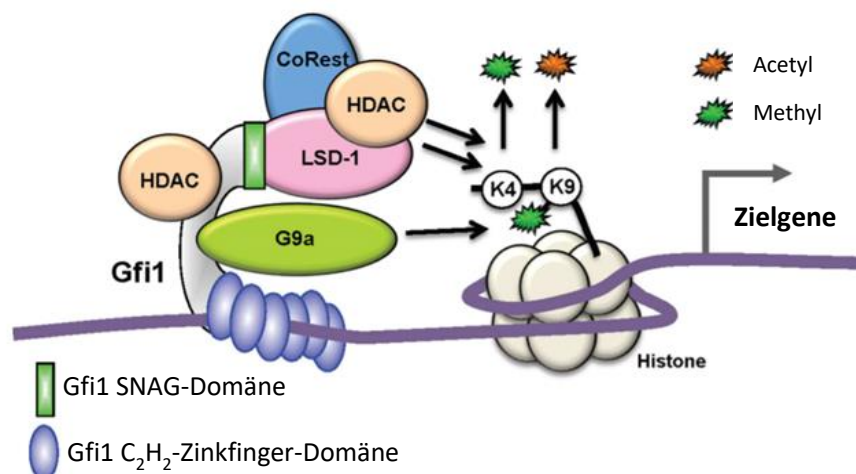


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Funktion von Gfi1 als Transkriptionsfaktor
Gfi1 rekrutiert Histon-modifizierende Enzyme (wie HDAC, LSD-1, G9a) zur DNA, um die Transkription von Zielgenen zu regulieren. Verändert nach: (Möröy and Khandanpour, 2019).

1.3.2 Die Rolle von GFI1 in der AML

Auf Grund der Funktion von Gfi1 während der normalen Hämatopoese und des Expressionsprofils von Gfi1 in hämatopoetischen Zellen wird spekuliert, ob der Transkriptionsfaktor bei der Entstehung der AML eine Rolle spielt. Denn neben HSCs, MPP1 und MPP2 sowie lymphoiden Vorläuferzellen (CLPs, ETPs) wird Gfi1 auch in GMPs, Monozyten sowie Granulozyten exprimiert (Hock et al., 2004; Zeng et al., 2004; Yücel et al., 2004; Möröy et al., 2015). Gfi1 ist wichtig für den Prozess der Linienentscheidung zwischen der myeloiden und der lymphoiden Linie und bei der späteren granulozytischen und monozytischen Linienentscheidung (Zeng et al., 2004; Hock and Orkin, 2006). Zur genaueren Untersuchung der Rolle von Gfi1 bei der Hämatopoese bzw. Myelopoese und den damit assoziierten Erkrankungen, wurde im Jahr 2002 von Karsunky und seinem Team und wenig später von Hock und Mitarbeitern jeweils ein *Gfi1*-defizienter Mausstamm (*Gfi1*-KO) generiert (Karsunky et al., 2002; Hock et al., 2003). Der Verlust von Gfi1 in Mäusen führt zu Entzündungsreaktionen, schweren Neutropenien bzw. zu einer reduzierten Anzahl an neutrophilen Granulozyten und beschleunigt die Entwicklung des myeloproliferativen Syndroms (Karsunky et al., 2002; Hock et al., 2003; Khandanpour et al., 2011). Bei der Untersuchung von Patienten mit Neutropenie wurde bestätigt, dass Mutationen in GFI1 zu schwerer Neutropenie führen (Person et al., 2003). Der Mangel an Gfi1 hat des Weiteren eine Anhäufung von unreifen, monozytischen Zellen im Blut und KM von Mäusen zur Folge (Karsunky et al., 2002; Hock et al., 2003) und führt in Mäusen zu einem Block der myeloiden Differenzierung. In Folge dessen kommt es zu erhöhten Level bzw. zur Akkumulation von GMPs (Hock et al., 2003; Zeng et al., 2004; Horman et al., 2009; Hönes et al., 2016). Die myeloiden Vorläuferzellen ohne *Gfi1*-Expression sind selbst nach der Behandlung mit dem Zytokin G-CSF (Granulozyten-Koloniestimulierende Faktor), welches die Bildung von Granulozyten stimuliert, nicht fähig zu reifen Granulozyten zu differenzieren (Shadduck et al., 1971; Karsunky et al., 2002). Des Weiteren reguliert Gfi1 *HoxA9*, *Pbx1* und *Meis1* (wichtige Gene der myeloiden Differenzierung) während der normalen Hämatopoese und durch einen *Gfi1*-KO kommt es zu einem erhöhten Level an *HoxA9*, *Pbx1* und *Meis1* in den Mäusen. Die Untersuchungen von *Gfi1*-KO-Mäusen deuten darauf hin, dass der Mangel an Gfi1 zu myeloiden Leukämien führen kann, jedoch entwickelte keine der *Gfi1*-defizienten Mäuse eine AML. Dieser Sachverhalt legt nahe, dass der Verlust von Gfi1 einem präleukämischem Zustand ähnlich ist und weitere Ereignisse notwendig sind, um eine AML zu entwickeln (Horman et al., 2009).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) des *GFI1*-Gens zur Entwicklung einer MDS/AML prädisponiert. Bei dieser *Gfi1*-Variante ist ein Basenaustausch an c.107G>A (rs34631763), welcher zum Aminosäureaustausch an Position 36 von Serin (S) zu Asparagin (N) führt, vorhanden (Khandanpour et al., 2010). Durch den Aminosäureaustausch ist die Namensgebung *GFI1-36N* (SNP-Variante) und *GFI1-36S* (Wildtyp Form von *GFI1*) entstanden. Die Veränderung liegt in der intermediären Domäne von Gfi1 und könnte somit für Protein-Protein-Interaktionen von Bedeutung sein (Khandanpour et al., 2010; Möröy and Khandanpour, 2019). *GFI1-36N* kann bei 3%-5% der gesunden, kaukasischen Bevölkerung nachgewiesen werden und das Vorhandensein steigt in MDS-Patienten auf 9%-12% und in AML-Patienten auf 11%. Träger der *GFI1-36N*-Variante haben ein 1,6-fach erhöhtes Risiko an einer AML zu erkranken und MDS-Patienten mit *GFI1-36N*-Genotyp haben ein signifikant erhöhtes Risiko, dass die Krankheit in eine AML übergeht (Khandanpour et al., 2010; Khandanpour et al., 2012; Botezatu et al., 2016a). In AML- und MDS-Mausmodellen wurde bestätigt, dass *GFI1-36N* die Entwicklung einer AML fördert und mit einer schlechten Prognose einhergeht. Die Veränderung eines Allels ist dabei ausreichend, um eine Beschleunigung der Leukämie hervorzurufen (Botezatu et al., 2016b). *GFI1-36N* zeigt eine andere subnukleare Lokalisation als das normale *GFI1-36S*-Protein. Durch die abweichende Lokalisierung im Zellkern kann AML1-ETO (Produkt der t(8;21)-Translokation in AML-Patienten), im Gegensatz zu *GFI1-36S*, nicht mit *GFI1-36N* kolokalisieren und dadurch dessen Repressoraktivität nicht regulieren. Das deutet darauf hin, dass *GFI1* und seine Variante eine Rolle bei der AML-Klasse mit t(8;21)-Translokation spielen (Khandanpour et al., 2010). Zur genaueren Untersuchung des Einflusses von *GFI1-36N* wurden im Jahr 2012 von Khandanpour und Kollegen Knock-in (KI)-Mausstämme entwickelt, welche entweder das humane *GFI1-36N*- oder das humane *GFI1-36S*-Protein exprimieren (Khandanpour et al., 2012). Die *GFI1-36N*-Mäuse besitzen eine erhöhte Anzahl an GMPs, welche zudem Veränderungen der Genexpression und Funktion zeigten. Diese Veränderungen deuten darauf hin, dass die höhere Anzahl an GMPs in den *GFI1-36N*-Mäusen nicht nur durch eine höhere Proliferation sondern auch durch eine zusätzliche erlangte Fähigkeit zur Selbsterneuerung hervorgerufen wird (Khandanpour et al., 2012). Außerdem wurde gezeigt, dass *GFI1-36N* vermindert fähig ist, das Lysin 9 von Histon H3 (H3K9) zu deacetylieren. Dadurch kommt es vermehrt zu H3K9-Acetylierungen der *GFI1*-Zielgene. Die vermehrte H3K9-Acetylierung führt wiederum insbesondere zur

erhöhten Expression von Onkogenen wie z.B. *HoxA9*. Die epigenetischen Veränderungen kommen zustande, da GFI1-36N weniger stabil an die Zielgene bindet als GFI1-36S (Khandanpour et al., 2012; Botezatu et al., 2016b). Die vermehrte Acetylierung eröffnet die Möglichkeit die *GFI1-36N*-leukämischen Zellen mittels epigenetischer Therapie, z.B. mit CTK7a (Histon-Acetyltransferase-Inhibitor) zu behandeln. Durch die Gabe von CTK7a konnte das Überleben von *GFI1-36N*-leukämischen Mäusen verlängert werden, im Gegensatz zu unbehandelten sowie *GFI1-36S*-leukämischen Mäusen (Botezatu et al., 2016b). GFI1-36N beschleunigt des Weiteren myeloproliferative Erkrankungen, welche durch Mutationen im *KRAS*-Gen hervorgerufen werden (Khandanpour et al., 2012). All diese Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Expression der *GFI1-36N*-Variante zu einem präleukämischen Status der myeloiden Vorläuferzellen führt und eine AML-Entwicklung dadurch erleichtert wird (Khandanpour et al., 2012; Botezatu et al., 2016b; Möryö and Khandanpour, 2019).

Wenig später wurde bei der Untersuchung verschiedener Expressionslevel von *Gfi1* in AML-Mausmodellen sowie in MDS-/AML-Patienten gezeigt, dass eine geringe Expression von *GFI1* mit einer schlechteren Prognose einhergeht. Durch eine geringe Expression von *GFI1* in leukämischen Mausmodellen (*MLL-AF9* und *NUP98-HOXD13*) wird die AML-Entwicklung beschleunigt (Hönes et al., 2016). Leukämische Zellen mit einem niedrigen GFI1-Level zeigen außerdem ein erhöhtes Level an H3K9-Acetylierung der GFI1-Zielgene. Die erhöhte Acetylierung deutet darauf hin, dass niedrige GFI1-Level zu einer ineffizienteren Rekrutierung von Histon-modifizierenden Enzymen führen und dadurch Gene, welche eine Rolle bei der AML-Entstehung spielen, nicht mehr reguliert werden (Hönes et al., 2016). Darüber hinaus führt eine Überexpression von *GFI1* in humanen Leukämie-Zelllinien sowie AML-Mausmodellen *in vitro* zu einem verminderten Wachstum der leukämischen Zellen und zu deren Differenzierung. *In vivo* führt die Überexpression zu morphologischen und funktionellen Änderungen in den leukämischen Zellen (Hönes et al., 2017). Durch diese Studien wurde gezeigt, dass GFI1 einen Dosis-abhängigen Effekt bei der Entstehung von AML hat (Hönes et al., 2016; Hönes et al., 2017).

1.4 DNA-Reparatur

Jede Zelle ist konstant endogenen und exogenen Stoffen oder Reizen ausgesetzt, welche zu unterschiedlichen DNA-Schäden und dadurch zur genomischen Instabilität führen können (Dexheimer, 2013). Täglich kommt es in jeder Zelle des menschlichen Körpers zu 10.000 DNA-schädigenden Ereignissen (Lindahl and Barnes, 2000). Damit diese Schäden bzw. Mutationen nicht im Genom persistieren, ist ein komplexes System aus DNA-Reparaturwegen, Zellzykluskontrolle sowie Signalwegen zum Zelltod notwendig (Chatterjee and Walker, 2017). DNA-Schäden können entweder durch endogene Reize, wie der spontanen Hydrolyse (Verlust von Basen), reaktiven Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffspezies (Basenmodifikationen, Einzelstrangbrüche (engl.: *single-strand breaks*; SSB), DSB), Fehler während der Replikation (DNA-Fehlpaarungen, Insertionen, Deletionen) oder durch exogene Stoffe, wie chemische Substanzen (Medikamente, Tabakrauch usw.), UV-Licht (Querverbindungen DNA-Stränge, DNA-Addukte) sowie ionisierender Strahlung (SSB, DSB) hervorgerufen werden (Ward, 1988; Lindahl, 1993; Cadet et al., 1997; McCulloch and Kunkel, 2008; Yonekura et al., 2009; Dexheimer, 2013). Die unterschiedlichen DNA-Schäden benötigen verschiedene DNA-Reparaturwege zur Behebung. Es gibt fünf Haupt-Reparaturwege zur Behebung von DNA-Schäden. Die Homologe Rekombination (HR) und das nicht homologe End-Joining (NHEJ) sind für die Reparatur von DNA-DSB verantwortlich. Dagegen sind die Basenexzisionsreparatur (BER), Nukleotidexzisionsreparatur (NER) sowie die *Mismatch*-Reparatur (MMR) für die Reparatur von Einzelstrang-Schäden, wie SSB, Basenmodifikationen oder Basen-Fehlpaarungen verantwortlich (Chatterjee and Walker, 2017). Neben den Haupt-Reparaturwegen gibt es noch weitere Signalwege zur Reparatur von DNA-Schäden, wie die MGMT-vermittelte Reparatur (Kaina et al., 2007).

1.4.1 DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur

DNA-DSB gehören zu der Sorte von DNA-Schaden, welche unrepariert für die Zellen und für den Menschen schlimme Folgen haben kann. Bereits ein DSB kann zum Zelltod führen. Außerdem können DSB unrepariert zu chromosomalen Aberrationen führen, welche beim Menschen zur Entstehung von z.B. Krebs beitragen (Khanna and Jackson, 2001). Deshalb ist es für den Organismus wichtig, die DSB früh zu erkennen und schnell zu beseitigen. Die Reaktion der Zellen auf DNA-Schäden wird hauptsächlich von dem ATM-Chk2- und dem ATR-Chk1-Signalweg koordiniert (Smith et al., 2010). Die beiden Proteinkinase ATM und ATR gehören zu den

Schlüsselproteinen der Schadensantwort und fördern die Rekrutierung weitere Proteine zum DNA-Schaden (Matsuoka et al., 2007; Ciccia and Elledge, 2010). Eine der ersten Schadensantwort der Zellen auf DSB ist die Phosphorylierung des Histons H2AX (dann γ H2AX) durch ATM (Rogakou et al., 1998; Burma et al., 2001; Kuo and Yang, 2008). Die Phosphorylierung von H2AX führt dann zu einer Reihe von weiteren Ereignissen, darunter die Rekrutierung von z.B. 53BP1 und BRCA1 zum Ort des DNA-Schadens (Harper and Elledge, 2007; Kuo and Yang, 2008). Neben ATM und ATR zählen die Proteine PARP1 und PARP2 zu den Sensoren zur Erkennung von DNA-DSB und -SSB, welche nach dem Eintritt des Schadens rekrutiert werden (Murcia et al., 1997; Fisher et al., 2007; Ciccia and Elledge, 2010). Es gibt zwei Signalwege zur Reparatur von DNA-DSB. Auf der einen Seite die fehlerfreie HR, welche zur DSB-Reparatur als Vorlage das unbeschädigte Schwesterchromatin verwendet und auf der anderen Seite das fehlerbelastete NHEJ, welches die DSB durch direkte Ligation der DNA-Enden repariert (Dexheimer, 2013; Chatterjee and Walker, 2017). Bei der Entscheidung, welcher der beiden DSB-Reparaturwege von der Zelle durchgeführt wird, spielen 53BP1 und BRCA1 eine wichtige Rolle. Die Interaktion zwischen 53BP1 und dem Chromatin führt zum NHEJ wohingegen in der S- und G2-Phase BRCA1 dem 53BP1 entgegenwirkt und somit die HR fördert (Yu et al., 2006; Dimitrova et al., 2008; Bunting et al., 2010; Chapman et al., 2012).

1.4.1.1 Homologe Rekombination

Die HR findet bevorzugt in der späten S-Phase und der G2-Phase des Zellzyklus statt, da das unbeschädigte Schwesterchromatin als Vorlage für die Reparatur benötigt wird (Johnson and Jasin, 2000; Rothkamm et al., 2003). Die HR kann grob in 3 Phasen eingeteilt werden: Präsynapse, Synapse und Postsynapse (Dexheimer, 2013). Der DNA-Reparaturweg wird durch die Bindung des MRN (MRE11-RAD50-NBS1)-Komplexes, an die Stelle des DNA-DSB, aktiviert (Chapman et al., 2012). Durch die Bindung des MRN-Komplexes wird die Kinase ATM zum DNA-Schaden rekrutiert, aktiviert und führt dann die Phosphorylierung des Histons H2AX durch (Burma et al., 2001; You et al., 2005). Die Phosphorylierung leitet dann die Rekrutierung von u.a. MDC-1 ein, welches wiederum von ATM phosphoryliert wird und dadurch zwei E3-Ubiquitin-Ligasen zum DSB bringt (Stucki et al., 2005; Lou et al., 2006). Die E3-Ligasen ubiquitinieren H2AX und an diese Ubiquitinierungen können dann 53BP1 und BRCA1 binden (Kolas et al., 2007; Minter-Dykhouse et al., 2008). BRCA1 wirkt zur Initiation der HR 53BP1 entgegen und ubiquitiniert CtIP. Die Ubiquitinierung führt nicht zum Abbau von CtIP sondern zu dessen Chromatin Bindung (Yu et al., 2006; Chapman

et al., 2012). Durch CtIP, die Endonuklease-Aktivität des MRN-Komplexes und weiterer Proteine wird die DNA am DSB abgebaut (5'-3'), um 3'-Überhänge zu erzeugen (Sartori et al., 2007). Mit der Durchführung dieses Schrittes muss die Zelle den DSB mittels HR reparieren (Chatterjee and Walker, 2017). Die Einzelstrang-DNA-Enden werden dann von RPA besetzt und anschließend unter der Hilfe von u.a. BRCA2 und RAD52 durch die RAD51-Rekombinase ersetzt. Dabei entsteht ein RAD51-Nucleoprotein-Filament (Tarsounas et al., 2004; Miyazaki et al., 2004; Forget and Kowalczykowski, 2010). Das Nucleoprotein-Filament führt dann eine Suche nach der homologen Sequenz des geschädigten Stranges durch. Nachdem die homologe DNA gefunden wurde, hilft RAD51 der beschädigten DNA in das Schwesterchromatid einzudringen und formt dadurch eine D-Schleife (Sebesta et al., 2013; Dexheimer, 2013; Chatterjee and Walker, 2017). Anschließend wird RAD51 von anderen Proteinen entfernt und dadurch können die Polymerasen δ , κ und η die Synthese der DNA vorbereiten und den neuen Strang synthetisieren. PCNA reguliert diesen Prozess (McIlwraith et al., 2005; Ahnesorg et al., 2006; Sebesta et al., 2013). Nach der erfolgreichen Synthese löst entweder das Proteine RTEL1 die D-Schleife auf oder die Holliday-Struktur wird durch andere Proteine aufgehoben (Barber et al., 2008; Ciccia and Elledge, 2010; Dexheimer, 2013; Chatterjee and Walker, 2017).

1.4.1.2 Nicht homologes End-Joining

Das NHEJ findet im Gegensatz zur HR in allen Phasen des Zellzyklus statt (Rothkamm et al., 2003). Entscheidend für die Zellen die DSB mittels NHEJ zu reparieren ist 53BP1. 53BP1 stabilisiert die DSB und erhöht deren Mobilität im Hinblick auf die Suche nach dem anderen Ende des gebrochenen Strangs, um dadurch die erfolgreiche Ligation zu erhöhen (Dimitrova et al., 2008; Ciccia and Elledge, 2010). Der erste Schritt des NHEJ ist die Bindung des Heterodimers Ku (Ku70/Ku80) an die DSB. Diese Bindung findet innerhalb von wenigen Sekunden statt und führt zur Rekrutierung weiterer NHEJ-Proteine (Feldmann et al., 2000; Mari et al., 2006). Zuerst wird die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) rekrutiert, welche die DNA-Reparatur initiiert und eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung der DNA-Enden, sowie bei der Verknüpfung der beiden DNA-Enden haben (Yoo and Dynan, 1999; Drouet et al., 2005; Meek et al., 2008). Nach der Bindung der DNA kommt es zur Autophosphorylierung der DNA-PK, wodurch es zu einer Destabilisierung der Bindung kommt (Chan and Lees-Miller, 1996). Diese Destabilisierung erleichtert die Bindung von DNA-End-verarbeitungs-Enzymen (engl.: *DNA-End-processing enzymes*) mit der DNA. Diese Enzyme sind wichtig für die Verarbeitung von verschiedenen DNA-Enden, welche durch den DSB

entstanden sind, wie z.B.: einzelsträngige-Überhänge (Ma et al., 2002). Nach der Rekrutierung der DNA-PK und der möglichen Verarbeitung der DNA-Enden wird der Komplex aus XRCC4 und der DNA-Ligase IV (LIG4) zum DNA-Schaden befördert. Zusammen mit dem Faktor XLF führt der Komplex die DNA-Ligation durch (Nick McElhinny et al., 2000; Drouet et al., 2005; Ahnesorg et al., 2006; Dexheimer, 2013; Chatterjee and Walker, 2017). Falls die geschädigte Zelle nicht in der Lage ist, das beschriebene, klassische NHEJ durchzuführen, gibt es das alternative (alt)-NHEJ. Ein Unterschied zur klassischen NHEJ ist, dass das alt-NHEJ eine Restriktion der DNA-Enden benötigt, ähnlich wie die HR. Des Weiteren wird das alt-NHEJ durch PARP unterstützt (Wang et al., 2006; Ciccica and Elledge, 2010). PARP1 konkurriert außerdem mit Ku, um die DNA-Bindung, was bei erfolgreicher Verdrängung von Ku zur Durchführung der HR führt (Hochegger et al., 2006).

1.4.2 DNA-Einzelstrang-Reparatur

1.4.2.1 Basenexzisionsreparatur

Die BER ist für die Reparatur einer großen Anzahl von kleinen Basenveränderungen, welche die DNA-Helix-Struktur nicht stark beeinflussen, zuständig (Krokan and Bjørås, 2013). In welcher Phase des Zellzyklus der Reparaturweg aktiv ist, kommt auf die Art des Schadens und die Schadensantwort an (Offer et al., 2001; Chaudhry, 2007; Mjelle et al., 2015). Eine Veränderung der BER spielt u.a. bei der Entstehung von Krebs eine Rolle (Wallace et al., 2012). Die BER kann grob in folgende Schritte eingeteilt werden: Initiierung, DNA-End-Verarbeitung, Reparatur-Synthese, Ligation (Krokan and Bjørås, 2013). Die Initiierung der BER findet durch eine von mindestens 11 bekannten DNA-Glykosylasen statt. Die DNA-Glykosylasen spalten die Glycosylbindung zwischen Desoxyribose und der veränderten oder fehlgepaarten Base und lösen somit die Base vom DNA-Strang (Wallace et al., 2012; Krokan and Bjørås, 2013). Welche der Glykosylasen aktiv ist, hängt von der Art des Schadens ab. So repariert beispielsweise OGG1 8-Oxoguanin (8-OxoG), NTHL1 5-Hydroxycytosin und UNG falsch eingebaute Uracil-Basen (U:G, U:A) (Akbari et al., 2004; Radom et al., 2007; Krokan and Bjørås, 2013). Es gibt zwei unterschiedliche Wege nach der Initiierung der BER: die Ausbesserung von kurzen Stücken bzw. Einzelnukleotid-Lücken (engl.: *short-patch repair*) und die Ausbesserung von langen Stücken (engl.: *long-patch repair*). Wenn die abasische Seite von monofunktionellen Glykosylasen (Glykosylasen mit nur Glykosylase-Aktivität) gebildet wird, dann wird die *short-patch*-BER durchgeführt (Wallace et al., 2012; Chatterjee and Walker, 2017). Die *short-patch*-BER tritt in

80-90% der BER-Reparaturen ein (Dexheimer, 2013). Bei diesem Weg der BER dient die abasische Stelle als Substrat für die Endonuklease APEX1 (auch APE1). APEX1 generiert einen Hydroxylrest am 3'-Ende und ein Desoxyribose-Phosphat am 5'-Ende (Doetsch and Cunningham, 1990; Mol et al., 2000). Das Desoxyribose-Phosphat sowie die entstandene Einzelnukleotid-Lücke kann von der POL β behoben und anschließend durch die Ligase LIG1 oder dem Komplex aus LIG3 und XRCC1 verbunden werden (Matsumoto and Kim, 1995; Prasad et al., 1996; Prasad et al., 2010; Odell et al., 2011; Krokan and Bjørås, 2013; Chatterjee and Walker, 2017). Die *long-patch*-BER wird durchgeführt, wenn die abasische Seite von bifunktionellen Glykosylasen (Glykosylasen mit Glykosylase- und β -Lyase-Aktivität) gebildet wird (Chatterjee and Walker, 2017). Beim *long-patch*-Weg werden viele Enzyme benötigt, welche auch eine Rolle bei der Replikation spielen (Krokan and Bjørås, 2013). Die POL β (nicht proliferierenden Zellen) oder die POL δ/ϵ (proliferierenden Zellen) verlängern das 3'-OH-Ende der Lücke zusammen mit PCNA (Fortini et al., 1998; Gary et al., 1999; Akbari et al., 2009; Chatterjee and Walker, 2017). Durch die Verlängerung in einer „*strand-displacement*“-Weise entsteht ein sogenanntes *Flap*-Oligonukleotid (5'-Überhang der DNA), welches von FEN1 entfernt wird und danach kann der Strang durch LIG1 wieder zusammengefügt werden (Dianova et al., 2001; Ranalli et al., 2002; Dexheimer, 2013; Chatterjee and Walker, 2017).

Des Weiteren spielen PARP-Enzyme eine wichtige protektive Rolle bei der BER zum Schutz der Zelle vor SSB während der BER und damit die dennoch entstandenen SSB nicht zu DSB werden (Parsons et al., 2005; Woodhouse et al., 2008; Krokan and Bjørås, 2013). Dennoch treten während der BER immer wieder SSB auf. Die SSB-Brüche werden von vielen Enzymen repariert, welche auch bei der späten Phase der BER eine Rolle spielen (Dexheimer, 2013). Durch die SSB werden PARP1 und PARP2 aktiviert. Vor allem PARP1 dient als Sensor von DNA-SSB (Farmer et al., 2005; Ciccia and Elledge, 2010). Nach der Bindung von PARP an den DNA-Schaden können die Enzyme die Poly(ADP-ribosyl)ation (PAR) von sich selbst sowie anderen Proteinen durchführen (Benjamin and Gill, 1980; Fisher et al., 2007; Dexheimer, 2013). Sobald die PARP-Enzyme mit PAR modifiziert wurden, werden XRCC1 und LIG1 durch PARP zum SSB rekrutiert. Dadurch fördert PARP die DNA-Reparatur der Brüche durch Enzyme, welche mit XRCC1 interagieren (POL β , APEX1 usw.) (El-Khamisy et al., 2003; Ciccia and Elledge, 2010).

1.4.3 Reparatur von O⁶-Methylguanin

Neben Doppelstrangbrüchen und Einzelstrangschäden kommt es in den Zellen z.B. auch zu Methylierungen der DNA-Basen, welche nicht durch die BER oder NER repariert werden können. Eine solche Veränderung, die schon früh als mutagen und krebserregend beschrieben wurde, ist die Methylierung an der O⁶-Position von Guanin (O⁶-MeG) (Loveless, 1969; Singer and Kuśmierek, 1982; Tano et al., 1990). Diese Veränderung hat für die Zellen schwerwiegende Folgen. Können die Zellen die Methylgruppe von Guanin nicht entfernen, kommt es während der DNA-Replikation zur Fehlpaarung des O⁶-MeG mit Thymin. Wird diese Fehlpaarung von der funktionierenden MMR entdeckt, ist das für die Zelle fatal. Die MMR versucht die Fehlpaarung zwischen O⁶-MeG und Thymin zu reparieren. Diese Reparatur ist jedoch zwecklos, da im nächsten Replikationsschritt erneut ein Thymin eingebaut wird. Deshalb kommt es in den Zellen zu endlosen, zwecklosen MMR-Zyklen, welche zu anhaltenden Lücken im DNA-Strang führen. Diese Lücken führen wiederum zu DNA-SSB und -DSB und letztlich zur Apoptose und zum Zelltod (Kaina et al., 1997; Hickman and Samson, 2004; Liu and Gerson, 2006; Mitra, 2007). Zellen mit einer MMR-Defizienz entgehen diesem Mechanismus und können trotz der O⁶-MeG-Läsion überleben (Pepponi et al., 2003; Barvaux et al., 2004; Casorelli et al., 2008).

O⁶-MeG wird durch das Enzym O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) repariert (Kaina et al., 2007). Erstmals wurde MGMT 1977 in Bakterien entdeckt und wenig später wurde MGMT in Säugetierzellen und auch humanen Zellen gefunden (Samson and Cairns, 1977; Pegg et al., 1983; Tano et al., 1990; Mitra, 2007). MGMT entfernt allein in nur einem Schritt die Methylgruppe von Guanin und benötigt keine Kofaktoren für die Reaktion. Der Transfer der Methylgruppe findet auf ein Cystein des MGMT-Proteins statt. Somit fungiert MGMT sowohl als Transferase als auch als Akzeptor der Methylgruppe. Jedes MGMT-Molekül kann nur eine Methylgruppe entfernen (Dolan et al., 1984; Pegg et al., 1995; Liu and Gerson, 2006; Mitra, 2007; Kaina et al., 2007). Durch den Transfer der Methylgruppe wird MGMT inaktiv, anschließend ubiquitiniert und schließlich von den Zellen abgebaut (Srivenugopal et al., 1996; Xu-Welliver and Pegg, 2002). MGMT kann nach dem Transfer der Methylgruppe nicht wieder aktiviert werden und deshalb wird in diesem Zusammenhang von einem Suizid-Enzym gesprochen (Liu and Gerson, 2006; Silber et al., 2012). Diese Eigenschaften von MGMT machen das Enzym zu einem wichtigen

Ziel bei der Therapie von Krebserkrankungen und gleichzeitig auch zu einem wichtigen Resistenzfaktor (Gerson, 2004; Liu and Gerson, 2006).

1.4.4 DNA-Reparatur-Medikamente

Veränderungen in der DNA-Reparatur sind bei der Entstehung von vielen Krankheiten von bedeutender Rolle (Dietlein et al., 2014). Durch Mutationen in DNA-Reparaturgenen und die daraus resultierenden Veränderungen bei der DNA-Reparatur steigt die genomische Instabilität und das Risiko einer Krebsentstehung (Negrini et al., 2010; Tubbs and Nussenzweig, 2017; Kiwerska and Szyfter, 2019). Vor allem in soliden Tumoren sind Defekte in der DNA-Reparatur gut erforscht, aber auch bei der Entstehung von Leukämien sind Veränderungen in der DNA-Reparatur von Bedeutung (Dietlein et al., 2014; Bret et al., 2016; Pearsall et al., 2018). Mehrere Reparaturwege und -gene, darunter die BER und die MMR sowie die Gene der HR *Rad51* und *Xrcc3*, wurden mit der AML-Entstehung in Zusammenhang gebracht (Seedhouse et al., 2004; Hamdy et al., 2011; Esposito and So, 2014; Bret et al., 2016). Deshalb sind Medikamente, welche auf die unterschiedlichen DNA-Reparaturwege einwirken, in der Klinik von großer Bedeutung (Minten and Yu, 2019). Zwei Medikamente, welche im Zusammenhang mit der DNA-Reparatur in der Klinik bereits bei der Behandlung von Krebserkrankungen eingesetzt werden, sind Temozolomid (Handelsname Temodal®, Temodar, Temcad) und Olaparib (Handelsname Lynparza®) (Cohen et al., 2005; Kurnit et al., 2018; Minten and Yu, 2019).

1.4.4.1 Temozolomid

Ein Medikament, welches unter anderem einen Einfluss auf die MGMT-vermittelte Reparatur hat, ist Temozolomid (TMZ). TMZ ist ein alkylierendes, kleines lipophiles Molekül, welches durch Veränderung des pH-Werts in seine aktive Form umgewandelt wird. Es besitzt gute pharmakokinetische Eigenschaften. Neben der guten oralen Bioverfügbarkeit kann TMZ die Blut-Hirn-Schranke durchqueren (Zhang et al., 2012; Ballesta et al., 2014). Der Wirkungsmechanismus von TMZ beruht auf dessen Fähigkeit, die DNA an unterschiedlichen Positionen von Guanin und Adenin zu methylieren. Diese Methylierungsläsionen werden dann von unterschiedlichen Reparaturmechanismen behoben (Abb. 4). Die Toxizität von TMZ kommt hauptsächlich durch die Methylierung der O6-Position von Guanin (O6-MeG; 5-6%), welche mittels MGMT repariert (wie unter 1.4.3 beschrieben) wird (Tisdale, 1987; Denny et al., 1994; Wedge et al., 1996; Zhang et al., 2012). Jedoch werden durch die TMZ-Gabe häufiger Methylierungen an der N7-Position von Guanin (N7-MeG; 70%)

sowie an der N3-Position von Adenin (N3-MeA; 9-10%) hervorgerufen (Denny et al., 1994; Tentori and Graziani, 2002; Drabløs et al., 2004). Diese beiden Methylierungsläsionen werden mittels BER repariert (Horton et al., 2003).

Bereits 1987 konnte gezeigt werden, dass TMZ eine breitgefächerte Antitumoraktivität in einer Vielzahl von murinen Tumormodellen hat (Stevens et al., 1987; Friedman et al., 2000). Spätere Studien in Xenograft Modellen von Tumoren des Zentralnervensystems zeigten, dass TMZ eine starke antineoplastische Aktivität gegen diese Tumore besitzt (Friedman et al., 1995). Heute wird TMZ in der Klinik bereits in Kombination mit anderen Behandlungsmethoden bei malignen Erkrankungen wie bei Patienten mit Glioblastom eingesetzt (Cohen et al., 2005). Die Glioblastom-Patienten, welche neben der Radiotherapie ergänzend TMZ erhalten, haben einen signifikanten Überlebensvorteil und die TMZ-Gabe geht mit einer minimalen zusätzlichen Toxizität einher (Stupp et al., 2005). Außerdem wurden erste Studien zur TMZ-Gabe bei Leukämien durchgeführt. TMZ zeigt eine hohe antileukämische Aktivität bei der Behandlung von Patienten, welche an einer akuten Leukämie erkrankt sind. Die TMZ-Behandlung ging mit einer guten Verträglichkeit einher (Seiter et al., 2002). Außerdem konnte in AML-Patienten gezeigt werden, dass durch vorherige Bestimmung des MGMT-Levels in den leukämischen Zellen der Ausgang der Therapie bestimmt werden kann (Brandwein et al., 2007). AML- und MDS-Patienten mit niedrigem MGMT-Level zeigen einen größeren Effekt der TMZ-Behandlung (Brandwein et al., 2014). Auch die Kombination von Veliparib mit TMZ zeigt eine vielversprechende Wirkung bei älteren Patienten mit myeloiden Leukämien (Singh et al., 2019). In vielen Studien wurde zudem beschrieben, dass TMZ von den Patienten gut vertragen wurde (Middleton et al., 2000; Seiter et al., 2002; Cohen et al., 2005; Brandwein et al., 2007). Die häufigsten Nebenwirkungen sind schwache bis mittelstarke Übelkeit und Erbrechen, welche aber gut kontrolliert werden können (Middleton et al., 2000). Ein weitere Vorteil ist, dass TMZ auch oral verabreicht werden kann und somit die Lebensqualität der Patienten verbessert wird (Plettenberg et al., 2000).

Bei der Behandlung von Patienten mit TMZ müssen viele Faktoren, welche zu einer geringeren Sensitivität gegenüber der TMZ-Behandlung führen, beachtet werden. Vor allem Veränderungen in DNA-Reparaturwegen spielen eine entscheidende Rolle bei der Sensitivität von Zellen gegenüber TMZ, darunter z.B. die Veränderung der *MGMT*-Expression in Krebszellen (Zhang et al., 2012). Eine höhere *MGMT*-Expression geht

mit einer geringeren Sensitivität gegen TMZ einher (Zhang et al., 2010; Zhang et al., 2012). Wohingegen Patienten mit geringer *MGMT*-Expression (*MGMT*-Promotor methyliert) ein gutes Ansprechen gegenüber TMZ zeigen (Watts et al., 1997; Esteller et al., 1999; Esteller et al., 2000; Hegi et al., 2005; Zhang et al., 2012). Einen weiteren Einfluss auf die Wirkung von TMZ hat die MMR. Eine funktionierende MMR wird für die erfolgreiche Behandlung mit TMZ benötigt. Der Verlust der MMR führt, durch die entstehende Toleranz gegenüber den Fehlpaarungen der O6-MeG-Läsionen mit Thymin, zu einer geringeren Sensitivität gegenüber TMZ (Casorelli et al., 2008; Zhang et al., 2012; Bueren et al., 2012) (Abb. 4). Zudem wurde gezeigt, dass der Verlust von MMR-Proteinen während der TMZ-Behandlung die Tumorprogression bei Glioblastomen fördert (Cahill et al., 2007; Hegi et al., 2008). Außerdem werden die durch TMZ hervorgerufenen N-Purin-Methylierungsläsionen (N7-MeG & N3-MeA), welche durch DNA-Glykosylasen und nicht durch *MGMT* erkannt werden, mittels BER repariert (Denny et al., 1994; Liu and Gerson, 2006; Zhang et al., 2012; Montaldi et al., 2015) (Abb. 4). Eine funktionierende BER leistet somit einen wesentlichen Beitrag zur zellulären Resistenz gegen TMZ (Trivedi et al., 2005; Zhang et al., 2012; Montaldi et al., 2015). Auf Grund der unterschiedlichen DNA-Reparaturwegen, welche bei der Sensitivität gegenüber TMZ beteiligt sind, gibt es mehrere Möglichkeiten einer TMZ-Resistenz entgegenzuwirken. Darunter die Inhibition von *MGMT* mittels O6-Benzylguanin (O6-BG) oder O6-(4-Bromothienyl)guanin (Lomeguatrib). Bei beiden Substanzen handelt es sich um Pseudosubstrate von *MGMT*, welche *MGMT* irreversibel inaktivieren und das Level an funktionsfähigem *MGMT* in den Zellen sinken lassen (Dolan et al., 1990; Ranson et al., 2006; Verbeek et al., 2008; Quinn et al., 2009; Zhang et al., 2012). Des Weiteren gibt es die Möglichkeit die BER zu inhibieren, z.B. mittels PARP-Inhibitoren (PARPi). O6-MeG kann weiterhin von *MGMT* repariert werden, aber durch die Inhibition der BER mittels PARPi tragen die N7-MeG- sowie N3-MeA-Läsionen hauptsächlich zur TMZ-Toxizität in den Zellen bei (Plummer et al., 2008; Zhang et al., 2012; Gojo et al., 2017; Singh et al., 2019) (Abb. 4).

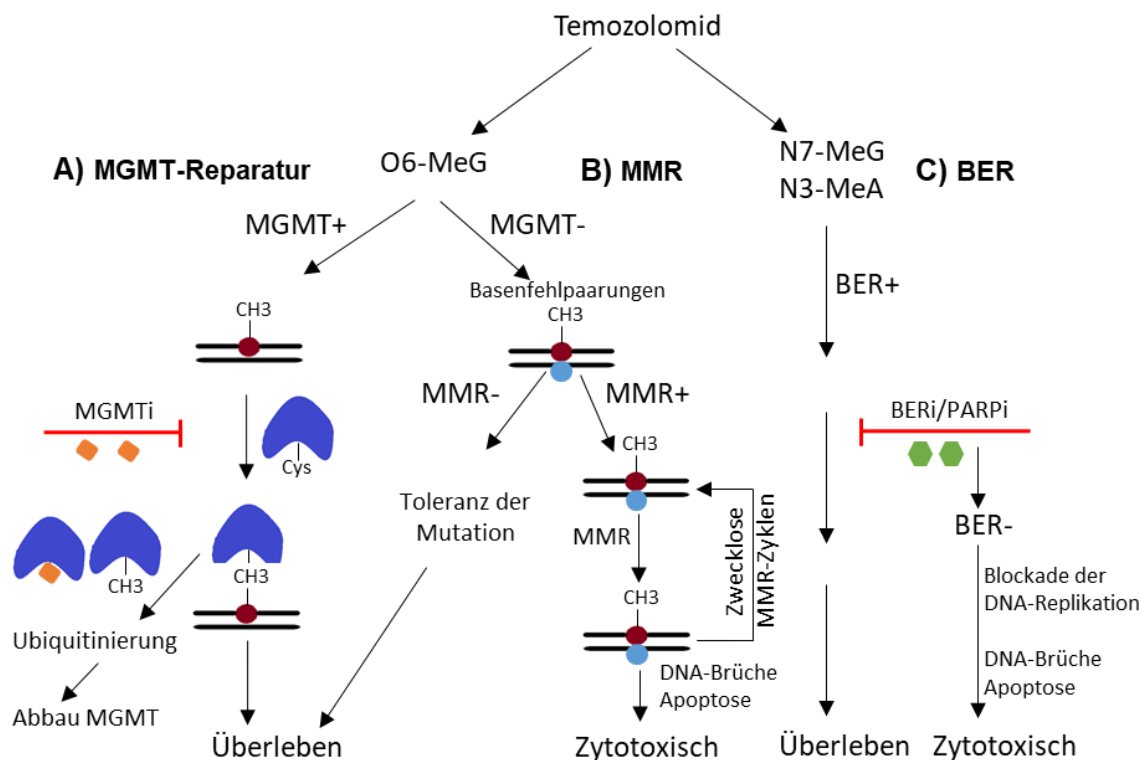


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Wirkungsmechanismus von Temozolomid

Bei der Reparatur der durch TMZ induzierten Methylierungsläsionen spielt **A)** die MGMT-vermittelte Reparatur, **B)** die MMR sowie **C)** die BER eine Rolle. MGMT: O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase; MMR: Mismatch-Reparatur; BER: Basenexzisionsreparatur. Verändert nach: (Liu and Gerson, 2006; Silber et al., 2012; Zhang et al., 2012).

1.4.4.2 PARP-Inhibitor -Olaparib-

PARP-Enzyme PARP1 und PARP2 spielen in mehreren DNA-Reparaturwegen eine Rolle (Parsons et al., 2005; Ciccia and Elledge, 2010; Lorenzo et al., 2013; Ronson et al., 2018; Hou et al., 2019). Es gibt viele PARPi, darunter Niraparib, Veliparib, Rucaparib sowie Olaparib (Hou et al., 2019). Die PARPi sind in den Fokus gerückt, da BRCA1 und BRCA2-defiziente Zellen, im Vergleich zu WT-Zellen, 57-fach bis hin zu 1.000-fach sensitiver auf PARPi reagieren (Bryant et al., 2005; Farmer et al., 2005; Tutt et al., 2010). Eine Erklärung hierfür ist, dass PARP1 und PARP2 unter anderem eine Rolle bei der BER sowie der Reparatur von SSB spielen (wie oben beschrieben) (Schreiber et al., 2002; El-Khamisy et al., 2003; Chatterjee and Walker, 2017; Ronson et al., 2018). Durch die Inhibition von vor allem PARP1 und PARP2 wird somit auch die Reparatur von Einzelstrang-Schäden inhibiert. Durch die Reparatur-Defizienz bzw. die nicht reparierten SSB kommt es zu DSB in der DNA. Die Mutationen in BRCA1 und BRCA2 führen in den Zellen zu einer verminderten Reparatur von DSB durch die HR und das NHEJ kann die Defizite der HR nur zu einem geringen Teil ausgleichen. Auf

Grund der nur bedingten Reparatur der DSB und die Inhibition von PARP, welches zusätzlich zu DSB in den Zellen führt, kommt es schließlich durch „synthetische Letalität“ zum Zellzyklusstillstand und/oder Zelltod (Farmer et al., 2005; Ashworth, 2008; Lorenzo et al., 2013; Guo et al., 2018; Hou et al., 2019). Es gibt jedoch noch weitere Erklärungen für die sensitive Wirkung von HR-defizienten Zelle gegenüber der Behandlung mit PARPi (Lorenzo et al., 2013).

Ein PARPi, welcher als erster seiner Klasse von der Behörde für Lebens- und Arzneimittel (FDA) zugelassen wurde, ist Olaparib (Hou et al., 2019). Olaparib wird vor allem bei der Behandlung von soliden Tumoren eingesetzt (Kurnit et al., 2018; Guo et al., 2018; Minten and Yu, 2019). Das Medikament inhibiert sowohl PARP1 als auch PARP2 (Gunderson and Moore, 2015; Hou et al., 2019). Olaparib wird in der Klinik bereits bei Brustkrebs und Eierstockkrebs genutzt und hierbei bevorzugt bei Tumoren mit BRCA1- oder BRCA2-Mutationen eingesetzt (Robson et al., 2017; Pujade-Lauraine et al., 2017; Minten and Yu, 2019). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von leukämischen Blasten mit Olaparib einen apoptotischen sowie antiproliferativen Effekt auf leukämische Zellen hat (Faraoni et al., 2015; Esposito et al., 2015). Dabei ist vermutlich entscheidend, dass die leukämischen Blasten niedrige BRCA1- und/oder BRCA2-Level haben. Normale Knochenmarkzellen oder CD34⁺-Zellen im peripheren Blut zeigten kaum einen Effekt nach der Behandlung mit Olaparib (Faraoni et al., 2015). Außerdem haben Mutationen bzw. ein Mangel an ATM positive Auswirkungen auf die Behandlung mit Olaparib bei z.B. Lungenkarzinomen oder chronisch lymphatischen Leukämien (Schmitt et al., 2017; Knittel et al., 2017). Daraus geht hervor, dass PARPi und darunter auch Olaparib eine synthetische Letalität auf Zellen im Zusammenhang mit anderen Mutationen (wie BRCA1/2 und ATM) besitzen (Guo et al., 2018; Minten and Yu, 2019; Hou et al., 2019). PARPi und darunter auch Olaparib zeigen einen synergistischen Effekt in Kombination mit z.B. Temozolomid (siehe 1.4.4.1) oder Topoisomerase 1-Inhibitoren (Patel et al., 2012; Murai et al., 2014; Singh et al., 2019; Farago et al., 2019). Ein Problem bei der Behandlung mit Olaparib ist, dass die Patienten ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung von hämatopoetischen Erkrankungen haben, wie Anämien, Thrombozytopenien sowie Neutropenien. Des Weiteren kann es zu gastrointestinalen Symptome (wie Übelkeit, Erbrechen, Diarrhö) oder Fatigue kommen (Zhou et al., 2017; Guo et al., 2018).

2 Zielsetzung der Arbeit

Die AML ist die häufigste Form der akuten Leukämie bei Erwachsenen (Ehninger and Aul, 2008). Die AML-Inzidenz nimmt mit dem Alter zu. Auch das Fünfjahresüberleben hängt stark vom Alter der Patienten ab und ist bei älteren Patienten deutlich niedriger (Kraywinkel and Spix, 2017). Ein Grund hierfür ist, dass ältere Patienten weniger in der Lage sind, aggressive Therapien zu überstehen (Smith et al., 2004). Die derzeit in der Klinik verwendeten Therapieansätze sind trotz vielzähliger Studien sehr aggressiv und deshalb für ältere Patienten mit vielen risikoreichen Nebenwirkungen verbunden (Smith et al., 2004; Ehninger and Aul, 2008). Deshalb ist es wichtig, neue Ziele und mildere Therapieansätze zur Behandlung der AML zu finden. In den letzten Jahren ist die personalisierte Krebsmedizin immer wichtiger geworden und in den Fokus der Forschung und bei der Behandlung von Patienten gerückt (Jackson and Chester, 2015). Eine Zielstruktur bei der personalisierten Behandlung von AML-Patienten könnte die *GFI1*-Variante, *GFI1-36N* darstellen. *GFI1-36N* spielt bei der Entstehung der AML eine Rolle und Patienten mit dieser *GFI1*-Variante haben eine schlechtere Prognose als Patienten mit *GFI1-36S*-Genotyp (Khandanpour et al., 2010; Botezatu et al., 2016a). Dennoch ist trotz zahlreicher Untersuchungen noch nicht vollständig geklärt, warum das Vorhandensein von *GFI1-36N* mit einer prädisponierten AML-Entstehung einhergeht. Es gibt erste Hinweise, dass epigenetische Veränderungen hierbei eine Rolle spielen (Botezatu et al., 2016b). Auf Grund weiterer Daten wird jedoch vermutet, dass *GFI1* auch eine Rolle bei der DNA-Reparatur spielt (Khandanpour et al., 2013; Botezatu et al., 2016b) und dadurch evtl. auch die genomische Stabilität in den Zellen beeinflusst. Eine wichtige Eigenschaft bei der Entstehung von Leukämien ist die genomische Instabilität und es konnte gezeigt werden, dass Veränderungen in der DNA-Reparatur die Entstehung einer AML fördern (Esposito and So, 2014; Bret et al., 2016). Deshalb könnte eine genomische Instabilität sowie Defizite in der DNA-Reparatur eine Erklärung für die prädisponierende Rolle von *GFI1-36N* in der AML-Entstehung sein.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die genaue Rolle von niedrigen *GFI1*-Leveln und insbesondere dem Vorhandensein der *GFI1-36N*-Variante in leukämischen und nicht-leukämischen Zellen hinsichtlich DNA-Reparatur und genomischer Stabilität zu analysieren und dadurch eine mögliche zielgerichtete Therapie von AML-Patienten mit *GFI1-36N*-Genotyp zu finden.

In dieser Studie galt es daher folgende Fragen zu beantworten:

- ➔ Hat die Präsenz des *GF11-36N*-Genotyps einen Einfluss auf die Genomstabilität?
- ➔ Spielt GF11 eine Rolle bei der DNA-Reparatur und hat die GF11-Variante, GF11-36N, einen Einfluss auf die DNA-Reparatur?
- ➔ Können die Proteine bzw. Signalwege, welche durch die Präsenz von *GF11-36N* verändert sind, neue Ziele bei der personalisierten AML-Therapie sein?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verbrauchsmaterial

Tabelle 1: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Kat.-Nr.	Firma
10 µl TipOne® Filterpipettenspitzen	S1121-3810	STARLAB GmbH
10 µl TipOne® Pipettenspitzen	S1111-3800	STARLAB GmbH
100 µl TipOne® Pipettenspitzen	S1183-1840	STARLAB GmbH
100 µl TipOne® UltraPoint Filterpipettenspitzen	S1123-1840	STARLAB GmbH
1000 µl TipOne® Filterpipettenspitzen	S1126-7810	STARLAB GmbH
1000 µl TipOne® Pipettenspitzen	S1111-6800	STARLAB GmbH
15 mL PP Centrifuge Tubes	430791	Corning
200 µl TipOne® Filterpipettenspitzen	S1120-8810	STARLAB GmbH
200 µl TipOne® UltraPoint Pipettenspitzen,	S1113-1800	STARLAB GmbH
24-well Flat Bottom Not Treated Cell Culture Plate	351147	Corning
48-well Flat Bottom Not Treated Cell Culture Plate	351178	Corning
50 mL PP Centrifuge Tubes	430291	Corning
BD Discardit™ II Spritzen 20 ml	300296	Becton Dickinson
BD Discardit™ II Spritzen 5 ml	309050	Becton Dickinson
BD Discardit™ II Spritzen 10 ml	309110	Becton Dickinson
BD MicroFine™+ Insulin Syringes	324824	Becton Dickinson
BD Microlance 3 Kanüle 20 G	301300	Becton Dickinson
BD Microlance 3 Kanüle 25 G	300400	Becton Dickinson
BD Microlance 3 Kanüle 27G	302200	Becton Dickinson
BD Plastipak Insulinspritzen ohne Kanüle 1 ml	303173	Becton Dickinson
BD Plastipak™ Spritze mit Luer-Ansatz, 1ml	300013	Becton Dickinson
Blunt-End Needles, 16 Gauge	28110	STEMCELL Technologies
Cell strainers 40 µm Filter (Falcon)	352340	Corning
Cell strainers, 100 µm Filter (Falcon)	352360	Corning
cellTrics Einwegfilter 100 µm	04-00422318	Systemex
Deckgläser, Stärke 1	BB02200500A113MN T0	Thermo Fisher Scientific
Deckgläser	Z692263-100EA	Sigma-Aldrich
CryoPure Tube 1.6ml white	72.380	Sarstedt
Cytospin slide	27157	Thermo Fisher Scientific
DNA LoBind Tubes, 1,5ml	30108051	Eppendorf
FACS-Reaktionsgefäße 5-ml	352052	Falcon
Falcon® 100 µm Cell Strainer	352360	Corning
Immobilon-E PVDF Membrane	IEVH00005	Merck Millipore
ImmunoSelect Adhesion Slides	SQ-IS-10050	Squarix biotechnology
LS Columns	130-042-401	Miltenyi Biotec

MicroAmp™ Optical Adhesive Film	4311971	Thermo Fisher Scientific
Microamp™ Schnelle, optische 96-Well-Reaktionsmikrotiterplatte	4346907	Applied Biosystems
MiniCollect® RÖHRCHEN 0,25/0,5 ml K3E K3EDTA	450530	Greiner Bio-One
Mini-Collect-blood collection tubes, K3EDTA	450476	Greiner Bio-One
Adhäsions-Objektträger SuperFrost® plus	03-0060	R. Langenbrinck
Pre-Separation Filters (30 µm)	130-041-407	Miltenyi Biotec
Probenröhre 75 x 12 mm	551.579	Sarstedt
Reagiergefäß PCR 0,2ml PP	683201	Greiner Bio-One
Röhre 15ml V-Boden PP	62554502	Sarstedt
Röhre 50ml V-Boden PP	62547254	Sarstedt
SafeSeal Reagiergefäß 1,5 ml	72706	Sarstedt
Spritzenvorsatzfilter 0,2 µm	83.1826.001	Sarstedt
Spritzenvorsatzfilter 0,45µm	83.1826	Sarstedt
STEMgrid™-6	27000	STEMCELL Technologies
Stripette™ Serological Pipets 10 ml	4488	Corning
Stripette™ Serological Pipets 25 ml	4489	Corning
Stripette™ Serological Pipets 50 ml	4490	Corning
Stripette™ Serological Pipets. 5 ml	4487	Corning
Super PAP Pen Liquid Blocker Mini	N71312	Science Services
SuperFrost Ultra Plus™ GOLD Adhäsionsobjektträger	11976299	Thermo Fisher Scientific
Western Blotting Filter Paper, 7 cm x 8.4 cm	84783	Thermo Fisher Scientific
Zellkultur Microplatte, 96 Well,TC	655180	Greiner Bio-One
Zellkultur Multiwellplatte, 12 Well PS steril TC	665180	Greiner Bio-One
Zellkultur Multiwellplatte, 24 Well TC	662160	Greiner Bio-One
Zellkultur Multiwellplatte, 48 Well, TC	677180	Greiner Bio-One
Zellkultur Multiwellplatte, 6 Well, TC	657160	Greiner Bio-One
Zellkultur Schale, PS, 100/20 MM	664160	Greiner Bio-One
Zellkultur Schale, PS, 145/20 MM	639160	Greiner Bio-One
Zellkulturflasche 175 cm² steril	660175	Greiner Bio-One
Zellkulturflasche 75 cm² steril	658175	Greiner Bio-One
Zellkulturflasche.25 cm² steril	690175	Greiner Bio-One

3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2: Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Kat.-Nr.	Firma
100 bp DNA Ladder	N3231L	New England Biolabs
1M HEPES	15630080	Thermo Fisher Scientific
25mM MgCl ₂	A3511	Promega
2-Hydroxyethylagarose	A-4018-1G	Sigma-Aldrich
5X Green GoTaq® Reaction Flexi Buffer	M891A	Promega
Agarose	16500-500	Invitrogen
Agarose	1138899101	Roche
Albumin Fraktion V	8076.2	Carl Roth
Ampicillin Sodium Salt	A9518	Sigma-Aldrich
Annexin V Binding Buffer	556454	BD Biosciences
Aqua ad iniectabilia 10 ml miniplasco	1001346	B Braun
Aqua B. Braun	0082423E	B Braun
Baytril 10%	PZN-05978897	Bayer
Benzonase® Nuclease	70746-3	Merck Millipore
BSA Fraction V	K41-001	PAA Laboratories
Colcemid	295892	Roche
COULTER CLENZ® Cleaning Agent	8448222	Beckman Coulter
COULTER® Z1 & Z2 Balanced electrolyte solution	8320312	Beckman Coulter
DAPI	32670	Sigma-Aldrich
Deionisiertes Formamid	9342	Merck Millipore
Dextran Sulfat	S4030	Thermo Fisher Scientific
Dimethylsulfoxide (DMSO) for cell culture	P60-36720100	PAN Biotech
dNTP Mix	U1511	Promega
DPBS	14190	Gibco
EDTA	E9884	Sigma-Aldrich
Essigsäure	A0820	AppliChem
Ethanol	32205	Sigma-Aldrich
Ethanol, 96%, 2,5l, Kunststoff	P075.4	Carl Roth
Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate	E5134	Sigma-Aldrich
FACS Clean	340345	BD Biosciences
FACS Flow	10638814	BD Biosciences
FACS Rinse	340346	BD Biosciences
FCS	P30-3702	PAN Biotech
Fluorescence Mounting Medium	S302380-2	Agilent Technologies
Formaldehyde	F8775	Sigma-Aldrich
Gelantine	48723	Sigma-Aldrich
GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	SM1331	Thermo Fisher Scientific
Glycerol	G5516	Sigma-Aldrich
Glycine	3790.2	Carl Roth
GoTaq® Hot Start Polymerase	M5005	Promega

Halt™ Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-Free (100X)	78437	Thermo Fisher Scientific
HCl	Z00206816	Merck Millipore
IGEPAL® CA-630	I8896-50ML	Sigma-Aldrich
Kanamycin	K1377-1G	Sigma-Aldrich
KCl	P9541	Sigma-Aldrich
LB Broth	L3022	Sigma-Aldrich
LB Broth Agar	L2897	Sigma-Aldrich
LB-Medium	X968.2	Carl Roth
Leupeptin	L2884-.5MG	Sigma-Aldrich
Lipofectamine 2000 Transfection Reagent	11668030	Invitrogen
Liquid Blocker Pen	N71312	Sigma-Aldrich
low-gelling-temperature Agarose	A4018	Sigma-Aldrich
Lumi-Light Western Blotting Substrate	12015200001	Roche
Luna® Universal qPCR Master Mix	M3003S	New England Biolabs
Magnesium chloride solution	68475-100ML-F	Sigma-Aldrich
Methanol	322415	Sigma-Aldrich
MgCl ₂	M8266	Sigma-Aldrich
Milchpulver	T145.2	Carl Roth
Mouse IL-3	130-096-687	Miltenyi Biotec
Mouse IL-6	130-094-065	Miltenyi Biotec
Mouse SCF	130-101-741	Miltenyi Biotec
Mowiol 4-88	81381	Sigma-Aldrich
Na ₂ EDTA	E5134	Sigma-Aldrich
NaCl	1064040500	Merck Millipore
NaOH Lösung 1M	596470	Merck Millipore
NaOH Pulver	S3014	Sigma-Aldrich
Natriumbutyrat	303410	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	9265.1	Carl Roth
N-Lauryl Sarcosin Natriumsalz	L5125	Sigma-Aldrich
Nuclease-Free Water (not DEPC-Treated)	AM9938	Thermo Fisher Scientific
NuPAGE Antioxidant	NP0005	Invitrogen
NuPAGE LDS Sample Buffer 4x	NP0007	Invitrogen
NuPAGE™ Sample Reducing Agent (10X)	NP0009	Invitrogen
Olaparib	S1060	Selleck Chemicals
One Shot™ TOP10 chemisch kompetente E. coli	C404010	Invitrogen
PageRuler Prest Protein Ladder	26616	Thermo Fisher Scientific
Paraformaldehyd	158127	Sigma-Aldrich
Penicillin-Streptomycin	P4333	Sigma-Aldrich
Pepsin	P6887	Sigma-Aldrich
Pepsin	107192	Sigma-Aldrich
Pharm Lyse	555899	BD Biosciences
PhosSTOP™	4906845001	Sigma-Aldrich
PMSF Protease Inhibitor	36978	Thermo Fisher Scientific
Polybrene Infection/Transfection Reagent	TR-1003-G	Merck Millipore

Polyethylenimin (PEI)	408727	Sigma-Aldrich
PromoFluor Antifade Reagent	PK-PF-AFR1	Promocell
Propidium Iodid	P-4170	Sigma-Aldrich
Propidium Iodide Staining Solution	51-66211E	BD Biosciences
Proteinase K	1008236	Carl Roth
Proteinase K	17916	Thermo Fisher Scientific
Quick-Load Purple 100 bp DNA Ladder	N0551L	New England Biolabs
Radiance Plus	512103	Azure Biosystems
Retronectin	T100A	Takara Bio
RetroNectin	T100B	Takara Bio
RNase-Free DNase Set	79254	Qiagen
ROTI®GelStain	3865.1	Carl Roth
Rotiphorese Gel (Acrylamide/Bis-acrylamide)	T802.1	Carl Roth
RT ² SYBR Green ROX qPCR Mastermix (6)	330524	Qiagen
Salzsäure 32 %	X896.1	Carl Roth
SDS Pellets, 250 g	CN30.1	Carl Roth
SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard	LC-5925	Thermo Fisher Scientific
SeeBlue™ Plus2 Pre-stained Protein Standard	LC5925	Invitrogen
SkyPaint™ DNA Kit M-10 for Mouse Chromosomes	FPRPR0030	Applied Spectral Imaging
SSC	S6639	Sigma-Aldrich
Steriles destilliertes Wasser	123	B Braun
Sucrose	S9378-500G	Sigma-Aldrich
TaqMan Gene Expression Master Mix	4369016	Applied Biosystem
TaqMan™ Gene Expression Master Mix	4369016	Applied Biosystem
TaqMan™ Genotyping Master Mix	4371353	Thermo Fischer Scientific
TEMED	2367.3	Carl Roth
Temozolomid	T2577	Sigma-Aldrich
Thimerosal	T5125	Sigma- Aldrich
Tris	5429.5	Carl Roth
TrisCl	T1503	Sigma-Aldrich
Triton X-100	X100	Sigma-Aldrich
Trypanblau	T8154	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA (0.25 %), Phenolrot	25200072	Gibco
Tween-20	P9416	Sigma-Aldrich
β-Mecaptoethanol	M3148	Sigma-Aldrich

3.1.3 Puffer und Medien

Tabelle 3: Liste und Zusammensetzung der verwendeten Puffer

Name	Zusammensetzung	Methode
10x TBS-Puffer	1 l H ₂ O + 24,23 g Tris (200 mM) + 87,66 g NaCl (1,5 M) pH: 7,4	Western Blot
10x TG-Puffer	1 l H ₂ O + 30 g Tris + 144 g Glycine + 10 g SDS	Western Blot
1x SDS-Runningpuffer	200 ml 5x SDS-Runningpuffer + 800 ml dest. H ₂ O	Western Blot
1x TBS-T-Puffer	100 ml 10x TBS-Puffer + 900 ml dest. H ₂ O + 1 ml Tween- 20	Western Blot
1x TG-Puffer	200 ml abs. Ethanol + 100 ml 10x TG-Puffer + 700 ml dest. H ₂ O	Western Blot
5% Milch	2,5 g Milchpulver in 1x TBS-T Puffer	Western Blot
50x TAE Puffer	2,0 M Tris + 0,05 M Na ₂ EDTA + 1,0 M Essigsäure pH: 8,3	Gelelektrophorese
5x SDS-Runningpuffer	1 l dest. H ₂ O + 15,1 g Tris (125 mM) + 72 g Glycin + 25 ml 20%iges SDS	Western Blot
A1 Lyse-Puffer	1,2 M NaCl + 0,1 % Natriumlauroylsarkosinat + 0,26 M NaOH in dest. H ₂ O pH >13	Comet-Assay
A2-Puffer	0,03 M NaOH + 2 mM Na ₂ EDTA in dest H ₂ O pH: ca. 12,3	Comet-Assay
Alkali-Lösung	70 mM NaOH + 140 mM NaCl in H ₂ O, dann 60:40 mit Methanol mischen	MGMT funktioneller-Assay
1x Annexin-Binding Puffer	Annexin V Binding Buffer (10x) 1:10 in PBS verdünnen	FACS Färbung
Einfrriermedium	IMDM + 20% FBS + 10% DMSO	Einfrieren von Zellen
Erylyse-Puffer	BD Pharm Lyse (10x) 1:10 in sterilem H ₂ O verdünnen	Vorbereitung primäre Mauszellen
FACS-Puffer	PBS + 2,5 % FBS +1% P/S	Allgemein
Glycin-Lösung	0,2% Glycin in PBS	MGMT funktioneller-Assay
HBS-Puffer	1,4 mM Na ₂ HPO ₄ + 42 mM Hepes + 10mM KCl + 274 mM NaCl + 11 mM Glucose in H ₂ O pH: 7,05	Virusherstellung
Lysepuffer	Lysepuffer/Stocklösung 1:10 mit DNA-freies H ₂ O	Genotypisierung Mäuse
Lysepuffer/ Stocklösung	100 ml DNA-freies H ₂ O+ 100 mM Tris-HCl + 500 mM KCl + 20 mM MgCl ₂ + 0,01% Gelantine + 0,45% Tween-20 + 0.45 NP-40 + 500 µg/ml Proteinase K pH:8,2 - 8,3	Genotypisierung Mäuse
MACS-Puffer	PBS + 0,5% BSA + 2 mM EDTA	Isolation Lin-Zellen

PBG-Lösung	0,2% Gelantine + 0,5% BSA fractionV	yH2AX-Assay
PBS-T	0,25% Tween-20 in PBS	MGMT funktioneller-Assay
Pepsin-Lösung		MGMT funktioneller-Assay
PFA-Lösung	3% PFA + 2 % Sucrose in PBS	yH2AX-Assay
P-Lösung	100 mM Tris (ph:7,4) + 50 mM EDTA + 0,5 % Triton X-100	yH2AX-Assay
Proteinase K-Lösung	400 µl Proteinase K (1mg/ml) + 600 µl Proteinase K-Puffer	MGMT funktioneller-Assay
Proteinase K-Puffer	20 mM Tris + 2 mM CaCl ₂ in H ₂ O pH: 7,5	MGMT funktioneller-Assay
RIPA-Puffer	50 mM Tris (pH:8) + 150 mM NaCl + 1% NP-40 + 0,5 % Natriumdesoxychololat + 0,1% SDS in H ₂ O	Protein-Isolation
RLT-Puffer	1 ml RLT-Puffer (Qiagen) + 10 µl β-Mecaptoethanol	RNA-Isolation
S.O.C. Medium	500 ml H ₂ O + 2,5 g Yeast Extract + 0,25 g NaCl -> autoklavieren und dann Zugabe von 1,25 ml 1 M KCl + 5 ml 1 M MgCl ₂ .6H ₂ O + 3,6 ml 50 % Glucoselösung	Transformation
Sammelpuffer	250 ml dest. H ₂ O + 15,15 g Tris (32 mM) + 5 ml 20%iges SDS pH: 6,8	SDS-Gel
SCM (Stammzellmedium)	IMDM + 20% FBS + 1% P/S + 10 ng/ml IL-3 + 10 ng/ml Il-6 + 20 ng/ml mSCF	Kultivieren von primären Zellen
Trennpuffer	500 ml dest. H ₂ O + 90,9 g Tris (375 mM)+ 10 ml 20%iges SDS pH: 8,8	SDS-Gel

Tabelle 4: Liste der verwendeten Medien

Medium	Kat.-Nr.	Firma
DMEM Media high glucose	41965-039	Gibco
IMDM	1023936	Gibco
MethoCult™ H4434 Classic	4434	StemCell Technologies
MethoCult™ GF M3434	3434	StemCell Technologies
Opti-MEM® I Reduced Serum Medium	31985062	Thermo Fisher Scientific

3.1.4 Kits

Tabelle 5: Liste der verwendeten Kits

Bezeichnung	Kat.-Nr.	Firma
Homologous Recombination Assay Kit	35600-NB	Norgen Biotek
Lineage Cell Depletion Kit, mouse	1012358	Miltenyi Biotec
Methylamp DNA Modification Kit	P-1001-1	EpiGentek
MTT Assay Kit (Cell Proliferation)	ab211091	Abcam
NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents	78833	Thermo Fisher Scientific
NucleoBond PC 500 (25)	740574.25	Macherey-Nagel
Pierce BCA Protein Assay Kit	23225	Thermo Fisher Scientific
Pierce™ Classic Magnetic IP/Co-IP Kit	88804	Thermo Fisher Scientific
PureLink™ Genomic DNA Mini Kit	K182001	Thermo Fisher Scientific
Rneasy Micro Kit	74004	Qiagen
Rneasy Mini Kit	74104	Qiagen
RT2 First Strand Kit	330401	Qiagen
RT ² Profiler™ PCR Array Mouse DNA Damage Signaling Pathway	PAMM-029ZC-6	Qiagen

3.1.5 Antikörper

Tabelle 6: Liste der verwendeten Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Konjugat	Kat.-Nr.	Firma
Annexin V	APC	640920	BioLegend
Annexin V	PerCP	640936	BioLegend
anti-mouse CD117 (c-kit) Antibody	PE	135106	BioLegend
anti-mouse CD117 (c-Kit) Antibody	APC	105811	BioLegend
anti-mouse CD4 Antibody	PerCP	100433	BioLegend
anti-mouse CD8a Antibody	PE	100708	BioLegend
anti-mouse CD8a Antibody	APC	100711	BioLegend
anti-mouse Ly-6G/Ly-6C (Gr-1) Antibody	PerCP	108427	BioLegend
anti-mouse Ly-6G/Ly-6C (Gr-1) Antibody	PE	108408	BioLegend
anti-mouse Ly-6G/Ly-6C (Gr-1) Antibody	APC	108411	BioLegend
anti-mouse TER-119/Erythroid Cells Antibody	PE	116208	BioLegend
anti-mouse TER-119/Erythroid Cells Antibody	APC	116211	BioLegend
anti-mouse/human CD11b Antibody	PerCP	101228	BioLegend
anti-mouse/human CD11b Antibody	APC	101211	BioLegend
anti-mouse/human CD45R/B220 Antibody	PerCP	103234	BioLegend
Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block™)	-	553141	BD Pharmingen™

Tabelle 7: Liste der verwendeten Antikörper für Western Blot und Immunfluoreszenz

Antikörper	Kat.-Nr.	Verdünnung	Firma
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	A-11001	1:400	Thermo Fisher Scientific
Anti-gamma H2A.X (phospho S140) antibody	ab225511	1:300	Abcam
Anti-mouse (goat) IgG HRP	sc-2005	1:2000	Santa Cruz
Anti-Mouse IgG	A9044	1:5000	Sigma-Aldrich
Anti-VCP antibody	ab11433	1:2000	Abcam
Cy™3 AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG	115-165-166	1:800	Jackson ImmunoResearch Laboratories
donkey anti-goat IgG-HRP	sc-2020	1:5000	Santa Cruz
GFI-1 Antibody	AF3540	1:2000	R&D Systems
IgG from goat serum	I5256	2-5 µg	Sigma-Aldrich
IgG from mouse serum	I5381	2-5 µg	Sigma-Aldrich
Lamin B1 (B-10)	sc-374015	1:1000	Santa Cruz
mAb to O6-methyl-2-deoxyguanosine (EM 2-3)	SQM003.1	1:15.000 (0,067 µg/ml)	Squarix
MGMT Antibody (D-4)	sc-166527	1:500	Santa Cruz
mouse anti-goat IgG-HRP	sc-2354	1:5000	Santa Cruz
mouse anti-rabbit IgG-HRP	sc-2357	1:2000	Santa Cruz

3.1.6 Primer

Tabelle 8: Liste der verwendeten TaqMan-Primer

Gen	Primer ID	Firma
HPRT (Maus)	Mm03024075_m1	Life Technologies
MGMT (Maus)	Mm00485014_m1	Life Technologies
SNP Genotyping Assay, SNP ID: rs34631763	C__25596143_10	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 9: Liste der verwendeten PCR-Primer

Name	Sequenz (5'-3')	Funktion	Quelle
8477	TGGAGGGCCTCTTGGTACAGG	Genotypisierung Vav- Nup98/Hoxd13	(Lin et al., 2005; Chung et al., 2008)
8478	GGCTTCTAAGCTGTCTGTGGCC	Genotypisierung Vav- Nup98/Hoxd13	(Lin et al., 2005; Chung et al., 2008)
mGfi21	CTTGTGGCAGAGTTCTGGAG	Genotypisierung GFI-36S,-36N,- KD	(Khandanpour et al., 2012)
mGfi28	CTTGTTTGAAGTATTCAGGTCTG	Genotypisierung GFI-36S,-36N,- KD	(Khandanpour et al., 2012)

mGfi32	GCACACATTCCCAACTAATCC	Genotypisierung GFI-36S,-36N,- KD	(Khandanpour et al., 2012)
metylierte DNA (R)	CAAACGCGTACACGAAATAAAAACGAAA	Bisulfit-PCR	(Yamada et al., 2001)
metylierte DNA (F)	GGTAGTTTTAGAGTTACGTTTCGCGT	Bisulfit-PCR	(Yamada et al., 2001)
Nicht metyliert DNA (F)	TTTGGTAGTTTTAGAGTTATGTTTTGTGT	Bisulfit-PCR	(Yamada et al., 2001)
Nicht metyliert DNA (R)	CCACAAACACATACACAAAATAAAAACAAAA	Bisulfit-PCR	(Yamada et al., 2001)
mRag1.1	GCTGATGGGAAGTCAAGCGAC	Genotypisierung	(Vassen et al., 2014)
mRag1.3	GGGAAGTCTGAACTTTCTGTG	Genotypisierung	(Vassen et al., 2014)
neo1500	ATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAG	Genotypisierung GFI-36S,-36N,- KD	(Takeda et al., 1997; Khandanpour et al., 2012)
unverändert DNA (R)	GTGCACGGGGTGGGGGCGGGG	Bisulfit-PCR	(Yamada et al., 2001)
Nicht veränderte DNA (F)	CTCCCAGAGCCACGCCCCGCGT	Bisulfit-PCR	(Yamada et al., 2001)

3.1.7 Geräte

Tabelle 10: Liste der verwendeten Geräte

Instrument	Firma
Amersham Imager 600	GE Healthcare LifeSciences
Animal Blood Counter	scil Vet abc
Attune NxT	Invitrogen
Axio (Vert. A1)	Zeiss
Axiostar plus	Zeiss
Cat-ST5	Cat
Cytospin 2	Shandon
Dry Bath System	StarLab
EG 2200-2NM	Kern & Sohn Gmbh
Elektrophorese Sub-Cell GT	Bio-RAD
FACSAria II	BD Biosciences
FACSAria III Cell Sorter	BD Biosciences
FACScan	BD Becton Dickinson
FACSDiva	BD Biosciences
Faxitron CP-160	Faxitron
Foam Pads for Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad
Gel iX20 Imager	INTAS Science Imaging

Heracell 150i CO ₂ Incubator	Thermo Fisher Scientific
HERASafe	Kendro Laboratory
HiSeq 2000/2500	Illumina
iMark Microplate reader	Bio-Rad
KNF Laboport® mini-pump	Sigma-Aldrich
LSM710 Konfokalmikroskop	Zeiss
LSR II	BD Becton Dickinson
Mastercycler Nexus eco	Eppendorf
Mettler Toledo FiveEasy™ Plus pH / mV bench meter	Sigma-Aldrich
Mikroskop Leica Typ 11090137002	Leica
Mini Gel Holder Cassette	Bio-Rad
Mini Trans-Blot Central Core	Bio-Rad
Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad
Mini-PROTEAN Tetra Cell Casting Stand & Clamps	Bio-Rad
CoolCell	BioCision
Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Thermo Scientific™
Multifuge X3R centrifuge	Thermo Fisher Scientific
MultiRad 225	Precision X-Ray
Nanophotometer P330	Implen
NextSeq500	Illumina
Pipetten 1000 µl, 200 µl , 100 µl , 20 µl and 10 µl	Eppendorf
Pipetten 1000 µl, 200 µl , 100 µl , 20 µl and 10 µl	StarLab
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
PowerPac™ HC High-Current Power Supply	Bio-Rad
RH basic 2	IKA
ROCKY 3D	Fröbel Labortechnik
Rollenmischer RM 5 (348)	Hecht Assistent
Rotana 460R	Hettich Zentrifugen
Rotator SB3	Stuart
Sigma Laborzentrifuge 2K15	Sigma
Spectrophotometer ND-100	NanoDrop Technologies
Sprout® Mini Centrifuge	Heathrow Scientific
StepOne Plus Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Sysmex XE-2100	Sysmex Europe GmbH
Thermomixer compact	Eppendorf
Unimax 1010 Inkubator 1000	Heidolph
Victor X3 Multimode Plate Reader	Perkin Elmer
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Waage ALJ 220-4NM	Kern & Sohn GmbH
Waage EW 4200-2NM	Kern & Sohn GmbH
Wasserbad GFL 1083	GFL
XE 2100	Sysmex
XN 1000	Sysmex
X-Ray System X-RAD320	Precision X-Ray
Z2 Coulter Particle and size analyzer	Beckman Coulter
Zählkammer nach Neubauer	Assistent
Zeiss AxioObserver.Z1 and Apotome	Zeiss
Zeiss ELYRA PS.1 Super-Resolution Mikroskop	Zeiss

Zentrifuge 4K15	Sigma Laboratory Centrifuges
Zentrifuge 5415D	Eppendorf
Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge Allegra 6KR	Beckman Coulter
Zentrifuge Allegra RX-15R	Beckman Coulter
Zentrifuge Allegra X-15R	Beckman Coulter
Zentrifuge Mikro 200R	Hettich Zentrifugen
Zentrifuge Rotanta 460R	Hettich Zentrifuge

3.1.8 Software

Tabelle 11: Liste der verwendeten Programme

Software	Firma oder Quelle
ACAS II	Ahrens Electronics, Bargteheide
Attune Nxt Software v.3.1.2	Thermo Fisher Scientific
AxioVision SE64 Rel 4.8	Zeiss
BD Diva	BD Biosciences
CaspLab	CaspLab.com
ClueGO & CluePedia Plug-in von Cytoscape	(Bindea et al., 2009; Bindea et al., 2013)
CODEX	(Sánchez-Castillo et al., 2015)
Cytoscape	(Shannon et al., 2003)
DEGseq2	(Love et al., 2014)
FACSDiva Software Version 6.1.3	BD Biosciences
FlowJo-Software	Miltenyi Biotec
GeneGlobe Data Analysis Center	Qiagen
GraphPad Prism 6	GraphPad Software
GSEA/MSigDB Version: 7.1	Broad Institute, Inc
Image J/ Fiji	(Schindelin et al., 2012)
Imaris	Oxford Instruments Group
Intas GDS Science Imaging	Intas
Microplate Manager 6 Software	Biorad
Microsoft Office	Microsoft
NanoDrop-1000 v3.8.1	ThermoFisher Scientific
OpenComet	(Gyori et al., 2014)
Perkin Elmer 2030 Manager	Perkin Elmer
Reactome	(Fabregat et al., 2016)
Salmon	(Patro et al., 2017)
StepOnePlus Software v2.3	Applied Biosystems
UCSC Genome Browser	(Kent et al., 2002)
Zen	Zeiss

3.2 Methoden

3.2.1 Mäuse

3.2.1.1 Mausstämme

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden nach Genehmigung durch die Ethikkommission bzw. Tierschutzkommission und der örtlichen Behörden des Universitätsklinikums Essen bzw. Universitätsklinikums Münster durchgeführt. Die Tierversuche liefen unter den Aktenzeichen 84-02.04.2014.A270, 84-02.04.2015.A022, 84-02.04.2015.A047, 84-02.04.2015.A076 und 84-02.04.2019.A440 unter dem Versuchsleiter Herr PD Dr. Cyrus Khandanpour.

Die verwendeten Mausstämme stammen ursprünglich vom C57BL/6-Mausstamm vom *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, Maine, USA) ab. Alle Mausstämme wurden regelmäßig (alle 5-10 Generationen) mit C57BL/6 (WT)-Mäusen rückgekreuzt. Ein Teil der C57BL/6-Mäuse wurden vom ZTL des Universitätsklinikum Essen bzw. von der ZTE des Universitätsklinikum Münster bezogen und der andere Teil der Mäuse wurde direkt von Charles River (Sulzfeld, Bayern, Deutschland) gekauft.

Als Gfi1-WT-Mäuse werden in dieser Arbeit Mäuse bezeichnet, welche das murine *Gfi1*-Gen exprimieren und keine andere Modifikation besitzen.

3.2.1.1.1 hGFI1-36S- und hGFI1-36N-KI-Mausstamm

Es wurden *GFI1-36S*- und *GFI1-36N*-Knock-in (KI)-Mausstämme verwendet, welche anstelle des murinen Gfi1-Proteins das humane GFI1-Protein exprimieren. Durch Gen-Targeting wurde die humane *GFI1-36S*- bzw. *GFI1-36N*-cDNA in den murinen *Gfi1*-Lokus integriert (Abb. 5). Dadurch exprimieren die KI-Stämme zu 100% das humane *GFI1*-Gen in gleichem Maße wie sonst das endogene murine *Gfi1* (Khandanpour et al., 2012). Die *GFI1-36S*- bzw. *GFI1-36N*-Mäuse, welche einen homozygoten Genotyp besitzen werden in dieser Arbeit als „ki/ki“ bezeichnet. Dagegen werden die Mäuse mit heterozygotem Genotyp als „+/ki“ benannt.

3.2.1.1.2 hGFI1-KD-Mausstamm

Zur Generierung der hGFI1-Knock-down (KD)-Mäuse wurde eine Neo-Kassette in Antisense-Richtung, neben die für GFI1 codierende cDNA-Sequenz, in den murinen *Gfi1*-Lokus, eingesetzt (Abb. 5). Ein Teil der Funktion bleibt dabei erhalten und die *GFI1*-KD-Mäuse exprimieren noch 10-20% des ursprünglichen GFI1-Expressionsniveaus (Khandanpour et al., 2012; Hönes et al., 2016).

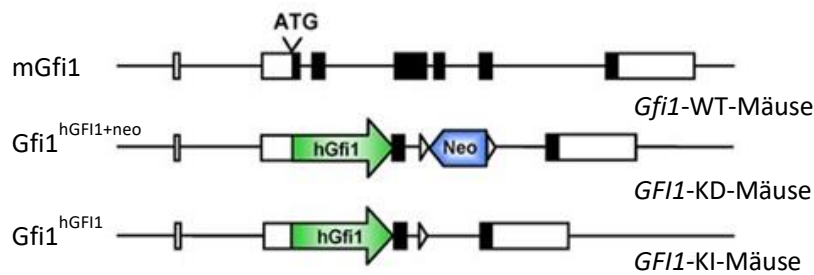


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Gfi1-Lokus

Dargestellt ist der Gfi1 Locus und die Zielallele zur Generierung der GFI1-36S- und GFI1-36N-KI-Mäuse sowie der GFI1-KD-Mäusen. Verändert nach: (Khandanpour et al., 2012).

3.2.1.1.3 NUP98-HOXD13-Mausstämme

Die NUP98-HOXD13-Mausstämme exprimieren das Fusionsgen aus *Nucleoporin 98* (NUP98) und *Homeobox D13* (HOXD13). Die Mäuse des Mausmodells zeigen alle Merkmale einer MDS Erkrankung und spiegeln das spätere Voranschreiten zur AML genau wider (Lin et al., 2005). Die NUP98-HOXD13-Mäuse wurden mit den GFI1-36S- und GFI1-36N- sowie den GFI1-KD-Mäusen, wie bei vorangegangenen Arbeiten, gekreuzt (Hönes et al., 2016; Botezatu et al., 2016b).

3.2.1.2 Haltung der Mäuse

Die Mäuse wurden unter SPF (spezifisch Pathogenfrei) -Bedingungen im ZTL des Universitätsklinikums Essen und in der ZTE des Universitätsklinikums Münster gezüchtet und gehalten. Die äußeren Bedingungen, wie Temperatur, Luftfeuchtigkeit sowie der Tag-Nacht-Rhythmus (12 h), wurden von den Mitarbeitern des ZTLs bzw. ZTEs kontrolliert und konstant gehalten. Die Mäuse wurden in speziellen IVC-Käfigen (individuell ventilierte Käfige) gehalten und bekamen keimfreies Futter und Wasser. Zur Zucht wurden Tiere verwendet, welche mindestens 56 Tage alt waren. Circa 4 Wochen nach der Geburt wurden die Jungtiere von den Eltern abgesetzt und mittels Ohrstanzung markiert.

3.2.1.3 Genotypisierung der Mäuse

Zur Genotypisierung der Mäuse wurden die Ohrproben verwendet, welche bei der Ohrmarkierung der Mäuse gesammelt wurden. Ein Teil der Mäuse wurde durch die Mitarbeiter des ZTL am Universitätsklinikum Essen genotypisiert und der andere Teil wurde von der Arbeitsgruppe durchgeführt. Zu einer Ohrstanzung (ca. 2-3 mm Durchmesser) wurden 100 µl Lysepuffer hinzugefügt und über Nacht bei 57°C und 400 rpm geschüttelt, um die DNA aus den Zellen zu isolieren. Am nächsten Tag wurde die Probe für 10 min bei 95°C erhitzt, um die Proteinase K zu inaktivieren.

Anschließend wurde je nach Genotyp der Mastermix für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit unterschiedlichen Primern (Tab. 9) wie folgt angesetzt:

5,0 µl 5x Green GoTaq® Reaction Flexi Buffer
 0,1 µl Taq Polymerase (Stocklösung: 5 U/µl)
 1,4 µl MgCl₂ (Stocklösung: 25mM)
 0,5 µl dNTPs (Stocklösung: 10 mM)
 0,5-1 µl von jedem Primer (Stocklösung: 100 µM, wurde mit H₂O 1:10 auf die Arbeitslösung verdünnt)
 5,0 µl Probe
 mit H₂O (Nuklease- & DNA-frei) auf 25 µl auffüllen

Danach wurde die PCR folgendermaßen durchgeführt:

Denaturierung:	4 min	95°C
35 Zyklen:	15 sec	94°C
	30 sec	58°C
	60 sec	72°C
Endextension:	10 min	72°C

In der Zwischenzeit wurde ein 2%iges Agarose-Gel mit Zugabe von 5 µl *ROTI®GelStain* pro 100 ml Agarose vorbereitet. Sobald die PCR fertig war, wurden 10-20 µl Probe/Gelkammer aufgetragen und für ca. 40 min bei 100 V laufen gelassen. Als Marker wurden 10 µl des zuvor verdünnten 100 bp Marker von NEB (3 µl Marker + 3 µl Gel Loading Dye (6x) + 10 µl dest. H₂O) aufgetragen. Die Detektion der Banden fand mittels UV-Licht (312 nm) statt. Die Basenpaar-Größe der Banden gab Aufschluss auf den Genotyp.

3.2.1.4 Bestrahlung der Mäuse

Die Mäuse wurden einen Tag vor der Transplantation bestrahlt. Die Bestrahlung der Mäuse fand mit dem *X-Ray System X-RAD320* am Universitätsklinikum Essen (Arbeitsgruppe: Prof. Dr. Iliakis) oder mit dem Faxitron CP-160 bzw. mit dem MultiRad 225 von Precision der ZTE-Münster statt. Die Mäuse wurden hierfür in spezielle Bestrahlungskäfige gesetzt und in die Mitte des Bestrahlungsgerätes gelegt, damit alle Mäuse mit der gleichen Strahlendosis (primäre Transplantation 7 + 3 Gy, sekundäre Transplantation: 3 Gy) behandelt wurden.

3.2.1.5 Primäre Transplantation

Als primäre Transplantation wird die Transplantation von *ex vivo* transduzierten Lineage⁻ (Lin⁻)-Zellen in letal bestrahlte WT-Mäuse bezeichnet. Für die primäre Transplantation wurden zunächst Lin⁻-Zellen von Mäusen des gewünschten Genotyps

isoliert (siehe 3.2.1.10) und anschließend mit einem Retrovirus transduziert (siehe 3.2.5). Dabei wurde das Gen, welches für das Fusionsprotein MLL-AF9 codiert, welches wiederum in den Mäusen zur Entstehung von AML führt, in die Lin⁻-nicht leukämischen Zellen eingebaut (Abb. 6). Das verwendete MCSV-*MLL-AF9-IRES-GFP*-Plasmid (kurz: MLL-AF9) enthält eine Sequenz, welche für das grün fluoreszierende Protein (GFP) codiert (Botezatu et al., 2016b; Hönes et al., 2017). Dadurch kann GFP zur späteren Selektion der erfolgreich transduzierten Zellen (Zellen mit GFP-Signal) verwendet werden. Ein Tag vor der Transplantation wurden die WT (C57Bl/6)-Empfängermäuse letal (7+ 3 Gy) bestrahlt. Ab dem Tag der Bestrahlung bekamen die Mäuse für 3 Wochen Trinkwasser mit 0,1% Baytril. Das Antibiotikum diente zur Vorbeugung von Infekten, da die Mäuse durch die Bestrahlung immunsupprimiert waren. Pro Maus wurden 100.000 GFP⁺-Zellen zusammen mit 150.000- 200.000 gesunden Knochenmarkzellen in sterilem PBS i.v. (in die Schwanzvene) injiziert. Für die Transplantation wurde eine 27 G-Kanüle verwendet. Die Arbeiten fanden alle unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank statt. Die transplantierten Mäuse wurden täglich beobachtet und auf Symptome (anämische Pfoten, Apathie, zerzaustes Haar, Gewichtsverlust usw.) einer Leukämieerkrankung überprüft. Sobald Anzeichen einer AML-Erkrankung sichtbar waren, wurden die Mäuse mit CO₂ in einer speziell dafür vorgesehenen Kammer eingeschläfert und anhand der Blutwerte, Milz- und Lebergröße sowie der Anzahl an Granulozyten, Monozyten, c-Kit⁺- und GFP⁺-Zellen wurde überprüft, ob die Mäuse tatsächlich an einer AML erkrankt waren. Dann wurden die Zellen der Mäuse, je nach Versuchsaufbau, weiterverarbeitet.

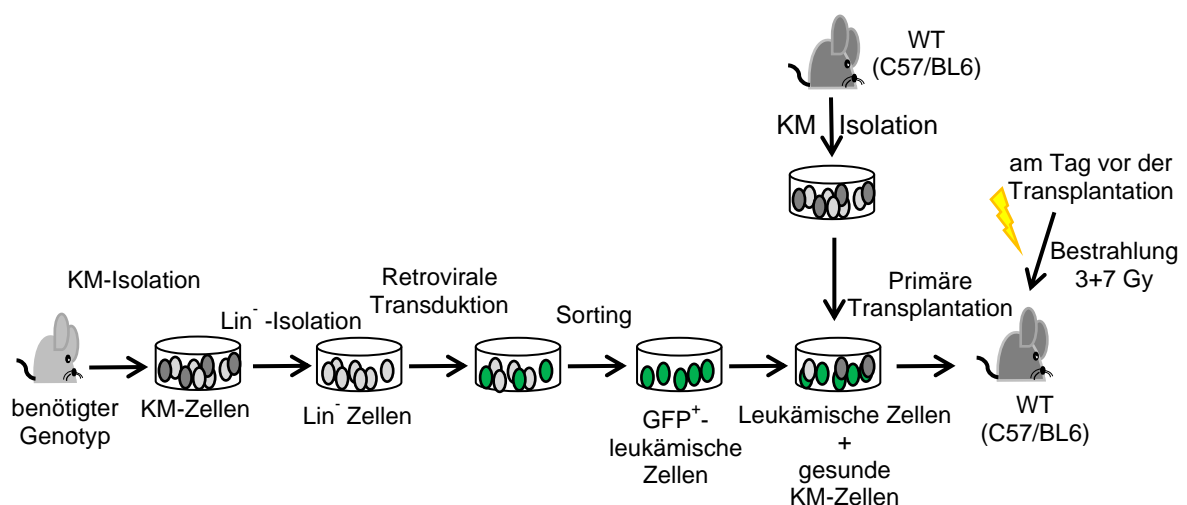


Abbildung 6: Schematische Darstellung der primären Transplantation

3.2.1.6 Sekundäre oder nachfolgende Transplantationsrunden

Unter einer sekundären (tertiären, quartären...) Transplantation wird die Transplantation von leukämischen Knochenmarkzellen bezeichnet, welche *in vivo* generiert wurden. Die leukämischen Knochenmarkzellen stammen von transplantierten Mäusen, welche an einer AML erkrankt sind (Abb. 7) und die Zellen wurden nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff gelagert. Ein Tag vor der Transplantation wurden die WT-Empfängermäuse subletal mit 3 Gy bestrahlt. Ab dem Tag der Bestrahlung bekamen die Mäuse für 3 Wochen Trinkwasser mit 0,1% Baytril. Am Tag der Transplantation wurden die zu transplantierenden Zellen bei 37°C im Wasserbad möglichst schnell aufgetaut. Direkt nach dem Auftauen wurden die Zellen in 10 ml IMDM + 20% FBS +1% Penicillin/Streptomycin (P/S) pipettiert und für 5 min bei 350 g und 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgeschüttet und das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert. Dann wurde die Lebendzellzahl mithilfe von Trypanblau bestimmt. Anschließend wurde der Anteil an GFP⁺-Zellen (erfolgreich transduzierter Zellen) mittels FACS bestimmt. Als Kontrolle (GFP⁻-Zellen) wurden Zellen von WT-Mäusen verwendet. Dann wurde die Anzahl an Lebendzellen, welche GFP exprimieren wie folgt bestimmt:

$$\frac{\text{Lebendzellzahl}}{100} * \text{GFP}^+ \text{Zellen} [\%] = \text{Anzahl lebender GFP}^+ \text{Zellen}$$

Von dieser Zellzahl wurden 100.000-200.000 GFP⁺-Zellen in PBS mit einer 27 G-Kanüle in die Schwanzvene der Empfängermäuse injiziert. Die tägliche Beobachtung der Mäuse und die anschließenden Analysen wurden wie bei der primären Transplantation durchgeführt (siehe 3.2.1.5).

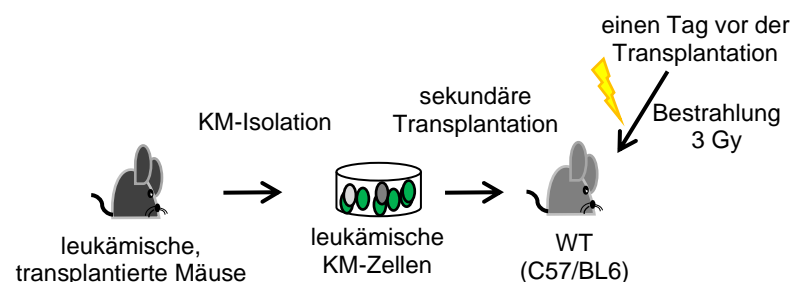


Abbildung 7: Schematische Darstellung der sekundären Transplantation

Für alle nachfolgenden Transplantationsrunden (tertiär, quartär...) wurde dasselbe Schema angewendet.

3.2.1.7 Serielle Transplantation

Bei der seriellen Transplantation wurden die Knochenmarkszellen von an AML erkrankten Mäusen bis zu fünf Mal seriell in gesunde WT-Mäuse transplantiert. Dabei wurde mit einer primären Transplantation angefangen (siehe 3.2.1.5). Sobald die Mäuse der primären Transplantation eine AML entwickelt haben wurden diese Tiere euthanasiert und das leukämische Knochenmark in weitere WT-Mäuse transplantiert (siehe 3.2.1.6). Nachdem diese transplantierten Mäuse eine AML entwickelt hatten wurden die leukämischen Knochenmarkszellen dieser Mäuse erneut in WT-Mäuse transplantiert (tertiäre Transplantation). Dieser Ablauf wurde bis zu fünf Mal wiederholt (quintäre Transplantation) (Abb. 8).

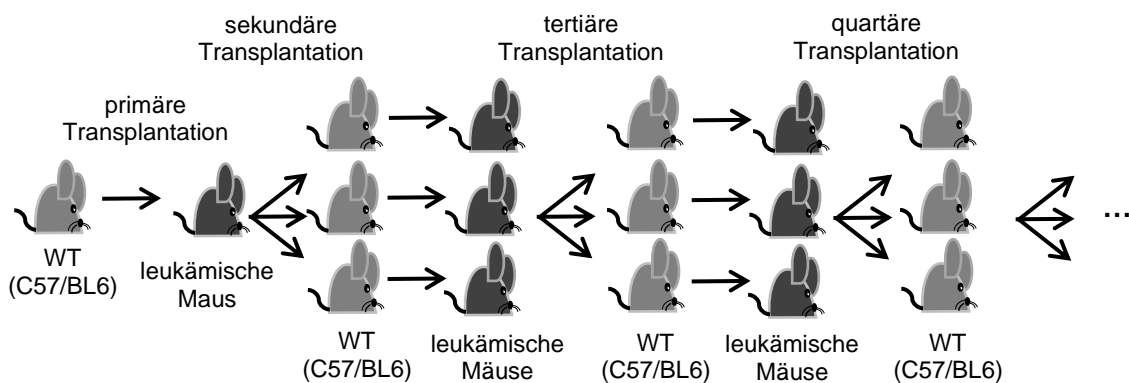


Abbildung 8: Schematische Darstellung der seriellen Transplantation

3.2.1.8 Analyse leukämischer Mäuse

Als Kontrolle wurden parallel zu den leukämischen Mäusen nicht leukämische Mäuse analysiert.

3.2.1.8.1 Isolation von Knochenmarkszellen, Thymozyten und Milzzellen

Zur Isolierung von Thymozyten, Knochenmark- sowie Milzzellen wurden die Mäuse zuerst mit CO₂ in einer speziell dafür vorgesehenen Kammer eingeschläfert. Danach wurden die Femora, Humeri und Tibiae ohne Gewebereste, der Thymus und oder die Milz herausgenommen und in FACS-Puffer gelegt. Zur Gewinnung der Knochenmarkszellen wurden die Knochen zuerst mit einer 25 G-Kanüle mit FACS-Puffer gespült, bis die Knochen innen komplett weiß bzw. möglichst frei von Knochenmark waren. Die Zellsuspension wurde dann mit einer 20 G-Kanüle resuspendiert, um alle Zellklumpen zu zerkleinern und eine Einzelzellsuspension zu bekommen. Zusätzlich zum Resuspendieren wurde die Zellsuspension mit einem 100 µm Filter filtriert, um die restlichen Gewebestücke oder Teile von gesplitterten

Knochen von den Zellen zu trennen. Zur Gewinnung der Thymozyten bzw. Milzzellen wurde der Thymus bzw. die Milz mit zwei sterilen Objektträgern in FACS-Puffer zerrieben. Die daraus resultierenden Zellsuspensionen wurden mit einer 20 G-Kanüle mit FACS-Puffer resuspendiert und ebenfalls mit einem 100 µm Filter filtriert. Die filtrierten Zellsuspensionen (Knochenmarkzellen, Thymozyten bzw. Milzzellen) wurden dann bei 350 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert und anschließend wurde der Überstand abgeschüttet. Die Zellsuspensionen enthielten für die nachfolgenden Experimente störende Erythrozyten. Diese wurden mittels des 1x Erylyse-Puffers (Pharm Lyse von BD Biosciences) entfernt. Hierzu wurde die jeweilige Zellsuspension mit 1 ml des vorgewärmten 1x Erylyse-Puffers resuspendiert und für 7 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden zum Stoppen der Reaktion 10-20 ml FACS-Puffer zugegeben und die Suspension bei 350 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Danach konnte der Überstand abgeschüttet werden. Die Knochenmarkzellen, Thymozyten bzw. Milzzellen wurden dann je nach Versuch weiterbearbeitet.

3.2.1.8.2 Blutentnahme und Erstellung eines Blutbildes

Die Blutentnahme von leukämischen Mäusen bzw. Kontrollmäusen wurde direkt nach der Euthanasie der Tiere durchgeführt. Das Blut (ca. 200-500 µl) wurde dabei mit einer 25 G-Kanüle aus dem Herz der Mäuse entnommen und in ein mit K3EDTA beschichtetes Röhrchen überführt. Für die Erstellung des Blutbildes (u.a. WBC, PLT, HGB) wurden 10 µl des peripheren Blutes der Mäuse im Hämatologischen-Onkologischen Labor in der Klinik für Hämatologie des Universitätsklinikums Essen (XE 2100 und XN 1000 von Sysmex) oder selbstständig mit dem Animal Blood Counter von scil vet im Universitätsklinikum Münster gemessen.

3.2.1.8.3 Charakterisierung der Oberflächenmarker von Knochenmark-, Milz- und peripheren Blutzellen mittels Durchflusszytometrie

Jede Zelle exprimiert spezifische Zelloberflächenproteine. Durch diese Oberflächenantigene lassen sich die Zellen, mittels Antikörpern, unterscheiden. Diese Antigene werden auch als *Cluster of Differentiation* (CD)-Marker bezeichnet (Cruse et al., 2004; Gabius et al., 2015). Zur genaueren Analyse der leukämischen Mäuse wurden die Knochenmarkzelle, Milzzellen und teilweise das periphere Blut der Mäuse hinsichtlich verschiedener CD-Marker untersucht.

In dieser Arbeit wurden folgende Marker verwendet:

CD4	-	T-Zellen (T-Helferzellen, regulatorische T-Zellen)
CD8	-	T-Zellen (zytotoxische T-Zellen)
B220	-	B-Zellen
Ter119	-	Erythroide Linie
CD11b	-	myeloide Zellen (Makrophagen)
Gr-1	-	myeloide Zellen (Granulozyten)
c-Kit	-	leukämischer Stammzellmarker

(Cruse et al., 2004; Corthay, 2009; Schmitt and Engel, 2020). Für die Färbung wurden 5×10^5 - 1×10^6 Zellen in ein FACS-Röhrchen gegeben und zusammen mit 1 ml FACS-Puffer zentrifugiert (350 g, 5 min, 4°C). Anschließend wurde der Überstand, der zu färbenden Proben abgeschüttet und zum Zellpellet 10 µl Fc-Block (*CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block™)*) hinzugefügt. Nach 10 min Inkubationszeit bei 4°C wurden die Zellen mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen (350 g, 5 min, 4°C). Für die Antikörperfärbung wurden die Zellen mit 0,2 µg/ml des Antikörpers in 80 µl FACS-Puffer resuspendiert und für 10 min bei 4°C inkubiert. Zur besseren Differenzierung der Zellen wurden die Antikörperkombinationen wie in Tabelle 12 angegeben verwendet. Nach den 10 min Inkubationszeit wurden die Zellen wieder mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen (350 g, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde abgeschüttet und die Zellen in 350 µl FACS-Puffer resuspendiert. Danach wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Von jeder Probe wurde eine ungefärbte Kontrolle analysiert.

Tabelle 12: Übersicht der Antikörper-Kombinationen zur Differenzierung der Knochenmark-, Milz- und Blutzellen.

Antikörper 1	Antikörper 2	Gewebe
c-Kit PE/APC	-	PB, KM, SPL
Gr-1 PE/APC	CD11b PerCP	KM, SPL
CD8a PE/APC	CD4 PerCP	KM, SPL
Ter-119 PE/APC	B220 PerCP	KM, SPL

3.2.1.8.4 Cytospin-Präparation von Knochenmarkzellen

Zur Vorbereitung eines Cytospins wurden 1×10^5 Knochenmarkzellen in 200 µl PBS pipettiert. Die Zellsuspension wurde mithilfe der *Shandon Cytospin 2 Cytozentrifuge* bei 350 g für 5 min auf speziellen Cytospin-Objektträger (*Shandon EZ Single*

Cytofunnels) fixiert. Die Wight-Giemsa-Färbung der Cytospins wurde vom Hämatologisch-Onkologischen Labor des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

3.2.1.9 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren von murinen Knochenmarkzellen wurde IMDM + 20% FBS + 10% DMSO verwendet. Die Zellen wurden in diesem Einfriermedium resuspendiert und schnell in Einfriereröhrchen überführt. Die Zellen wurden zunächst mit speziellen Einfrierbehältern, welche ein langsames Einfrieren der Proben gewährleisten, im Gefrierschrank bei -80°C eingefroren und dann in Flüssigstickstoff bis zur Verwendung gelagert. Zum Auftauen von Zellen wurden 10 ml IMDM + 20 % FBS in 15 ml-Röhrchen vorbereitet. Die eingefrorenen Zellen wurden im Wasserbad (37°C) aufgetaut bis nur noch ca. 10-15% der Zellsuspension gefroren war. Dann wurde die Zellsuspension schnell in das vorbereitet Medium pipettiert und für 5 min bei 350 g und 4°C zentrifugiert. Danach wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert oder zur Transplantation vorbereitet.

3.2.1.10 Isolation von Lineage⁻-Zellen

Als Lineage⁻(Lin⁻)-Zellen werden Zellen bezeichnet, die keinen Abstammungs- bzw. Differenzierungsmarker exprimieren (undifferenzierte Vorläuferzellen). Dagegen exprimieren Lineage⁺(Lin⁺)-Zellen Differenzierungsmarker wie z.B.: CD4 bei T-Zellen (Cruse et al., 2004; Corthay, 2009; Schmitt and Engel, 2020). Zur Isolation der Lin⁻-Zellen wurde das *Lineage Cell Depletion Kit* von Miltenyi verwendet. Zu Beginn wurden die Knochenmarkzellen der Mäuse isoliert (siehe 3.2.1.8.1) und danach die Zellzahl bestimmt (siehe 3.2.2). Nach dem Zählen wurde die Zellsuspension bei 350 g, 4°C , für 5 min zentrifugiert. Wie im Protokoll des Herstellers geschrieben, wurden zu dem Zellpellet 40 μl FACS-Puffer pro 10^7 Zellen und 10 μl α -Lin-Biotin-Antikörper pro 10^7 Zellen hinzugefügt und für 11 min auf Eis inkubiert. Der α -Lin-Biotin-Antikörper bindet an die Differenzierungsmarker der Lin⁺-Zellen. Im zweiten Schritt wurden 30 μl FACS-Puffer pro 10^7 Zellen und 20 μl Anti-Biotin-Microbeads pro 10^7 Zellen hinzugefügt und für 15 min bei 4°C inkubiert. Die Anti-Biotin-Microbeads binden an den α -Lin-Biotin Antikörper. Dadurch werden die Lin⁺-Zellen mit den Microbeads markiert. Die Zellsuspension wurde mit 25 ml FACS-Puffer zentrifugiert (350 g, 4°C , 5 min). Danach wurde der Überstand abgeschüttet und das Zellpellet in 500 μl MACS-Puffer resuspendiert. Diese 500 μl Zellsuspension wurden dann auf eine zuvor mit 2 ml MACS-Puffer äquilibrierte Säule gegeben. Damit die Säule nicht durch größere Partikel oder Zellklumpen verstopft, wurde die Zellsuspension mit einem 30 μm Filter

filtriert. Die Säule wurde in einer speziellen magnetischen Vorrichtung (MACS Separator) befestigt. Durch diesen Magneten wurden die Lin⁺-Zellen, welche durch die Antikörper mit Microbeads markiert sind in der Säule gehalten. Der Durchfluss, welcher die Lin⁻-Zellen enthält, wurde aufgefangen. Die Lin⁻-Zellen konnten dann gezählt und je nach Versuchsablauf direkt verwendet oder kultiviert werden. Die Kultivierung von Lin⁻-Zellen fand in SCM statt.

3.2.1.11 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von Knochenmarkzellen

Die Untersuchung der Chromosomen mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) hinsichtlich zytogenetischer Veränderungen wurde einerseits in Zusammenarbeit mit Herr PD Dr. Thomas Liehr (Universitätsklinikum Jena) durchgeführt. Andererseits wurde ein Teil der FISH-Analysen an der Medizinischen Hochschule Hannover von Frau Prof. Dr. Gudrun Göhring und Team mit der dort etablierten Methode durchgeführt. Die hierfür verwendeten eingefrorenen leukämischen Knochenmarkzellen aus transplantierten Mäusen wurden auf Trockeneis nach Jena bzw. Hannover gesendet.

3.2.1.12 Vergleichende genomische Hybridisierung (Array-CGH)

Zur Untersuchung von kleinen genomischen Veränderungen wurde die vergleichende genomische Hybridisierung durchgeführt (engl.: *comparative genomic hybridization*; Array-CGH). Für den Array-CGH wurden zuvor eingefrorene primäre Knochenmarkzellen aus leukämischen *GF11-36S-MLL-AF9*, *GF11-36N-MLL-AF9*- sowie *GF11-KD-MLL-AF9*-Mäusen verwendet. Der Array-CGH wurde in Kooperation mit Frau Prof. Dr. Doris Steinemann und Frau Prof. Dr. Gudrun Göhring von der medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt und analysiert.

3.2.2 Zellzahlbestimmung

Je nach Versuchsaufbau und Versuchsziel wurden die Zellen entweder automatisch oder mittels Neubauer-Zählkammer gezählt.

3.2.2.1 Automatische Zellzahlbestimmung

Die automatische Zellzahlbestimmung wurde mit dem *Z2 Coulter Particle and size analyzer* durchgeführt. Vor der Benutzung des Zellzählers musste die Maschine mit der Waschlösung von Beckman Coulter und anschließend mit der Elektrolytlösung gewaschen und kalibriert werden, um eine genaue Messung zu ermöglichen. Für die Zellzahlbestimmung wurden 100 µl der Zellsuspension zu 10 ml Elektrolytlösung in ein

spezielles Zählgefäß gegeben. Für jeden Zelltyp musste die Größe der zu messenden Zellen eingestellt werden. Dann konnte die Zellzahl/ml bestimmt werden.

3.2.2.2 Manuelle lebend/tot Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau und Neubauerkammer

Für die manuelle Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau und Neubauerkammer wurde die Zellsuspension mit Trypanblau verdünnt. Der Verdünnungsfaktor hing dabei von der Dichte der Zellsuspension ab. Trypanblau färbt tote Zellen blau an, da diese Zellen den blauen, toxischen Farbstoff nicht ausschließen können (Ausschlussfärbung). Dagegen werden die lebenden Zellen nicht angefärbt (Schmitz, 2011). Zur Vorbereitung der Neubauerkammer wurde ein Deckglas auf die angefeuchteten Stege neben der eigentlichen Zählkammer aufgebracht, sodass die gesamten Quadrate auf der Kammer vom Deckglas bedeckt sind und die Newtonschen-Interferenzringe am Rand sichtbar waren. Für die Zählung wurden 10 µl der Probe pro Kammer verwendet. Unter Verwendung eines Lichtmikroskops (10x Objektiv) wurden die Zellzahlen (tot und lebend) der vier Großquadrate ausgezählt. Für die Berechnung der Zellzahl/ml wurde folgende Formel angewendet:

$$\text{Zelldichte} \left[\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} \right] = \left(\frac{\text{Zellzahl}}{\text{Anzahl Großquadrate}} \right) * VF * KF * \text{ml}^{-1}$$

Dabei ist VF: Verdünnungsfaktor und KF: Kammerfaktor. Bei den hier verwendeten Kammern ist der KF 10^4 .

3.2.3 Klonierung von DNA-Fragmenten

3.2.3.1 Transformation kompetenter Bakterien

Für die Transformation kommerziell erworbener kompetenter E. coli Bakterien mit den gewünschten Plasmiden wurde zunächst 0,5-5 µl des Plasmides in ein Röhrchen, in welchem die kompetenten Bakterien geliefert wurden, pipettiert. Danach wurden die Zellen für 1 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 90 s bei 42°C in einem Thermomixer erwärmt und auf Eis gestellt. Zu den Bakterien wurden dann 500 µl S.O.C. Medium hinzugefügt und bei 37°C für 1 h geschüttelt (400 rpm). Danach konnten die Bakterien ausplattiert werden (siehe 3.2.3.2).

3.2.3.2 Herstellen von Einzelkolonien auf Selektivnährboden und Herstellen einer Schüttelkultur

Zum Selektieren positiv transformierter Bakterien wurden diese auf LB-Agar mit Zugabe von Antibiotika ausplattiert. Zur Herstellung der LB-Agar-Platten wurden

zunächst 32 g/l LB-Agar-Pulver in destilliertem Wasser gelöst und anschließend autoklaviert. Nach einer kurzen Abkühlungsphase (Medium ca. 40-50°C) wurde das entsprechende, zur Selektion benötigte, Antibiotikum (Arbeitskonzentration: 100 µg/ml Ampicilin; 50 µg/ml Kanamycin) hinzugefügt. Der flüssige LB-Agar wurde dann in Petrischalen gefüllt, sodass ca. 2/3 des Bodens bedeckt waren. Sobald der Agar kalt und fest war, wurden die Platten mit Parafilm verschlossen und im Kühlschrank gelagert oder die Bakterien wurden direkt ausplattiert. Die Bakterien wurden entweder mit einer Einmal-Öse auf dem Agar ausgestrichen oder mittels Drigalskispatel ausplattiert. Bei letzterem wurden 50-200 µl der Bakterienkultur in die Mitte der Agarplatte pipettiert und anschließend mit einem, zuvor sterilisiertem Drigalskispatel gleichmäßig auf der Platte verteilt. Die fertigen Platten wurden zum Wachsen der Bakterien für ca. 12 h in den Inkubator (37°C) gestellt. Am nächsten Tag konnten die Platten entweder bei 4°C, mit Parafilm verschlossen, gelagert werden oder Einzelkolonien direkt weiterkultiviert werden.

Für das Anlegen einer Schüttelkultur wurde zunächst LB-Medium (10 g LB-Broth in 500 ml dest. Wasser) hergestellt. Das LB-Medium wurde ebenfalls autoklaviert und nachdem es abgekühlt war, wurden die entsprechenden Antibiotika zur Selektion hinzugefügt. Zuerst wurde eine Kolonie oder ein Teil eines zuvor angelegten Glycerol-Stocks (siehe 3.2.3.3) zu 2 ml LB-Medium gegeben und für ca. 6 h bei 37°C und 200 rpm in einem Schüttelinkubator inkubiert. Danach wurden die 2 ml Bakteriensuspension in 200 ml des LB-Mediums in einen Schickanenkolben (500 ml) gegeben. Die Kultur wurde dann über Nacht bei ca. 200 rpm und 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die Plasmid DNA isoliert.

3.2.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Isolierung der Plasmid-DNA wurde das *NucleoBond PC 500 Kit* von Macherey-Nagel verwendet und die Maxipräparation nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Isolierung der Plasmid-DNA basiert auf der Anionenaustauschchromatographie. Damit nicht jedes Mal neue Bakterien mit dem Plasmid transformiert werden mussten, wurde von der Schüttelkultur ein Glycerol-Stock angelegt. Hierfür wurde die Bakteriensuspension im Verhältnis von 1:1 mit 50% Glycerol gemischt und in Einfrierröhrchen überführt. Die Glycerol-Lösungen wurden bei -80°C bis zur Verwendung gelagert. Die Konzentration der erhaltenen Plasmid-DNA wurde mit Hilfe eines Spektrometers bei 260 nm gemessen und anhand der 260/280-Werte wurde die Reinheit der DNA (Soll: ~1,8) bestimmt (Richter, 2003; Farrell, 2005).

3.2.4 Virus-Produktion und Bestimmung der Virustiter (Retrovirus)

Zur Produktion von Retroviren wurden 1×10^7 Phoenix-ECO oder HEK293T-Zellen in 25 ml DMEM + Glutamax + 10% FBS + 1% P/S + 20 mM HEPES in einer Zellkulturschale (140 cm^2) ausplattiert. Sobald die Zellen 80-90% konfluent waren, wurde mit der Transfektion begonnen. Hierfür wurde zunächst ca. 2 h vor der Transfektion das Medium von den Zellen vorsichtig gewechselt. Kurz vor der Transfektion wurde der Transfektionsmix vorbereitet. Dazu wurde im ersten Gefäß 20 µg der Plasmid-DNA (*MLL-AF9*-Plasmid), 100 µl CaCl_2 (2,5 M), 2,25 µg pCL-Eco-Plasmid-DNA (retrovirales Verpackungsplasmid) vorgelegt und mit sterilem H_2O auf 1 ml aufgefüllt. Dieser Mix wurde tropfenweise zu 1 ml 2x HEBS-Puffer, unter kontinuierlichem „Vortexen“, hinzugegeben. Anschließend wurde der Transfektionsmix für 10 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde aus den Zellkulturplatten mit den Phoenix-ECO- bzw. HEK293T-Zellen vorsichtig das Medium heraus pipettiert und 15 ml DMEM + Glutamax + 10% FBS + 1% P/S + 20 mM HEPS zugegeben. Der Transfektionsmix wurde dann tropfenweise auf der Platte verteilt und über Nacht bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium gewechselt und 15 ml frisches DMEM + Glutamax + 10% P/S + 10 mM HEPES zu den Zellen gegeben. Einen Tag später wurde der virushaltige Überstand der Zellen vorsichtig abgenommen und mithilfe eines $0,45 \text{ µm}$ Filters filtriert. Zu den Zellen wurden erneut 15 ml frisches DMEM + Glutamax + 10% P/S + 10 mM HEPES hinzugegeben und am nächsten Tag wurde der Überstand erneut geerntet. Der Virusüberstand wurde bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

Zur Überprüfung der Qualität des Virus bzw. zur Bestimmung des Virustiters wurden zunächst 2×10^4 NIH/3T3-Zellen/Well einer 12-Well-Platte ausgesät. Verwendet wurde hierfür DMEM + 10% FBS + 1% P/S. Zusätzlich zu den Wells, welche mit Virus behandelt wurden, wurden zwei Wells zur Zellzahlbestimmung benötigt sowie als negativ Kontrolle für die anschließend FACS-Analyse. Einen Tag nach dem Ausplattieren der Zellen wurde die Zellzahl bestimmt. Die Virusüberstände von Tag 1 und Tag 2 der Virusernte wurden unverdünnt und verdünnt (1:10, 1:100, 1:1000) in DMEM + 10% FBS + 1% P/S + 8 µg/ml Polybren zu den NIH/3T3-Zellen gegeben. Zunächst wurde das Medium der NIH/3T3-Zellen abgenommen und pro Well 300 µl der jeweiligen Virussuspension zugegeben. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO_2 über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und neues DMEM + 10% FBS + 1% P/S zugegeben. Nach 2-5 Tagen wurden die Zellen trypsiniert

(0,25% Trypsin, ca. 5 min bei RT) und in FACS-Gefäße überführt. Die Zellsuspension wurde bei 350 g, 4°C für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Das Pellet wurde in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert und der prozentuale Anteil an GFP⁺-Zellen der unterschiedlichen Proben wurde mittels FACS-Analyse bestimmt.

3.2.5 Retrovirale Transduktion von Lin⁻-Zellen

Lin⁻-Zellen wurden mit dem *MLL-AF9*-Plasmid transduziert. Hierzu wurden zunächst Lin⁻-Zellen wie unter 3.2.1.10 beschrieben isoliert und für 2 Tage bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Einen Tag vor der Transduktion wurden 24-Well-Platten (nicht-Gewebekultur behandelt) mit 20 µg/ml Retronectin in PBS beschichtet und bei 4°C aufbewahrt. Am Tag der Transduktion wurde die Retronectin-Lösung aus den Platten heraus pipettiert und in eine neue Platten überführt (Verwendung am Tag 2). Die Wells wurden mit PBS gewaschen und mit 1 ml 2% BSA in PBS (sterilfiltriert mit 0,2 µm Filter) wurden unspezifische Bindungen blockiert. Die BSA-Lösung wurde für 30 min bei RT inkubiert und danach verworfen. Die Wells wurden erneut mit PBS gewaschen und anschließend wurde 1 ml des Virus in jedes Well gegeben. Die Platte mit dem Virus wurde für ≥90 min bei 4200 g und 32°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden ca. 900 µl der Virus-Lösung verworfen und 1 ml frische Virus-Lösung pro Well hinzugefügt. Die Platten wurden erneut für ≥90 min bei 4200 g und 32°C zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden die Lin⁻-Zellen gezählt. Nach der Zentrifugation wurden ca. 900 µl der Virus-Lösung abgenommen und 600 µl Zellsuspension/Well hinzugefügt. Die Zellen wurden in IMDM + 20% FBS + 1% P/S + 10 ng/ml IL-3 + 10 ng/ml Il-6 + 20 ng/ml mSCF mit einer Konzentration von $\leq 0,5 \times 10^6$ Zellen/ml ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Transduktion genau wie am ersten Tag wiederholt. An Tag 3 wurden die Zellen in frische, nicht mit Retronectin beschichtete Platten ausplattiert und bis zum Tag des FACS-Sorting bei 37°C, 5% CO₂ in IMDM + 20% FBS + 1% P/S + 10 ng/ml IL-3 + 10 ng/ml Il-6 + 20 ng/ml mSCF mit einer Zelldichte von max. 1×10^6 Zellen/ml kultiviert.

3.2.6 FACS-Sortierung von transduzierten primären Mauszellen

Das *MLL-AF9*-Plasmid, mit welchem die Zellen transduziert wurden, enthält eine *GFP*-Sequenz (Botezatu et al., 2016b). Positiv transduzierte Zellen exprimieren somit das GFP-Protein und können dadurch von den nicht erfolgreich transduzierten Zellen unterschieden werden. Zur Sortierung von GFP⁺- und GFP⁻-Zellen wurde FACS (engl.: *fluorescence-activated sorting*) verwendet. Die Zellen wurden in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert und durch ein 100 µm Filter gegeben. Zur besseren Unterscheidung der

GFP⁺- und GFP⁻-Zellen wurde eine GFP⁻-Probe als Kontrolle (Lin⁻-Zellen, welche nicht mit Virus behandelt wurden) verwendet. Die Zellen wurden direkt in Medium aufgefangen. Für die Sortierung wurde der „BD FACS Aria III Cell Sorter“ verwendet.

3.2.7 RNA-Methoden

3.2.7.1 RNA-Isolation und Konzentrationsbestimmung

Zur Isolierung von RNA wurde bei geringen Zellzahlen bis max. 5×10^5 das *RNeasy Micro Kit* und bei hohen Zellzahlen ab 1×10^6 bis max. 10×10^6 Zellen das *RNeasy Mini Kit* (beides von Qiagen) verwendet. Die RNA-Isolation wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Prinzip des Kits beruht auf einer Guanidinisothiocyanat-Lyse und anschließender Aufreinigung mittels Silica-Membran (Herstellerprotokoll *RNeasy Mini/Micro Kit* Qiagen). Zum Lysieren der Zellen nach deren Ernte durch Zentrifugation bei 350 g, 4°C für 5 min wurden 350 µl RLT-Puffer mit Zugabe von 1% β-Mercaptoethanol zum Zellepellet pipettiert und mehrfach resuspendiert. Zur Homogenisierung der Lysate wurden 20 G-Kanülen und 1 ml Spritzen verwendet. Zur Elution der RNA von der Säule wurden je nach verwendetem Kit 14 µl (*RNeasy Micro Kit*) oder zwischen 30-50 µl (*RNeasy Mini Kit*) RNase-freies Wasser verwendet. Die RNA-Konzentration wurde mit einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Zusätzlich wurde die Reinheit der Proben durch das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm angegeben. Dieses Verhältnis gibt Aufschluss über mögliche Proteinkontaminationen. Bei RNA-Proben sollte 260/280 ~2.0 betragen (Farrell, 2005).

3.2.7.2 RNA-Sequenzierung

Die RNA-Sequenzierung wurde einerseits vom BioChip Labor unter der Leitung von Herr PD Dr. Ludger Klein-Hitpass am Universitätsklinikum in Essen und auf der anderen Seite von der Core Facility Genomik des Universitätsklinikums in Münster durchgeführt.

3.2.8 DNA-Methoden

3.2.8.1 DNA-Isolation und Konzentrationsbestimmung

Zur Isolierung der genomischen DNA wurde das *Purelink Genomic DNA Mini Kit* von Invitrogen verwendet. Die DNA-Isolation wurde genau nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Isolation wurden ca. 5×10^6 Zellen verwendet. Die anschließende Konzentrationsbestimmung fand mit Hilfe eines Spektrometers bei einer Wellenlänge von 260 nm statt. Zusätzlich wurde das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und

280 nm bestimmt. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu 280 nm gibt einen Aufschluss über die Reinheit der DNA und sollte idealerweise ~1,8 betragen. Liegt der Wert deutlich unter 1,8 ist das ein Hinweis auf Verunreinigungen durch Proteine (Richter, 2003; Farrell, 2005).

3.2.8.2 cDNA-Synthese

Für die Synthese von cDNA wurde das *Advantage[®]RT-for-PCR Kit* von Takara verwendet. Eingesetzt wurden 0,5 µg RNA in einem Endvolumen von 13 µl in DEPC-behandeltem H₂O. Dann wurde 1 µl OligodT (Stocklösung: 20 µM) zu 13 µl der Probe (0,5 µg RNA+ DEPC-behandeltes H₂O) gegeben und für 2 min bei 70°C zum Denaturieren erhitzt. Nachdem die Proben auf Eis abgekühlt wurden, wurden 6,5 µl des zuvor hergestellten Mastermixes:

- 4 µl des 5x RT-Puffer
- 1 µl des 10 mM dNTP-Mix
- 0,5 µl des 40 units/µ RNase Inhibitor
- 1 µl der 200 units/µl MMLV Reversen Transkriptase

zu den Proben pipettiert und die Reaktion für 1 h bei 42°C inkubiert. Am Ende wurde zu jeder Probe 80 µl DPEC-behandeltes H₂O hinzugefügt.

3.2.8.3 RT-PCR

Zur Analyse der Expression ausgewählter Gene wurden Real-Time-PCRs (RT-PCRs) mit TaqMan-Primern durchgeführt. Die TaqMan-Primer wurden von Thermo Fisher Scientific bezogen. Die Methode zum Nachweis der PCR-Produkte in Echtzeit während der PCR durch Verwendung einer markierten Sonde beruht auf dem Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) (Förster, 1948; Farrell, 2005). Die TaqMan-Sonden sind am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und am 3'-Ende befindet sich ein Quencher. Solange die TaqMan-Sonde intakt ist unterdrückt der Quencher die Fluoreszenz des Farbstoffes. Wird die PCR gestartet beginnt die DNA-Polymerase neue Stränge mithilfe der Primer zu synthetisieren. Erreicht das Enzym die TaqMan-Sonde wird diese durch die Nukleaseaktivität abgetrennt und der Fluoreszenzfarbstoff vom Quencher getrennt. Dadurch findet keine Unterdrückung der Fluoreszenz mehr statt und das Signal kann gemessen werden. Mit jedem Zyklus nimmt somit die Fluoreszenzintensität zu und hängt von der zu testenden Genexpression der jeweiligen Probe ab (Livak et al., 1995; Farrell, 2005). Zunächst wurde folgender Mastermix hergestellt:

10 μ l TaqMan Gene Expression Master Mix
 5 μ l H₂O
 1 μ l TaqMan-Primer

Danach wurden 16 μ l des Mastermix in ein Well einer speziellen 96-Well-Platte (*MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate*) pipettiert und 4 μ l der zu untersuchenden cDNA-Probe. Als Negativkontrolle wurden 4 μ l H₂O zum Mastermix pipettiert. Zur Normalisierung der Ergebnisse wurde die Expression von *Hprt* verwendet. Nach Zugabe der Probe zum Mastermix wurde die 96-Well-Platte mit einer Folie verschlossen, gut geschüttelt und danach kurz zentrifugiert (350 g, mehrere Sekunden). Die RT-PCR wurde mit dem *StepOnePlus Real-Time PCR System* durchgeführt. Folgendes Programm wurde verwendet:

	2 min	50°C
	10 min	95°C
40 Zyklen:	15 s	95°C
	1 min	60°C

Zur Quantifizierung wurde die $\Delta\Delta$ Ct-Methode verwendet (Livak and Schmittgen, 2001; Rao et al., 2013).

3.2.8.4 Bisulfit-PCR

Zur Untersuchung der Promotor-Methylierung von *Mgmt* wurde die Bisulfit-PCR durchgeführt. Hierbei findet eine Konvertierung der nicht methylierten Cytosine zu Uracil, mithilfe von Natriumbisulfit, statt. Die methylierten Cytosine werden nicht verändert. In der anschließenden PCR werden die Uracil-Basen als Thymin erkannt und im Gegenstrang wird ein Adenin eingebaut. Dadurch kann mit den richtigen Primern (ein Primerpaar für den methylierten Promotor, ein Primerpaar für den unmethylierten Promotor) der Methylierungsstatus untersucht werden (Clark et al., 1994; Yamada et al., 2001). Für die Bisulfit-Konvertierung der DNA wurde das *Methylamp DNA-Modifikation Kit* von EpiGentek verwendet. Das Kit wurde genau nach Herstellerangaben angewendet. Zur Konvertierung wurden 200 ng DNA eingesetzt. Nach der Bisulfit-Konvertierung wurde die Konzentration der Proben mittels Spektrometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Für die anschließende PCR wurden 50-100 ng der modifizierten DNA eingesetzt. Die verwendeten Primersequenzen stammen aus der Publikation von Yamada und Kollegen aus dem Jahr 2001 und wurden von Eurofins bezogen (Yamada et al., 2001). Zunächst wurden die Primer in dest. H₂O zu einer Endkonzentration von 100 μ M gelöst und bei 50°C für

10 min geschüttelt (400 rpm). Die Primer wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Für jede Probe wurde folgender PCR-Mix verwendet:

5 µl 5x Green GoTaq® Reaction Flexi Buffer
1,4 µl 25mM MgCl₂
0,5 µl dNTPs (Stocklösung: 10 mM)
1 µl Vorwärts-Primer (10 µM)
1 µl Rückwärts-Primer (10 µM)
0,2 µl Taq Polymerase (Stocklösung: 5 u/µl)
x µl Probe (50 oder 100 ng)
mit H₂O auf 25 µl auffüllen.

Danach wurde die PCR (35 Zyklen) wie folgt durchgeführt:

90 s 94°C
90 s 60°C
2 min 72°C

Nach der PCR wurden die Proben auf ein 2%iges Agarosegel (mit Zugabe von 5 µl/100 ml Agarosegel *ROTI®GelStain*) aufgetragen und bei 100 V für 40 min laufen gelassen. Als DNA-Marker wurden 10 µl 100 bp Marker (3 µl DNA Ladder 100 bp + 3 µl Gel Loading Dye (6x) + 10 µl H₂O) verwendet. Die Geldokumentation erfolgte mit dem *Gel iX20 Imager*.

3.2.8.5 Genotypisierung humaner Proben

Die primären humanen AML-Patientenproben stammten aus Essen, Hannover (bereitgestellt von Herr Prof. Dr. Michael Heuser, Medizinische Hochschule Hannover), Dresden (bereitgestellt von Herr PD Dr. Friedrich Stölzel, Universitätsklinikum Dresden) und München (bereitgestellt von Frau Prof. Dr. Irmela Jeremias, Helmholtz Zentrum München). Bei den Proben handelte es sich um eingefrorene Milz- und Knochenmarkzellen sowie peripheres Blut. Die Genotypisierung wurde in Zusammenarbeit mit dem Team von Prof. Dr. Michael Heuser in Hannover und dem Team von PD Dr. Friedrich Stölzel in Dresden durchgeführt. Ein Teil der Proben wurde am Universitätsklinikum Essen sowie am Universitätsklinikum Münster genotypisiert. Die Genotypisierung der Patientenproben erfolgte mithilfe des *SNP-Genotyping Assays* von Thermo Fisher Scientific und diente zur Unterscheidung zwischen dem *GFI1-36S/S-*, *GFI1-36S/N-* und *GFI1-36N/N-*Genotyp. Das Prinzip dieses Assays ist dasselbe wie bei einer normalen RT-PCR mit TaqMan-Primern (siehe 3.2.8.3). Der einzige Unterschied ist, dass es zwei TaqMan-Sonden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (VIC und FAM) gibt, eine TaqMan-Sonde für *GFI1-36S* (VIC)

und eine für *GFI1-36N* (FAM). Je nachdem welche *GFI1*-Variante von den Patienten exprimiert wurde, wurde bei der RT-PCR der gekoppelte Farbstoff vom Quencher abgespalten und während der Zyklen steigt dessen Intensität. Wurde zum Beispiel nur der FAM-Fluoreszenzfarbstoff während der RT-PCR angereichert, konnte daraus schlussgefolgert werden, dass ein *GFI1-36N/N*-Genotyp vorliegt (Abb. 9).

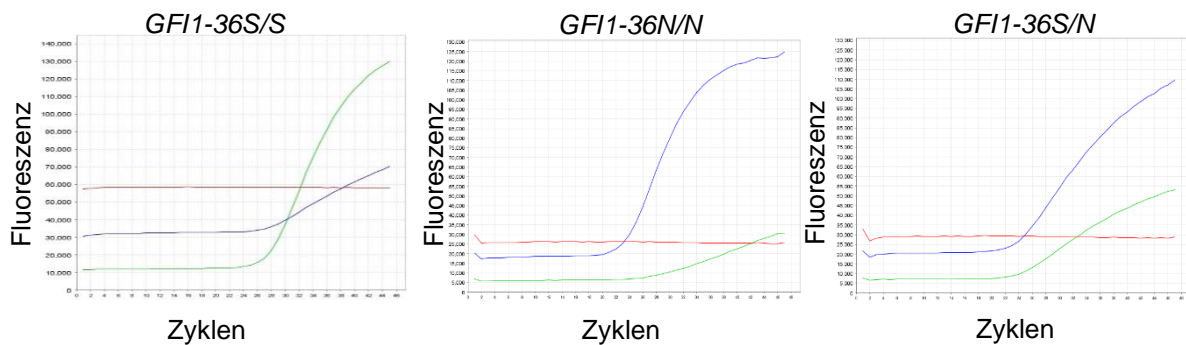


Abbildung 9: Beispiele der Genotypisierung von Patientenproben mittels RT-PCR

Blau: FAM=*GFI1-36N*, Grün: VIC=*GFI1-36S*, Rot: Rox

Für die Genotypisierung wurden dieselben Materialien und Geräte verwendet wie unter 3.2.8.3 beschrieben. Es wurden 25 µl pro Probe wie vom Hersteller angegeben angesetzt, bestehend aus 12,5 µl *TaqMan Genexpressions Master Mix* oder 12,5 µl *TaqMan Genotyping Master Mix*, 0,63 µl SNP-Assay Master Mix, 2 µl DNA-Probe und mit DNase-freiem Wasser aufgefüllt. Die RT-PCR wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

	30 s	60°C
	10 min	95°C
40 Zyklen:	15 s	92°C
	90 s	60°C
	30 s	60°C

3.2.9 Protein-Methoden

3.2.9.1 Protein-Isolation und Konzentrationsbestimmung

Zur Isolation der gesamten Proteine in den Zellen wurde Ripa-Puffer verwendet. Die Zellen wurden je nach Größe des Zellpellets in einem angemessenen Volumen des Ripa-Puffers resuspendiert (für 5×10^6 Zellen 100 µl Ripa-Puffer). Zu der Suspension wurde 1x *Halt Protease Inhibitor Cocktail* (Stammlösung: 100x) hinzugefügt. Danach wurde die Zellsuspension bei 4°C für 30 min auf einem Rotator gedreht und anschließend bei 14.000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand, welcher die Proteine enthält wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt.

Für die Konzentrationsbestimmung der Proteinproben wurde der *Pierce BCA Protein Assay* von Thermo Fisher Scientific verwendet. Das Kit beinhaltet eine BSA-Stocklösung mit einer Konzentration von 2000 µg/ml. Aus dieser Stocklösung wurden Lösungen mit Konzentrationen zwischen 2000 µg/ml (unverdünnt) und 25 µg/ml hergestellt. Diese Verdünnungen dienten als Standardkonzentrationsreihe und wurden zur späteren Berechnung der Proteinkonzentrationen der Proben verwendet. Die Reagenzien A und B aus dem Kit wurden 50:1 (A:B) gemischt und 200 µl der gemischten Lösungen pro Well einer 96-Well Platte pipettiert. Zu den 200 µl wurden entweder 10 µl der unterschiedlichen BSA-Lösungen oder 10 µl der zu messenden Probe pipettiert. Damit die Konzentrationen der Proben innerhalb der BSA-Standardreihe lagen, wurden die Proben teilweise vor Zugabe 1:5 verdünnt. Nach Zugabe der Proben wurde die Platte kurz geschüttelt und anschließend für 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Platte für 10 min bei RT abgekühlt und anschließend gemessen. Für die Messung wurde entweder der *Victor X3 Multimode Plate Reader* oder der *iMark Microplate reader* verwendet.

3.2.9.2 Herstellung von SDS-Gelen für Western Blot-Analysen

Für die Trennung der Proteine wurden SDS-Gele (10%iges Trenngel und 5%iges Sammelgel) verwendet. Zunächst wurde die Lösung für das Trenngel vorbereitet. Für ein Gel wurden 2,94 ml H₂O, 1,5 ml Rotiphorese Gel 40, 1,5 ml Trennpuffer und 60 µl 10% APS verwendet. Zum Schluss wurden 2 µl TEMED hinzugefügt und für 10 s „gevortext“. Anschließend wurde die Lösung in die vorbereitete Vorrichtung („Mini-PROTEAN Tetra Cell Casting Stand & Clamps“) zwischen die Glashalterungen gegossen. Damit der Abschluss des Trenngels gerade war, wurde 1 ml Isopropanol oben darauf pipettiert. In der Zwischenzeit wurde die Lösung für ein Sammelgel wie folgt vorbereitet: 1,46 ml H₂O, 250 µl Rotiphorese Gel 40, 273 µl Sammelpuffer, 20 µl 10% APS. Nachdem das Trenngel geliert war, wurde zu der Lösung für das Sammelgel 2 µl TEMED hinzugefügt und gut „gevortext“. Das Isopropanol wurde vorsichtig abgeschüttelt und die Lösung für das Sammelgel auf das Trenngel pipettiert. Zum Schluss wurde ein Kamm in das Sammelgel gesteckt und gewartet bis das Gel geliert war. Nach dem Gelieren wurde die Glasvorrichtung mit dem enthaltenen Gel in 1x SDS-Running-Puffer gelegt, der Kamm vorsichtig herausgezogen und das Gel max. 2 Wochen bei 4°C bis zur Verwendung gelagert.

3.2.9.3 Western Blot

Der Western Blot wurde verwendet, um Proteinlevel in unterschiedlichen Proben zu untersuchen. Von jeder Probe wurde die gleiche Proteinkonzentration verwendet. Es wurden je nach Western Blot zwischen 10-40 µg Protein eingesetzt. Zu den Proben wurde 1x *NuPAGE LDS sample buffer* und 1x *NuPAGE Reducing Agent* gegeben und mit H₂O auf das zu verwendende Volumen (entweder 25 oder 35 µl) aufgefüllt. Die Proben wurden dann gut gemischt und bei 95°C für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben wenige Sekunden mit einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die SDS-Gele wurden in die Laufkammer gespannt und die innere Kammer sowie die äußere Kammer mit 1x SDS-Runningpuffer gefüllt. Das gesamte Volumen der Protein-Probe wurde vorsichtig in eine Geltasche des SDS-Gels pipettiert. Als Marker zur späteren Größenbestimmung der Proteine wurden 10 µl von *PageRuler Prestained Protein Ladder* oder 10 µl *SeeBlue Plus2 Pre-stained Protein Standard* verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte bei 100 V für 90 min. Im Anschluss fand die Übertragung der Proteine auf die PDVF-Membran statt. Dazu wurde folgender Aufbau verwendet: Schwarze Seite der Kassette; Schwamm, 2 Filterpapiere, Gel, PDVF-Membran, 2 Filterpapiere, Schwamm; weiße Seite der Kassette. Die Kassetten wurden dann in die „Elektrodenanordnung“ (engl.: *electrode assembly*) gespannt und in den Puffertank gesteckt und dieser wurde mit 1x TG-Puffer gefüllt. Die Übertragung der Proteine auf die Membran fand für 2 h bei 100 V und 4°C statt. Danach wurde die Membran mit der Proteinseite nach oben aus der Kassette genommen und mit 5% Milch (Magermilchpulver) in 1x TBS-T-Puffer für 30 min geschüttelt. Dieser Schritt dient zum Blockieren von unspezifischen Bindungen. Danach wurde die Membran 3-mal mit 1x TBS-T-Puffer für 5 min gewaschen. Anschließend wurde der primäre Antikörper in 5% Milch verdünnt und über Nacht bei 4°C auf einer wippenden Platte inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran erneut 3-mal mit 1x TBS-T-Puffer gewaschen und für 1 h mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde die Membran bzw. die Proteine mithilfe des *Lumi-Light Western Blotting Substrate* und dem *Amersham Imager 600* mittels Chemilumineszenz detektiert.

3.2.9.4 Co-Immunpräzipitation

Zur Untersuchung von direkten Protein-Protein-Wechselwirkungen wurden Co-Immunpräzipitationen (Co-IP) durchgeführt. Dafür wurde das *Pierce Classic Magnetic IP/Co-IP* Kit von Thermo Fisher Scientific verwendet und die Durchführung des

Versuchs fand genau nach Angaben des Herstellers statt. Für die Bildung des Immunkomplexes wurden 2 bzw. 5 µg des jeweiligen Antikörpers verwendet und 500 bzw. 750 µg Protein. Die Elution fand mittels niedriger-pH-Elution statt. Die anschließende Separierung der Proteine fand mittels SDS-Page statt und der Western Blot und die anschließende Detektion wurden genau wie unter 3.2.9.3 beschrieben durchgeführt.

3.2.9.5 Proteomik

Zur Untersuchung der Level an unterschiedlichen Proteinen in den Zellen wurden Proteomik-Analysen durchgeführt. Zunächst wurden $1-2 \times 10^6$ Zellen bzw. zur Herstellung der *Library* 30×10^6 Zellen gesammelt und bei 350 g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Zellpellet zweimal mit PBS gewaschen. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Zellpellets bei -80°C gelagert. Danach wurden die Proteomik-Analysen von Herr Dr. Ashok Kumar Jayavelu (Max-Planck-Institut für Biochemie in München) durchgeführt (Coscia et al., 2018).

3.2.10 DNA-Reparatur Methoden

3.2.10.1 Bestrahlung von Zellen

Die Bestrahlung der Zellen diente zum Induzieren von DNA-Schäden. Sie wurde mit dem *X-Ray System X-RAD320* am Universitätsklinikum Essen (Prof. Dr. George E. Iliakis, Institut für medizinische Strahlenbiologie) oder mit dem Faxitron CP-160-Gerät bzw. MultiRad 225 von Precision der ZTE Münster durchgeführt. Die Zellen wurden unter normalen Bedingungen (Standardmedium für die jeweiligen Zellen und 1×10^6 Zellen/ml) ausplattiert und dann mit der gewünschten Bestrahlungsdosis bestrahlt.

3.2.10.2 γ H2AX-Assay (Immunfluoreszenz)

Zur Überprüfung von DNA-Schäden wurde der γ H2AX-Assay durchgeführt. Einen Tag vor der Durchführung des Versuches wurden mithilfe des *Liquid Blocker Pen* (Sigma-Aldrich) Quadrate auf *ImmunoSelect* Adhäsionsobjektträger (Squarix) gezeichnet, welche später als Begrenzung der unterschiedlichen Proben dienten. DNA-Schäden wurden durch die Bestrahlung der Zellen induziert (siehe 3.2.10.1). Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Bestrahlung wurden die Zellen (ca. 1×10^6 Zellen) gesammelt und bei 1000 g und 4°C für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 500 µl kaltem PBS gewaschen (1000 g, 4°C, 3 min). Danach wurde das Zellpellet in 100 µl PBS resuspendiert und auf den

Objektträger pipettiert. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde der Objektträger vorsichtig mit PFA-Lösung bedeckt. Die Zellen wurden für 15 min bei RT mit der PFA-Lösung fixiert. Anschließend wurde die PFA-Lösung abgenommen und 6 ml P-Lösung auf den Objektträger gegeben. Die Zellen wurden für 5 min bei 4°C mithilfe der P-Lösung permeabilisiert. Nach der Inkubationszeit wurde die P-Lösung abgesaugt und der Objektträger mit PBS gewaschen. Nach dem Waschschrift wurde der Objektträger in PBG-Lösung gelegt. Das Blockieren mithilfe der PBG-Lösung fand über Nacht bei 4°C statt. Am nächsten Tag wurde die PBG-Lösung abgenommen und der Objektträger zweimal mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurde der primäre Antikörper (*Anti-gamma H2A.X (phospho S140) antibody* von Abcam) 1:300 in PBG-Lösung verdünnt und 100 µl des Antikörpers pro Quadrat verwendet. Der primäre Antikörper wurde für 90 min bei RT inkubiert und die Objektträger anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurde der sekundäre Antikörper (*Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG* von Thermo Fisher Scientific) 1:400 verdünnt und ebenfalls 100 µl pro Quadrat verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 90 min bei RT (im Dunkeln) wurde der Objektträger erneut mit PBS gewaschen. Für die DAPI-Färbung wurde der Objektträger in 100 ng/ml DAPI-Lösung gelegt und 10 min bei RT (im Dunkeln) inkubiert. Die Objektträger mit den gefärbten Zellen wurden dann mithilfe des Eindeckmediums mit einem Deckglas bedeckt. Bis zur Analyse mithilfe des *Zeiss ELYRA PS.1 Super-Resolution* Mikroskops wurden die Objektträger bei 4°C aufbewahrt. Die Analyse der γ H2AX-Foci fand mittels Imaris-Software statt.

3.2.10.3 Comet-Assay

Zur Überprüfung des DNA-Schadens auf DNA-Ebene wurde der alkalische Comet-Assay verändert nach Olive & Banáth 2006 durchgeführt (Olive and Banáth, 2006). Am Tag vor dem eigentlichen Comet-Assay wurden die Objektträger mit 1%iger Agarose beschichtet. Hierzu wurden Objektträger (zweimal im Abstand von 10 min) in warme Agaroselösung getaucht. Die Objektträger wurden bei RT gelagert bis die Agarose komplett trocken war und dann über Nacht bei 37°C aufbewahrt. Am Tag des Comet-Assays wurden 30.000 Zellen/Bedingung in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bei 350 g, 4°C für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 120 µl 1%iger *low gelling temperature* Agarose (von Sigma-Aldrich) resuspendiert und sofort der Länge nach auf die mit Agarose beschichteten Objektträger gegeben. Dann wurde ein Deckglas vorsichtig auf den Objektträger gelegt, um die Agarose-Zellsuspension zu verteilen. Nach 10 min bei 4°C wurde das Deckglas vorsichtig vom Objektträger abgenommen und die Objektträger wurden in eine Mikroskop-Objektträger Färbepalette

gelegt. Danach wurden die Objektträger für 1 h bei 4°C im Dunkeln in frisch hergestelltem A1 Lyse-Puffer inkubiert. Nach 1 h wurde der Lyse-Puffer vorsichtig abgenommen und mit frischem A2-Puffer ausgetauscht. Die Objektträger mit den Zellen wurden mit dem A2-Puffer für 20 min bei RT inkubiert. Die Inkubation mit dem A2-Puffer fand zweimal statt. Anschließend wurden die Objektträger in eine Elektrophoresekammer, welche mit A2-Puffer gefüllt war, gelegt und eine Elektrophorese für 25 min bei 0,6 V/cm durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurden die Objektträger kurz in abs. Ethanol gelegt und dann bei RT getrocknet. Zum Schluss wurden 60 µl einer 50 µg/ml Propidiumiodid (PI)-Lösung auf dem Objektträger verteilt und das Ganze mit einem Deckglas (24x 60 mm) bedeckt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte am selben Tag oder einige wenige Tage nach der Färbung mit dem *Zeiss AxioObserver.Z1*. Zur Auswertung der Bilder wurde die *OpenComet* und die *CaspLab Comet-Assay* Software verwendet (Gyori et al., 2014).

3.2.10.4 RT² Profiler Array

Für die Überprüfung der Genexpression von 84 Genen, welche in DNA-Schadenssignalwegen eine Rolle spielen, wurde der *RT² Profiler™ PCR Array (Mouse DNA Damage Signaling Pathway)* von Qiagen) wie im Herstellerprotokoll beschrieben, durchgeführt. Im Gegensatz zu der RT-PCR mit TaqMan-Primern (siehe 3.2.8.3) wurde hier der DNA-Farbstoff SYBR Green verwendet. Der Farbstoff lagert sich in doppelsträngige DNA ein und das Fluoreszenzsignal wird durch die Anhäufung des PCR-Produkts im Laufe der RT-PCR stärker (Farrell, 2005). Zunächst wurde cDNA mit dem *RT² First Strand Kit* (Qiagen) nach Herstellerprotokoll synthetisiert. Es wurden 500 ng RNA eingesetzt. Nach der cDNA-Synthese wurde die cDNA bei -20°C bis zur Durchführung der RT-PCR gelagert. Am Tag der RT-PCR wurde folgender Mastermix angesetzt:

1350 µl	<i>RT² SYBR Green qPCR Mastermix</i>
102 µl	cDNA
1248 µl	RNase-freies Wasser

Von diesem Mastermix wurden 25 µl in jedes Well der 96-Well-Platte des *RT² Profiler™ PCR Array* pipettiert und anschließend gut mit einer Folie verschlossen. Die Platte wurde für 1 min bei 1000 g und RT zentrifugiert. Anschließend wurde die RT-PCR mit dem *StepOnePlus Real-Time PCR System* durchgeführt. Auf jeder Platte wurden mehrere Kontrollen (genomische DNA-Kontrolle, Reverse-Transkriptions-Kontrolle und eine positive PCR Kontrolle) sowie 5 Haushaltsgene

(engl.: *housekeeping genes*) getestet. Letztere dienten zur Normalisierung der Ergebnisse. Die Auswertung fand mithilfe des *GeneGlobe Data Analysis Center* von Qiagen statt.

3.2.10.5 Funktioneller MGMT-Assay (Immunfluoreszenz)

Zur Überprüfung der MGMT-vermittelten Reparatur (O6-MeG-Läsionen) wurde der funktionelle MGMT-Assay verwendet. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit Temozolomid (50 µg/ml oder 100 µg/ml) behandelt. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die Zellen gesammelt, die Zellzahl bestimmt und die Zellen bei 350 g, 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet zweimal mit PBS gewaschen (350 g, 4°C für 5 min). Das Zellpellet wurde in PBS mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml resuspendiert und 10 µl der Zellsuspension wurden auf einen *SuperFrost Ultra Plus™ GOLD* Adhäsionsobjektträger pipettiert. Nachdem der Zellsuspensionstropfen komplett getrocknet war, wurden die Objektträger bei -20°C bis zur Färbung aufbewahrt (Melnikova and Thomale, 2018). Die Färbung wurde in Zusammenarbeit mit Herr PD Dr. Jürgen Thomale am Universitätsklinikum in Essen durchgeführt. Die Objektträger mit den Zellen wurden zunächst für 30 min bei -20°C in Methanol fixiert und danach für 5 min in PBS gewaschen. Danach wurden die Objektträger für 5 min bei 4°C in Alkali-Lösung inkubiert und erneut mit PBS (5 min) gewaschen. Zum Verdau der Zellen wurden die Objektträger für 10 min bei 37°C mit Pepsin-Lösung inkubiert. Nach anschließendem Waschen in PBS (5 min) wurden die Objektträger in Proteinase-K-Lösung (10 min, 37°C) gegeben. Danach wurden die Objektträger in 2 mg/ml Glycin-Lösung (10 min, RT) gegeben. Dann wurden die Objektträger, zum Blockieren von unspezifischen Bindungen, 30 min bei RT in 5% Milch gelegt. Nach anschließendem Waschen in PBS wurde der primäre Antikörper (*mAb to O6-methyl-2-deoxyguanosine (EM 2-3)*) über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Objektträger zunächst mit PBS-T und anschließend mit PBS gewaschen. Dann wurde der sekundäre Antikörper (*Cy™3 AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG*) für 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer auf die Zellen gegeben. Danach wurde erneut mit PBS-T und anschließend mit PBS gewaschen. Zum Schluss wurden die Zellen mit 1 µg/ml DAPI-Lösung gefärbt (30 min bei RT). Vor dem „Eindeckeln“ der Zellen mit einem Deckglas wurden die Objektträger mit PBS gewaschen. Bis zur Analyse wurden die Objektträger mit den gefärbten Zellen bei 4°C gelagert. Für die Auswertung wurde das Bildanalysesystem ACAS verwendet. Das Programm berechnet die Intensität der DAPI-Färbung, die Intensität von Cy3 sowie die Fläche der Zellen berechnet. Für die

spätere Analyse der Daten wurde die Intensität von Cy3 relativ zur DAPI-Intensität berechnet (AFU (engl.: *arbitrary fluorescence units*)-Werte) (Melnikova and Thomale, 2018).

3.2.10.6 Homologer-Rekombinations-Assay

Zur Überprüfung der Homologen-Rekombination in den Zellen wurde der *Homologous Recombination Assay Kit* (von Norgen Biotek) durchgeführt. Das Kit beinhaltet drei Plasmide (dl1, dl2 und ein positives Kontrollplasmid). Werden Zellen mit dem dl1- und dl2-Plasmid ko-transfiziert kann die Fähigkeit der Zellen, die HR durchzuführen, mittels RT-PCR, gemessen werden. Der *Universal Primer Mix* amplifiziert das Produkt aus dl1 und dl2, welches durch die HR entsteht. Als negative Kontrollen wurden die Zellen nur mit einem der Plasmide transduziert. Zur Normalisierung der RT-PCR-Ergebnisse wurden die gleichen Proben mit einem weiteren Primer Mix (*Universal Primer Mix*) amplifiziert. Dieser Primer-Mix dient zur Detektion des Rückgrates der Plasmide. Das *Homologous Recombination Assay Kit* wurde wie im Herstellerprotokoll beschrieben durchgeführt. Zur Transfektion der Zellen wurde *Lipofectamin 2000* von Invitrogen verwendet. Die Zellen wurden transfiziert, sobald diese 70-90% konfluent waren. Es wurden zwei Eppendorf-Gefäße vorbereitet:

- a.) 50 µl Opti-MEM + 4 µl Lipofectamin 2000
- b.) 50 µl Opti-MEM + 0,5 µg Plasmid (10 µl).

Die Lösung a.) wurde unter „Vortexen“ langsam in Lösung b.) gegeben und für 20 min bei RT inkubiert. Danach wurden 100 µl des Transfektionsmix zu den Zellen gegeben. Am nächsten Tag (min. 12 h später) wurde die DNA wie in 3.2.8.1 beschrieben isoliert. Als Mastermix für die RT-PCR wurden 10 µl *Luna® Universal qPCR Master Mix* (NEB), 2 µl Assay Primer Mix, 30 ng DNA verwendet und mit Nuklease-freiem Wasser auf 20 µl (pro Well) aufgefüllt. Die RT-PCR wurde wie folgt durchgeführt:

3 min 95°C
15 s 95°C
15 s 61°C
15 s 72°C

Es wurden 40 Zyklen durchlaufen und eine Schmelzkurve generiert.

3.2.11 Überprüfung von Therapieoptionen (Medikamentenstudien)

Es wurden in dieser Studie Olaparib (von Selleck Chemicals), Temozolomid (von Sigma-Aldrich) sowie deren Kombination getestet. Beide Substanzen wurden zunächst in DMSO gelöst und ggf. mit PBS weiter verdünnt. Olaparib wurde in gelöster

Form (10 mM) bei -80°C aufbewahrt. Von Temozolomid wurden 20 mg/ml Stocklösungen hergestellt.

3.2.11.1 Methylcellulose-Assay (CFU-Assay) für murine Zellen

Zur Überprüfung der Proliferation und der Differenzierung von leukämischen und nicht leukämischen murinen Knochenmarkzellen wurde der koloniebildende Einheiten (engl.: *colony forming unit*; CFU)-Assay durchgeführt. Dazu wurde das *Methocult Medium* (M3434) von StemCell verwendet. Dieses Medium beinhaltet alle rekombinanten Zytokine und es wurden keine zusätzlichen Zytokine hinzugefügt. Das Medium wurde vor dem Ausplattieren mit 1% P/S versetzt. Für eine Probe wurde 1 ml Methocult-Medium/Well einer 6-Well Platte verwendet. Ausplattiert wurden $0,5 \times 10^4$ oder 1×10^4 Zellen/ml. Die Zellen wurden in IMDM + 2% FBS resuspendiert und dann im Verhältnis von 1:10 zum Medium hinzugegeben (100 µl Zellsuspension in 1000 µl Medium). Nach Zugabe des P/S, der Zellen und ggf. der Medikamente wurde die Suspension gut „gevortext“ und für einige Minuten stehen gelassen. Zum Ausplattieren wurden *Blunt-End Needles* (16 G) von StemCell verwendet. Die Kolonien wurden nach 7 und 14 Tagen unter einem Lichtmikroskop gezählt. Für eine leichtere Auszählung wurde das *STEMgrid-6* verwendet.

3.2.11.2 Methylcellulose-Assay (CFU-Assay) für humane Zellen

Zur Untersuchung des Wachstums und der Differenzierung von Knochenmark- oder peripheren Blutzellen von AML/MDS-Patienten wurde das MethoCult-Medium H4434 Classic (von Stemcell) verwendet. Die hierfür verwendeten AML-Patientenproben wurden von Herr Prof. Dr. Michael Heuser (medizinische Hochschule Hannover) und von Frau Prof. Dr. Irmela Jeremias (Helmholtz Zentrum München) zur Verfügung gestellt. Die Genotypisierung der humanen Proben fand wie unter 3.2.8.5 beschrieben statt. Die Durchführung des CFU-Assays fand genau wie unter 3.2.11.1 beschrieben statt. Es wurden 5.000 Zellen/ml ausplattiert. Die Kolonien wurden nach 7 und 14 Tagen gezählt. Zur Bestimmung der Zellzahl nach 14 Tagen wurde das Methocult-Medium mit den Zellen in warmem PBS resuspendiert und anschließend zentrifugiert (350 g, 5 min, RT). Danach wurde noch zweimal mit PBS gewaschen, um möglichst das gesamte Methocult-Medium zu entfernen. Anschließend wurde die Zellzahl mittels Neubauer-Kammer bestimmt (siehe 3.2.2.2).

3.2.11.3 Apoptose-Assay

Zur Überprüfung der Anzahl an apoptotischen sowie toten Zellen wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Hierzu wurden die Zellen mit Annexin V und

PI gefärbt. Annexin V markiert apoptotische Zellen, da der Antikörper an Phosphatidylserin (PS) bindet. Bei apoptotischen Zellen befindet sich das normalerweise intrazelluläre PS, extrazellulär und kann somit von Annexin V gebunden werden (Vermes et al., 1995). Mit PI können die toten Zellen detektiert werden. Die Zellmembran lebender Zellen ist intakt und somit undurchlässig für den Farbstoff (Vermes et al., 1995; Vermes et al., 2000). Die zu analysierenden Zellen wurden entweder in FACS-Röhrchen überführt und mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen (350 g, 5 min, 4°C) oder direkt in 96-Well-Platten gefärbt. Danach wurden 200 µl (pro Well) bzw. 300 µl (FACS-Röhrchen) 1x Annexin-Binding Puffer zu den Zellen pipettiert und 5 µl Annexin-APC Antikörper/ml sowie 5 µl PI-Lösung (Stock: 50 µg/ml)/ml hinzugefügt. Nach 10 min Inkubationszeit konnten die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert werden.

3.2.11.4 MTT-Assay (Zellproliferation)

Zur Bestimmung der Zellproliferation und der Zellviabilität nach der Behandlung bzw. der Zytotoxizität der Behandlung auf die Zellen wurden MTT-Assays (MTT= 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) durchgeführt (Mosmann, 1983). Hierfür wurde das MTT-Assay Kit (Cell Proliferation) von Abcam verwendet. Das Kit wurde wie im Herstellerprotokoll beschrieben durchgeführt. Die Zellen wurden in 96-Well-Platten mit einer Konzentration von $3 \cdot 10^5$ Zellen/ml ausgesät und pro Well wurden 200 µl der Zellsuspension verwendet. Für die Kultivierung der Zellen wurde IMDM + 20% FBS + 1% P/S + 10 ng/ml IL-3 + 10 ng/ml IL-6 + 20 ng/ml mSCF verwendet, welches für die spätere Messung mit IMDM ohne Zusätze ersetzt wurde. Die Absorption wurde bei einer optischen Dichte von 590 nm gemessen. Als Hintergrundkontrollen wurde die Absorption des Mediums ohne Zellen gemessen. Für die Berechnung der Zellviabilität wurde folgende Formel angewendet:

Zellviabilität (korrigierte Absorption)

= Absorption Probe – Absorption Hintergrundkontrolle

3.2.12 Bioinformatische und Statistische Analysen

Für die statistischen Analysen wurde GraphPad Prism 6 verwendet. Als statistisch signifikant wurden p-Werte oder q-Werte unter 0,05 angenommen. P-Werte $\leq 0,05$ wurden mit *, p-Werte $\leq 0,01$ mit **, p-Werte mit $\geq 0,001$ mit *** und p-Werte mit $\leq 0,0001$ mit **** gekennzeichnet.

Zur Analyse der RNA-Sequenzierungsdaten wurde GSEA 7.1 (Subramanian et al., 2005) verwendet. Bei der GSEA wurde aus der *Molecular Signatures Database* v7.1 (MSigDB) die „*hallmark gene sets*“ analysiert (Liberzon et al., 2015). Für die Analysen der differentiell exprimierten Gene (DEG) aus den RNA-Sequenzierungsergebnissen wurde Salmon (Patro et al., 2017) und DEGseq2 (Love et al., 2014) benutzt. Zur Berechnung der Signifikanz von einzelnen Signalwegen aus einer Liste von Genen/Proteinen wurde einerseits die „open-source“-Datenbank Reactome (Fabregat et al., 2016) verwendet und andererseits wurden die Netzwerk-Analysen mit dem Plug-In ClueGO für Cytoscape durchgeführt (Shannon et al., 2003; Bindea et al., 2009). Bei letzterem wurden die Quellen „GO_BiologicalProcess-EBI-UniProt-GOA-ACAP-ARAP_08.05.2020_00h00“, „WikiPathways_08.05.2020“, „KEGG_08.05.2020“ und „REACTOME_Pathways_08.05.2020“ verwendet. Für die Analyse von potenziellen Gfi1-Zielgenen wurden verfügbare Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)-Sequenzierungs-Datensätzen von Gfi1 aus CODEX (GSE31657 (Khandanpour et al., 2012), GSE69101 (Goode et al., 2016), GSE50806 (Spooner et al., 2013) und GSE42518 (Moignard et al., 2013)) verglichen (Sánchez-Castillo et al., 2015). Mit Hilfe des UCSC Genome Browsers wurden die Ergebnisse der ChIP-Sequenzierungs-Datensätze näher untersucht (Kent et al., 2002).

Die bioinformatischen Analysen und statistischen Auswertungen der RNA-Sequenzierungsergebnisse und Proteomik-Ergebnissen wurde in Zusammenarbeit mit der Bioinformatikerin Lanying Wei (Medizinische Klinik A des Universitätsklinikums Münster und Institut für Medizinische Informatik der Universität Münster) durchgeführt.

4 Ergebnisse

In der gesamten Arbeit werden die Knock-in (KI)-Mäuse, welche anstelle des murinen *Gfi1*-Gens das humane *GF11-36S*-Gen exprimieren im Folgenden als „*GF11-36S*“ bezeichnet. Die KI-Mäuse, welche die humane *GF11-36N*-Variante exprimieren werden als „*GF11-36N*“ bezeichnet. Im weiteren Text werden homozygote KI-Mäuse mit „ki/ki“, heterozygote Tiere mit „+/ki“ und Mäuse nur mit murinem Allel als „*Gfi1*-WT“ gekennzeichnet.

4.1 *GF11*-KD- und *GF11-36N*-leukämische Zellen sind anfälliger gegenüber genetischen Veränderungen

Humane Träger der *GF11-36N*-Variante haben ein 1,6-fach erhöhtes Risiko einer AML-Erkrankung (Khandanpour et al., 2010; Khandanpour et al., 2012). Sowohl die *GF11-36N*-Variante als auch niedrige *GF11*-Level gehen mit einer schlechten Prognose einher (Hönes et al., 2016; Botezatu et al., 2016b). Die AML-prädisponierende Rolle von *GF11-36N* ist noch nicht vollständig geklärt. Eine Rolle hierbei spielen epigenetische Veränderungen, welche mit der Präsenz von *GF11-36N* einhergehen (Botezatu et al., 2016b). Es gibt jedoch weitere Hinweise, dass *GF11* auch eine Rolle bei der DNA-Reparatur spielt (Khandanpour et al., 2013; Botezatu et al., 2016b; Vadnais et al., 2018). Veränderungen in der DNA-Reparatur führen häufig zur Entstehung von genomischer Instabilität (Negrini et al., 2010; Tubbs and Nussenzweig, 2017). Es wäre demnach denkbar, dass eine geringe Expression von *GF11* oder die Expression von *GF11-36N* mit genomischer Instabilität einhergeht. Dies könnte das erhöhte Risiko sowie die schlechte Prognose von MDS/AML-Patienten mit verändertem *GF11*-Status erklären. Zur Überprüfung, ob *GF11* bei der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität in hämatopoetischen Zellen mitverantwortlich ist, wurden primäre humane leukämische Zellen mit *GF11-36S*- und *GF11-36N*-Genotyp sowie leukämische Zellen aus AML-Mausmodellen mit *GF11-36S*- und *GF11-36N*-Genotyp sowie niedrigem *GF11*-Level untersucht.

4.1.1 MDS/AML-Patienten mit *GF11-36N*-Genotyp haben mehr zytogenetische Aberrationen

Zuerst wurden MDS/AML-Patientenproben untersucht, ob die Patienten Träger des *GF11-36S* oder *GF11-36N* sind. Dann wurde die Korrelation zwischen *GF11-36N* und der Anzahl an chromosomalen Aberrationen, basierend auf den bereits in der Klinik durchgeführten zytogenetischen Analysen, ermittelt. Die analysierten Patientenproben

kamen aus Essen, Hannover und Dresden (siehe 3.2.8.5). Zur Untersuchung des Einflusses der *GFI1-36N*-Variante wurden die Proben zunächst mittels RT-PCR genotypisiert, um herauszufinden welche Patienten Träger des *GFI1-36S/S*, *-36S/N* bzw. *-36N/N* waren. Die Genotypisierung ergab, dass in $13,4 \pm 4,5\%$ der Patienten *GFI1-36S/N* vorhanden war. Das Ergebnis stimmt mit früheren Untersuchungen der Häufigkeit der *GFI1-36N*-Variante in MDS/AML-Patienten überein (Khandanpour et al., 2010; Botezatu et al., 2016a). Lediglich drei Patienten (0,5% der gesamten Patienten) aus der Hannover-Kohorte hatten einen homozygote *GFI1-36N/N*-Genotyp. Der Anteil an weiblichen und männlichen Patienten war in allen Kohorten ausgeglichen und lag im Schnitt bei einem prozentualen Verhältnis von $51,95 (\pm 3,66):48,08 (\pm 3,66)$. Das Verhältnis von Frauen zu Männern lag bei den *GFI1-36S/S*-Patienten bei $51,6 (\pm 4,8):48,4 (\pm 4,8)$ und bei den *GFI1-36S/N*-Patienten bei $52,3 (\pm 1,9):47,7 (\pm 1,9)$ (Tab. 13). Somit konnte ein geschlechtsspezifischer Einfluss auf die Untersuchung ausgeschlossen werden. Die Patienten waren bei der Erstdiagnose (ED) im Schnitt 57,1 Jahre ($\pm 11,5$ Jahre, zwischen 17-86 Jahren) alt. Es gab keinen großen Altersunterschied bei ED zwischen den beiden Genotypen. Bei den *GFI1-36S/S*-Patienten lag der Altersdurchschnitt bei der ED bei $57,5 \pm 11,5$ Jahren und bei den *GFI1-36S/N*-Patienten bei $56,8 \pm 11,5$ Jahren (Tab. 13).

Tabelle 13: Geschlecht und Alter der genotypisierten MDS/AML-Patienten

Aufgelistet ist das Geschlecht (w= weiblich, m= männlich) in Prozent und das Alter bei Erstdiagnose (ED) wurde in Jahren \pm SD angegeben. Bei einigen Patienten war keine Angabe zu den aufgelisteten Daten vorhanden, daraus ergeben sich folgende Patientenzahlen für die Kohorten: Essen *GFI1-36S/S*: n=88, *GFI1-36S/N*: n=21; Hannover: *GFI1-36S/S*: n=278, *GFI1-36S/N*: n=22; Dresden *GFI1-36S/S*: n=108, *GFI1-36S/N*: n=16

Kohorte	Genotyp	Geschlecht [%]	Alter ED (\pm SD)
Essen	<i>GFI1-36S/S</i>	w= 48,9% m= 51,1%	55,0 (\pm 14,4) 55,9 (\pm 14,6)
	<i>GFI1-36S/N</i>	w= 52,4% m= 47,6%	51,5 (\pm 13,7) 47,8 (\pm 17,2)
Dresden	<i>GFI1-36S/S</i>	w= 58,3% m= 41,7%	72,2 (\pm 4,7) 72,6 (\pm 5,5)
	<i>GFI1-36S/N</i>	w= 50,0% m= 50,0%	71,3 (\pm 3,6) 74,5 (\pm 5,6)
Hannover	<i>GFI1-36S/S</i>	w= 47,5% m= 52,5%	43,4 (\pm 11,1) 45,6 (\pm 11,0)
	<i>GFI1-36S/N</i>	w= 54,6% m= 45,4%	48,7 (\pm 12,4) 47,0 (\pm 11,6)

Nach der Genotypisierung wurden die Karyotypen hinsichtlich der Anzahl an chromosomalen Aberrationen stratifiziert und basierend darauf in zwei Gruppen eingeteilt, Patienten mit ≤ 2 Aberrationen und Patienten mit mehr als 2 Aberrationen. In Abbildung 10 sind die Patientengruppen mit mehr als 2 Aberrationen dargestellt. Berechnet wurde der prozentuale Anteil der Patienten mit mehr als 2 Aberrationen zur Gesamtanzahl an Patienten (Patienten mit > 2 Aberrationen + Patienten mit ≤ 2 Aberrationen). Die MDS/AML-Patienten mit heterozygotem *GFI1-36S/N*-Genotyp zeigten in allen drei Kohorten signifikant ($p \leq 0,040$) mehr chromosomale Aberrationen als die Patienten mit homozygotem *GFI1-36S/S*-Genotyp (Abb. 10). Die Signifikanz wurde mittels exaktem Fisher-Test berechnet. Dieses Ergebnis ist ein erster Hinweis darauf, dass *GFI1-36N*-leukämische Zellen mehr genetische Veränderungen als *GFI1-36S*-leukämische Zellen haben.

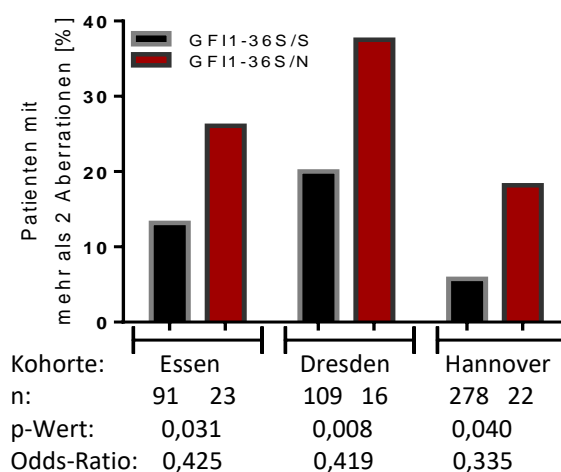


Abbildung 10: MDS/AML-Patienten mit *GFI1-36S/N*-Genotyp hatten eine höhere Anzahl an Chromosomenaberrationen

Dargestellt ist die prozentuale Anzahl der Patienten aus drei Kohorten, welche bei den zytogenetischen Analysen mehr als 2 chromosomale Aberrationen zeigten. Die Differenz zu 100%, der hier dargestellten Werte, sind Patienten mit ≤ 2 chromosomalen Aberrationen. Die p-Werte sowie die Odds-Ratios wurden mit dem exakten Test nach Fisher berechnet.

4.1.2 Murine leukämische Zellen mit geringem GFI1-Level oder mit *GFI1-36N*-Genotyp zeigen mehr genetische Veränderungen und Veränderungen bei der Expression von DNA-Reparaturgenen

Zur Überprüfung der Ergebnisse der MDS/AML-Patienten wurden, Mäuse seriell mit leukämischen *MLL-AF9*-Knochenmarkzellen transplantiert. Dafür wurden Knochenmarkzellen von *Gfi1*-WT-, *GFI1-36S*-, *GFI1-36N*- sowie *GFI1-KD*-Mäusen zunächst retroviral mit dem *MLL-AF9-Plasmid* transduziert und anschließend seriell in C57BL/6-Mäuse transplantiert. Durch die serielle Transplantation haben die leukämischen Zellen die Möglichkeit sich weiterzuentwickeln und den Prozess der klonale Evolution zu durchlaufen. Sobald die Mäuse Anzeichen einer Leukämie aufwiesen (anämische Pfoten, Apathie, zerzaustes Fellhaar o.Ä.) wurden die Tiere aus dem Versuch genommen und peripheres Blut sowie Knochenmark- und Milzzellen für die jeweiligen Versuche isoliert.

In Abbildung 11 wurde das Überleben eines Teiles der in der Arbeit verwendeten Mäuse dargestellt. Die *GFI1-36N-MLL-AF9*-Mäuse haben eine signifikant verkürzte Überlebenszeit gegenüber *GFI1-36S-MLL-AF9*- ($p^{**}=0.0084$) und *Gfi1*-WT-*MLL-AF9*-Mäusen ($p^*=0,0109$). Das mittlere Überleben der mit *Gfi1*-WT-*MLL-AF9*-Zellen transplantierten Mäuse lag bei 26 Tagen (19-51 Tagen), das der mit *GFI1-36S-MLL-AF9*-Zellen transplantierten Mäuse bei 28 Tagen (15-43 Tagen), das der mit *GFI1-36N-MLL-AF9*-Zellen transplantierten Mäuse bei 22 Tagen (15-35 Tagen) und das der mit *GFI1-KD-MLL-AF9*-Zellen transplantierten Mäuse bei 35,5 Tagen (32-43 Tagen) (Abb. 11).

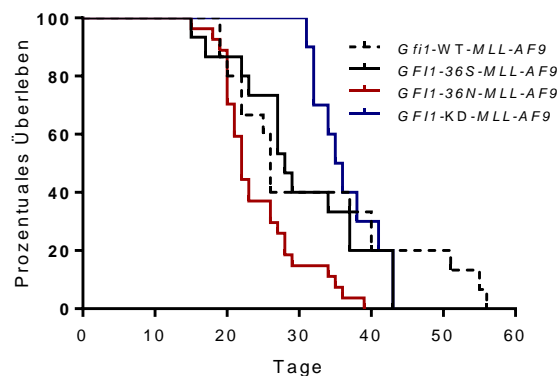


Abbildung 11: Überlebenskurven der transplantierten *Gfi1*-WT-, *GFI1-36S*-, *GFI1-36N*- und *GFI1-KD-MLL-AF9*-Mäusen

Dargestellt sind die Überlebenskurven eines Teiles, der in der Arbeit verwendeten transplantierten *MLL-AF9*-Mäusen. *Gfi1*-WT-*MLL-AF9*: $n=15$; *GFI1-36S*: $n=15$; *GFI1-36N-MLL-AF9*: $n=26$; *GFI1-KD-MLL-AF9*: $n=10$; *GFI1-36S*- vs. *GFI1-36N-MLLAF9*: $p^{**}=0,0084$; WT-*Gfi1-36S*- vs. *GFI1-36N-MLLAF9*: $p^*=0,0109$.

Nachdem die Mäuse euthanasiert wurden, wurde das Knochenmark für die weiteren Untersuchungen entnommen. Zur Überprüfung, ob die Mäuse tatsächlich eine Leukämie entwickelt hatten, wurden unterschiedliche Untersuchungen durchgeführt. Zum einen wurden FACS-Analysen zur Überprüfung der Anteile an GFP⁺-, Gr-1⁺-, CD11b⁺- bzw. Gr-1⁺/CD11b⁺- sowie c-Kit⁺-Zellen im PB, im Knochenmark und teilweise in der Milz durchgeführt. In Abb. 12 sind beispielhafte Analysen von Knochenmarkszellen aus leukämischen und nicht leukämischen Mäusen dargestellt. Vor der primären Transplantation wurden Lin⁻-Zellen mit dem *MLL-AF9*-Plasmid transduziert (siehe 3.2.1.5 & 3.2.5). Dieses Plasmid enthält eine für GFP kodierende Sequenz (Botezatu et al., 2016b). Deshalb gab der Anteil an GFP⁺-Zellen einen Aufschluss darüber, ob die zuvor transplantierten Zellen angewachsen waren und wie hoch der Anteil an leukämischen *MLL-AF9*-Zellen war (Abb. 12 A). Gr-1 und CD11b sind beides Marker der myeloischen Linie (Cruse et al., 2004; Peranzoni et al., 2010; Schmitt and Engel, 2020). In den AML-Mäusen war der Anteil an monozytoiden Zellen (CD11b⁺Gr1^{mittel}) höher als in nicht leukämischen Zellen und der Anteil an Granulozyten (CD11b⁺Gr1^{hoch}) war im leukämischen Knochenmark niedriger als im Knochenmark der nicht leukämischen Mäuse (Abb. 12 B) (Peranzoni et al., 2010). Der Anteil an c-Kit⁺-Zellen im Knochenmark war in den leukämischen Mäusen signifikant höher als in den nicht leukämischen Kontrollmäusen (Abb. 12 C & D). Zwischen dem *GFI1-36S*- und *GFI1-36N-MLL-AF9*-Genotyp gab es keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf den Anteil an c-Kit⁺-Zellen im Knochenmark (Abb. 12 D). Von einer AML wird gesprochen, wenn der Anteil an Blasten mit myeloiden Oberflächenmarkern bei 20% liegt (Estey and Döhner, 2006). Zur Bestimmung des Anteils an Blasten im Knochenmark der transplantierten Mäuse wurden deshalb neben den FACS-Analysen Cytospin-Auswertungen durchgeführt (Abb. 12 E)

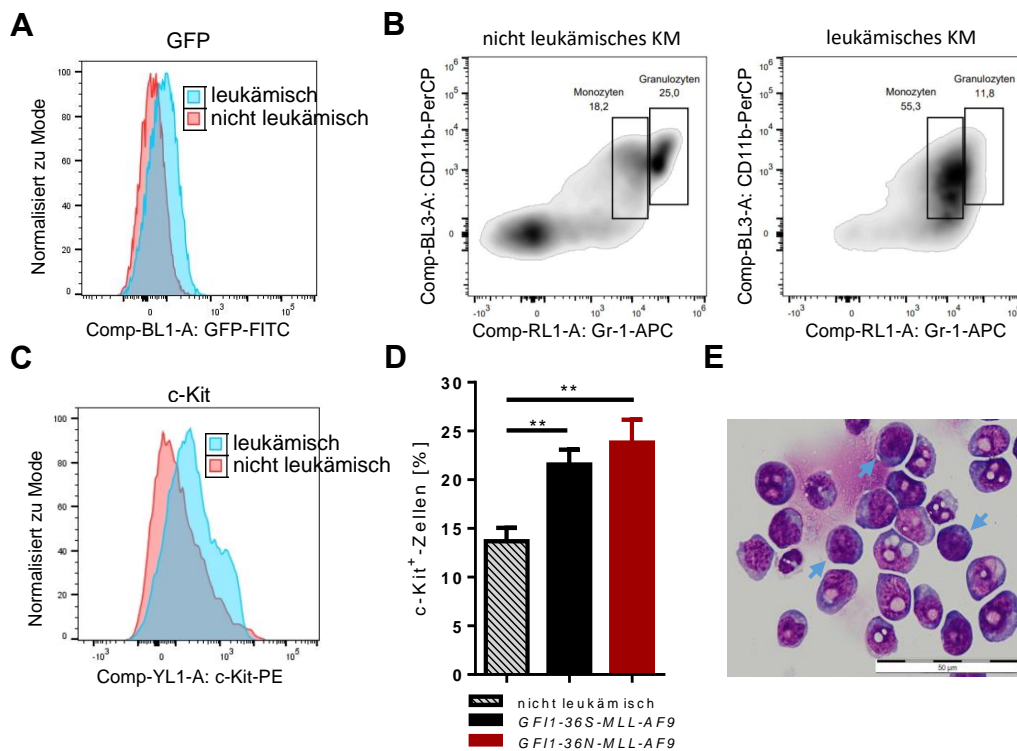


Abbildung 12: Auszug einer Knochenmark-Analyse der leukämischen und nicht leukämischen Mäuse

Zur Untersuchung, ob die transplantierten Mäuse eine AML entwickelt hatten wurde u.a. der prozentuale Anteil an **A)** GFP⁺-Zellen, **B)** Granulozyten und monozytoiden Zellen sowie **C)** c-Kit⁺-Zellen mittels FACS bestimmt. Als Kontrollen wurden nicht leukämische Mäuse analysiert. In **D)** wurde der Anteil an c-Kit⁺-Knochenmarkszellen von nicht leukämischen (n=6), GF11-36S- (n=13) und GF11-36N-MLL-AF9 (n=11) im Vergleich dargestellt. Mittelwert \pm SEM. **E)** Cytospin des Knochenmarks einer leukämischen MLL-AF9-Maus. Blaue Pfeile: Blasten; Maßstabsleiste: 50 μ m

Außerdem wurden Bluttests von allen transplantierten Mäusen durchgeführt, um u.a. die Anzahl an weißen Blutkörperchen (WBCs), Thrombozyten (PLTs) sowie Hämoglobin (HGB) zu bestimmen. Als Kontrolle wurde das Blut von nicht leukämischen Mäusen verwendet. Alle in dieser Arbeit verwendeten transplantierten Mäuse hatten signifikant erhöhte WBC-, erniedrigte HGB- sowie erniedrigte PLT-Werte im Vergleich zu den nicht leukämischen Kontrollen (Abb. 13). Zwischen dem GF11-36S-, dem GF11-36N- und dem GF11-KD-Genotyp gab es keine signifikanten Unterschiede der Blutwerte (Abb. 13).

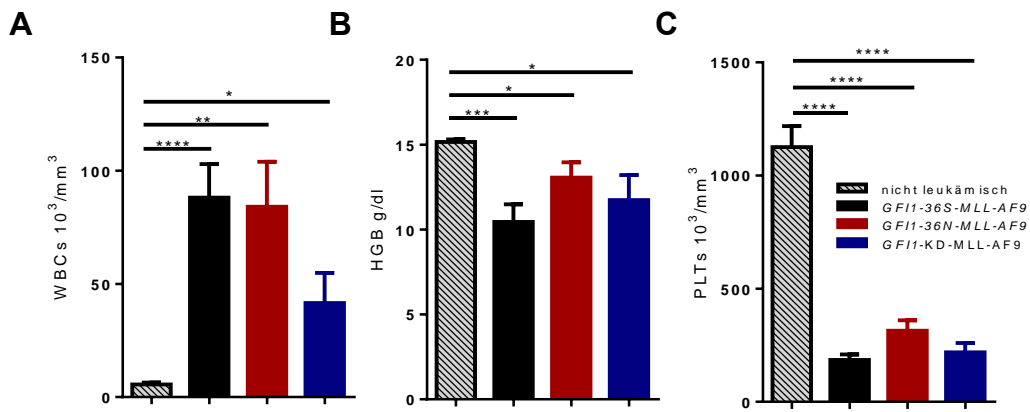


Abbildung 13: Blutanalysen der leukämischen und nicht leukämischen Mäuse

Zur Untersuchung, ob die transplantierten Mäuse eine Leukämie entwickelt hatten wurde u.a. die Anzahl an **A**) weißen Blutkörperchen (WBCs), **B**) Thrombozyten (PLTs) und **C**) Hämoglobin (HGB) gemessen. Als Kontrollen wurden Blutanalysen von nicht leukämischen Mäusen durchgeführt. nicht leukämisch: $n=18$, *GFI1-36S-MLL-AF9* (*GFI-36S* & *Gfi1-WT*): $n=21-25$, *GFI1-36N-MLL-AF9*: $n=16-18$, *GFI1-KD-MLL-AF9*: $n=9-11$; $p^*\leq 0,0437$; $p^{**}=0,0013$; $p^{***}=0,0002$; $p^{****}<0,0001$; Mittelwert \pm SEM

Wie bereits beschrieben wurden von allen transplantierten Mäusen Cytospins des Knochenmarks angefertigt. Einerseits dienten die Cytospins zur Untersuchung der Zusammensetzung des Knochenmarks zu diagnostischen Zwecken. Andererseits wurden die Knochenmarkzellen der drei Genotypen auf morphologische Unterschiede untersucht. Die morphologischen Unterschiede können auf mögliche genomische Veränderungen hinweisen (Bignold et al., 2006; Matsuda et al., 2017). Die Zellen wurden auf folgende morphologische Auffälligkeiten untersucht: veränderter Zellkern (polynukleär oder deformiert) und veränderte Zellform. Von jeder Probe wurden mindestens 200 Zellen analysiert. Bei der Untersuchung wurde deutlich, dass die *GFI1-36N*- und *GFI1-KD-MLL-AF9*-Proben eine höhere Anzahl an Zellen mit verändertem Zellkern sowie veränderter Zellform besaßen als die *GFI1-36S-MLL-AF9*-Proben (Abb. 14 A). Das Knochenmark der *GFI1-36N*- ($18,88\% \pm 1,25\%$) und der *GFI1-KD*-leukämischen Mäuse ($24,58\% \pm 4,78\%$) hatten einen signifikant höheren Anteil an Zellen mit veränderten Zellkernen als das Knochenmark der *GFI1-36S*-leukämischen Mäuse ($11,69\% \pm 1,10\%$). Außerdem besaßen die *GFI1-36N*- ($22,10\% \pm 2,85\%$) und *GFI1-KD*-leukämischen Mäuse ($20,09\% \pm 3,81\%$) mehr Knochenmarkzellen mit veränderter Zellform als die *GFI1-36S*-leukämischen Mäuse ($14,81\% \pm 3,03\%$) (Abb. 14 B).

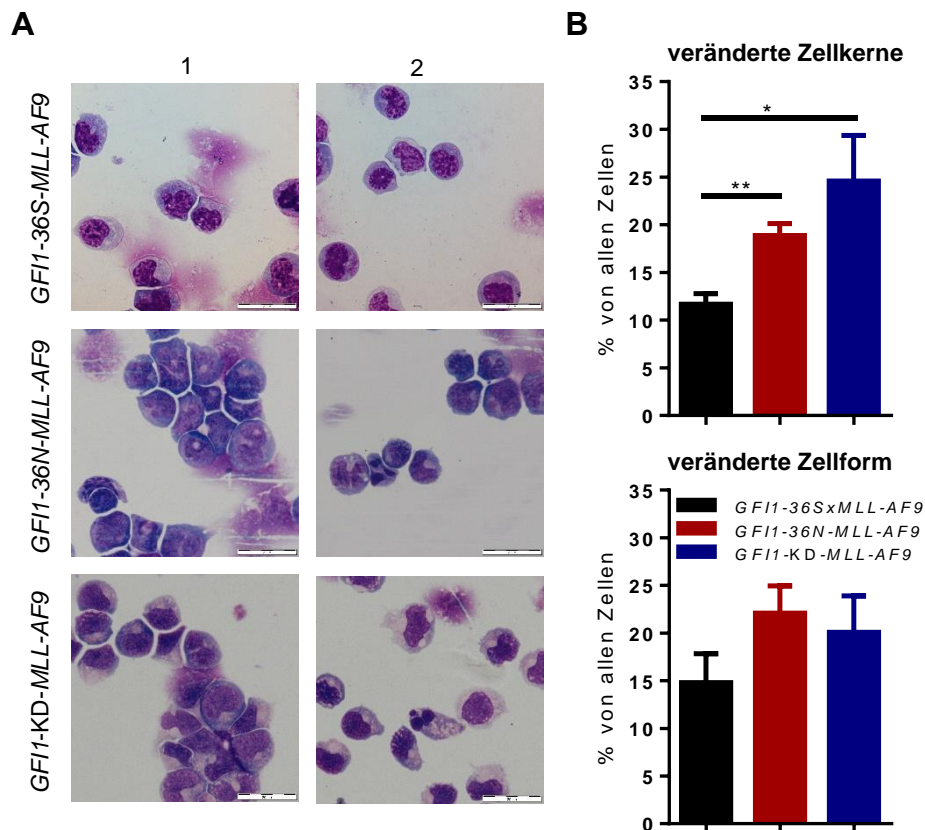


Abbildung 14: Mehr morphologische Veränderungen in GFI1-36N- und GFI1-KD-leukämischen Zellen als in GFI1-36S-leukämischen Zellen

A) Repräsentative Bilder der Cytospins von GFI1-36S-, GFI1-36N-, und GFI1-KD-MLL-AF9-leukämischen Knochenmarkszellen. Maßstabsleiste: 20 μ m. **B)** Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Zellen mit verändertem Zellkern (polynukleär, veränderte Zellkern-Form) sowie der Anteil an Zellen mit veränderter Zellform. Es wurden min. 200 Zellen pro Probe ausgewertet. GFI1-36S (auch *Gfi1*-WT): n=6, GFI1-36N: n=7, GFI1-KD: n=5; $p^* = 0,05$, $p^{**} = 0,0012$; Mittelwert \pm SEM

Zur Untersuchung von chromosomalen Veränderungen in den seriell transplantierten Mäusen wurden mFISH-Analysen in Kooperation mit Frau Prof. Dr. Gudrun Göhring von der medizinischen Hochschule Hannover und mit Herrn PD Dr. Thomas Liehr vom Universitätsklinikum Jena durchgeführt. Für die FISH-Analysen wurden leukämische Knochenmarkszellen von unterschiedlichen Transplantationsrunden der seriellen Transplantation verwendet. Es wurden pro Probe min. 9 Metaphasen ausgewertet (Tab. 14). Die Karyotypen zeigten, dass es weder in GFI1-36N- noch in GFI1-KD-leukämischen Zellen eine signifikante Anhäufung an chromosomalen Veränderungen, im Vergleich zu GFI1-36S- und *Gfi1*-WT-leukämischen Zellen, gab. Bei den GFI1-36S-Zellen waren 4/5 Proben unauffällig. Bei einer Probe gab es in einer von neun untersuchten Metaphasen anstelle von XY einen XX-Karyotyp. Bei den GFI1-36N-Zellen waren 7/8 Karyotypen normal. Lediglich eine Probe zeigte zwei chromosomale Veränderungen. In den Proben mit geringer GFI1-Expression waren häufig keine Metaphasen vorhanden und deshalb konnten nur zwei Proben analysiert werden. Eine

der *GFI1*-KD-Proben zeigte einen normalen Karyotyp. Bei der anderen Probe waren 19 Metaphasen unauffällig und lediglich eine Metaphase besaß eine chromosomale Veränderung (Tab. 14 & Abb. 15).

Tabelle 14: Liste der Karyotypen von murinen leukämischen Knochenmarkszellen

Aufgelistet sind die, aus den mFISH-Versuchen resultierenden Karyotypen von *GFI1*-36S- (auch *Gfi1*-WT-), *GFI1*-36N- und *GFI1*-KD-leukämischen Knochenmarkszellen. Die Zellen stammten aus den seriell transplantierten MLL-AF9-Mäusen.

Genotyp	Mausnummer (Transplantationsrunde)	Karyotyp [Anzahl Metaphasen]
<i>GFI1</i> -36S	KP8965 (3.)	40, XY [13]
	303056 (4.)	40, XY [8], 40, XX [1]
	KP10737 (4.)	40, XY [15]
	KP10740 (4.)	40, XY [13]
	KP10741 (4.)	40, XY [20]
<i>GFI1</i> -36N	KP9565 (2.)	40, XY [15]
	KP12661 (3.)	40, XY [11]
	KP10692 (4.)	40, XY [20]
	KP10877 (4.)	40, XY [20]
	KP10878 (4.)	40, XY [20]
	KP10879 (4.)	40, XY, T(19;19), Chr. X auseinandergebrochen [10]
	303055 (4.)	40, XY [13]
	303057 (4.)	40, XY [15]
<i>GFI1</i> -KD	KP10544 (4.)	40, XY [19]; 40, XY, idisc(Chr.6) [1]
	KP10545 (4.)	40, XY [20]

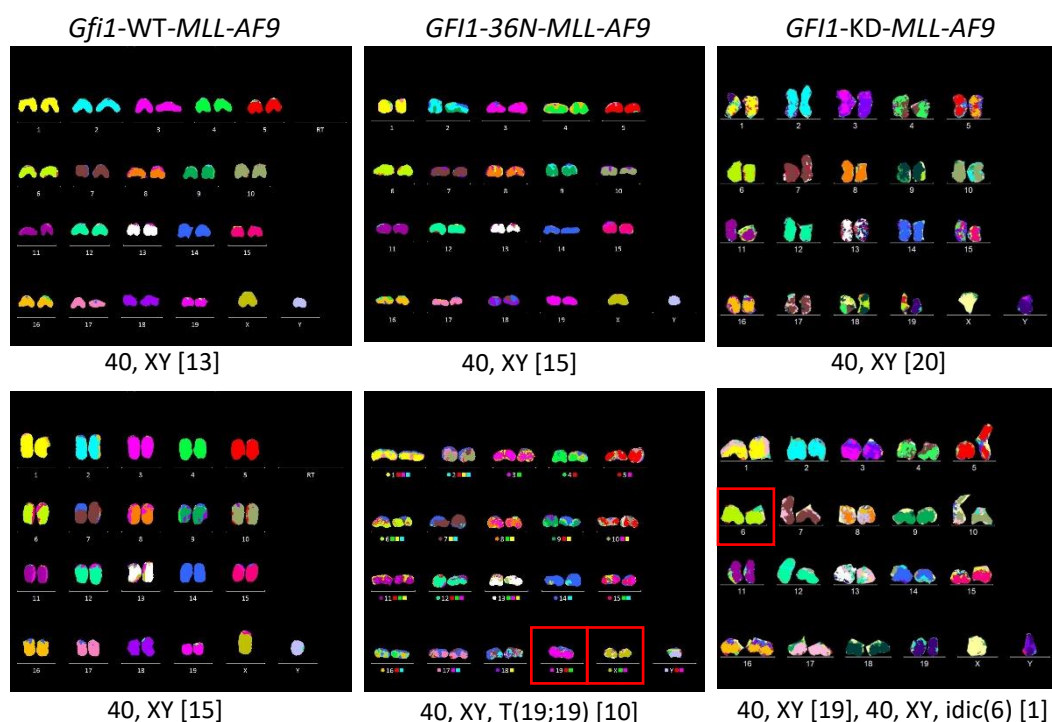


Abbildung 15: Beispielbilder der Karyotypen von leukämischen Knochenmarkszellen aus den seriell transplantierten MLL-AF9-Mäusen

Mit der mFISH-Methode können lediglich große chromosomale Veränderungen festgestellt werden. Deshalb wurden von einem Teil der leukämischen Knochenmarkzellen zusätzlich eine komparative genomische Hybridisierung (Array-CGH), in Kooperation mit Frau Prof. Dr. Doris Steinemann und Frau Prof. Dr. Gudrun Göhring von der medizinischen Hochschule Hannover, durchgeführt. Der Array-CGH hat eine höhere Auflösung als die klassischen Chromosomenanalysen und es können Kopienzahlvarianten (Deletionen, Insertionen) oder andere chromosomale Veränderungen von ca. 50 kb genomweit detektiert werden (van der Veken and Buijs, 2011; Cheung and Bi, 2018; Lee et al., 2019). In Abbildung 16 ist eine Beispielanalyse des Array-CGH von drei *GFI1-36N*-Proben dargestellt. Als Referenzgenom für die einzelnen *GFI1-36N*- und *GFI1-KD-MLL-AF9*-Proben diente die gepoolte DNA von drei *Gfi1-WT-MLL-AF9*-Proben. Bei den *GFI1-36N-MLL-AF9*-Knochenmarkzellen traten 3-4 Veränderungen und bei *GFI1-KD-MLL-AF9*-Zellen 3-7 Veränderungen im Vergleich zu den *Gfi1-WT-MLL-AF9*-Proben auf. Zwischen den einzelnen Proben des jeweiligen *GFI1*-Genotyps gab es einige Überschneidungen, zum Beispiel zeigten jeweils zwei von drei *GFI1-36N*-Proben Deletionen in *Samd4* sowie *Ang4*. In den *GFI1-KD*-Proben kam es ebenfalls zu Überschneidungen (Tab. 15).

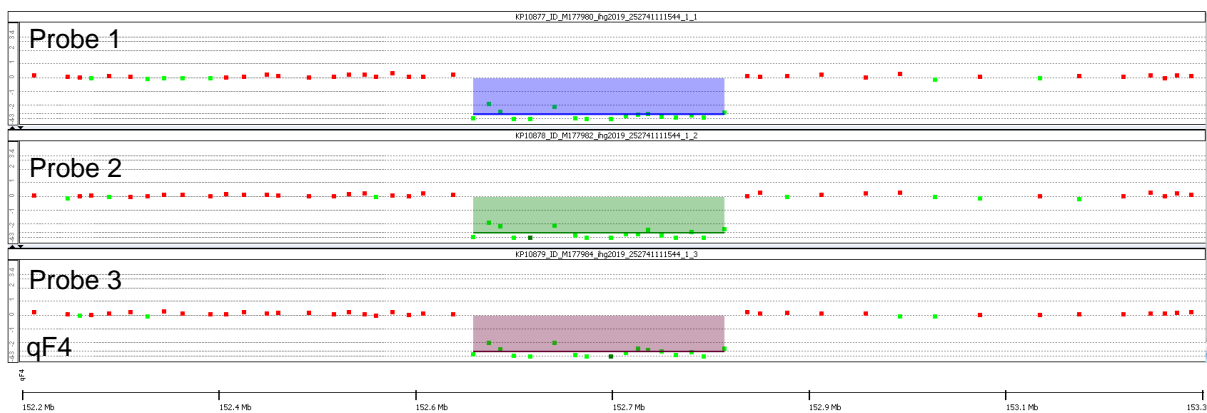


Abbildung 16: Beispiel eines Array-CGH-Ergebnis: Chromosom X qF4-Deletion

Dargestellt ist ein beispielhaftes Ergebnis der Array-CGH-Analyse von drei murinen *GFI1-36N-MLL-AF9*-leukämischen Knochenmarkzellen. Hier gezeigt ist die Deletion auf Chr. X qF4 von Position 152.673.152-152.888.942 im Genom.

Tabelle 15: Array-CGH-Ergebnisse der *GFI1-36N*- und *GFI1-KD-MLL-AF9* leukämischen Knochenmarkzellen

Aufgelistet sind die Ergebnisse des Array-CGH mit murinen *GFI1-36N*- und *GFI1-KD-MLL-AF9*-leukämischen Knochenmarkzellen. Als Referenzgenom wurde die gepoolte DNA aus Knochenmarkzellen von drei *Gfi1-WT-MLL-AF9*-leukämischen Mäusen der quartären Transplantationsrunde verwendet. Mausnummer (Transplantationsrunde);
- = kein eindeutiges Gen; Del: Deletion; Ins: Insertion

Genotyp	Mausnummer	Chromosom/ Cytoband	Del/Ins	Genname
<i>GFI1-36N- MLL-AF9</i>	KP10877 (4.)	chr14/ qC1	Del	Samd4
		chr14/ qC2	Del	Ang4
		chrX/ qF4	Del	-
	KP10878 (4.)	chr14/ qC1	Del	Samd4
		chr16/ qA3	Ins	Cldn5, Cdc45l, Ufd1l, 2510002D24Rik
		chr19/ qC2	Ins	Ide
	KP10879 (4.)	chrX/ qF4	Del	-
		chr14/ qC2	Del	Ang4
		chr19/ qC2	Ins	Ide
<i>GFI1-KD- MLL-AF9</i>	KP10544 (4.)	chr19/ qA3	Del	Raet1a, Raet1e, Raet1b, Raet1c
		chr11/ qB1.3	Ins	Slc22a5, Slc22a21
		chr11/ qB4	Del	Nlrp1b, Nlrp1c
		chr12/ qE	Del	Serpina1a, Serpina1c
		chr12/ qF2	Ins	-
		chr16/ qB3	Del	2010005H15Rik, Stfa1
KP10545 (4.)	chr10/ qA3	Del	Raet1a, Raet1b, Raet1c	
	chr11/ qB1.3	Ins	Slc22a5, Slc22a21	
	chr11/ qB4	Del	Nlrp1b, Nlrp1c	
	chr12/ qE	Del	Serpina1a, Serpina1c, Serpina1e	
	chr12/ qF2	Del	-	
	chr12/ qF2	Ins	-	
KP7383 (3.)	chr16/ qB3	Del	2010005H15Rik, Stfa1	
	chr10/ qA4	Del		
	chr19/ qC2	Ins	Fgfbp3, Btaf1	
		chr19/ qC2	Ins	Ide

Zur näheren Untersuchung der Unterschiede zwischen *GFI1-36S*- und *GFI1-36N*-Zellen sowie Zellen mit niedrigem *GFI1*-Level wurden als nächstes RNA-Sequenzierungen durchgeführt. Mithilfe der RNA-Sequenzierung wurden Veränderungen auf RNA-Ebene sowie Unterschiede in der Genexpression zwischen den Genotypen analysiert. Die Sequenzierung wurde mit den Knochenmarkzellen der leukämischen Mäuse aus der tertiären (*GFI1-KD*) und quartären (*GFI1-36S* und *GFI1-36N*) Transplantationsrunde durchgeführt. Als Kontrolle dienten Lin⁻-Zellen aus nicht leukämischen *GFI1-36S*-, *GFI1-36N*- bzw. *GFI1-KD*-Mäusen. Zur Detektion von Veränderungen, wie Insertionen und Deletionen, wurde als Erstens eine „Variant Calling“-Analyse mit den Ergebnissen der RNA-Sequenzierung durchgeführt. In Abbildung 17 sind die Ergebnisse der leukämischen Knochenmarkzellen abzüglich der

Anzahl an Veränderungen der entsprechenden nicht leukämischen Proben dargestellt. Die RNA-Sequenzierung der nicht leukämischen Zellen wurde auf einem anderen Gerät durchgeführt als die der leukämischen Zellen. Deshalb wurden alle Ergebnisse mit den durchschnittlichen Ausgaben (engl.: *readouts*) korrigiert. Die Gesamtanzahl an Variationen in den *GFI1-36N*-leukämischen Zellen war ca. 40-fach höher als in den *GFI1-36S*-leukämischen Proben (Abb. 17 A). Außerdem hatten die *GFI1-36N-MLL-AF9*-Zellen signifikant mehr Veränderungen, wie Insertionen (Abb. 17 B) und Deletionen (Abb. 17 C), als die *GFI1-36S-MLL-AF9*-Zellen. Die leukämischen Zellen mit niedriger *GFI1*-Expression zeigten ebenfalls eine höhere Anzahl an Variationen wie Insertionen und Deletionen. Die Gesamtanzahl an Variationen war in den leukämischen Zellen mit niedrigerem *GFI1*-Level im Schnitt ca. 70-fach höher als in den *GFI1-36S*-Proben (Abb. 17 A). Alle nicht leukämischen Proben hatten weniger Variationen in der RNA, als die dazugehörigen leukämischen Proben.

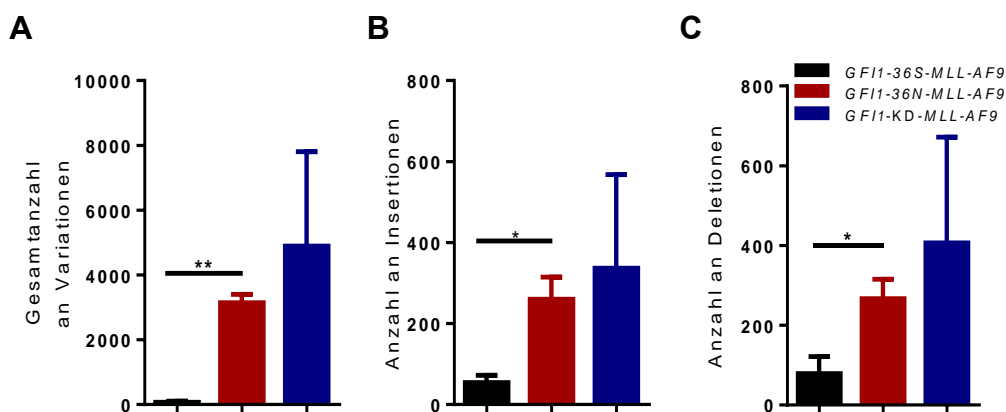


Abbildung 17: Mehr Variationen in murinen *GFI1-36N*- und *GFI1-KD*-leukämischen Knochenmarkzellen

Dargestellt sind die Ergebnisse der „variant calling“-Analyse der RNA-Sequenzierung von Knochenmarkzellen der seriell transplantierten *GFI1-36S*-, *GFI1-36N*- und *GFI1-KD-MLL-AF9*-Mäuse. Hier gezeigt sind die Anzahl der **A)** gesamten Variationen (SNPs + Insertionen + Deletionen), **B)** der Insertionen sowie **C)** der Deletionen der leukämischen Knochenmarkzellen abzüglich der Anzahl an Veränderungen in den dazugehörigen Lin⁻-nicht leukämischen Zellen. $n=3$; $p^* \leq 0,0434$; $p^{**}=0,0064$; Mittelwert \pm SEM

Die detektierten Variationen wurden anschließend in drei Gruppen, je nach der funktionellen Klasse der Mutation, sortiert (Missense-, Nonsense- und stille Mutationen). In den nicht leukämischen Proben war der prozentuale Anteil an stillen Mutationen in den *GFI1-36S*-Proben leicht erhöht gegenüber den *GFI1-36N*- und *GFI1-KD*-Proben (ca. 38 % gegenüber ca. 32% und ca. 27%). Der prozentuale Anteil an Missense-Mutationen war dagegen in den *GFI1-36N*-Proben um ca. 6% und den *GFI1-KD*-Proben um ca. 14% höher als in den *GFI1-36S*-Proben. Bei der genaueren Analyse der Missense-Mutationen wurde festgestellt, dass die *GFI1-36N*- und *GFI1*-

36S-nicht leukämischen Zellen 34 Missense-Mutation hatten und alle 34 Mutationen in beiden Genotypen auftraten. Dagegen überschnitten sich in den *GFI1*-KD-nicht leukämischen Proben nur 16 von insgesamt 74 vorhandenen Missens-Mutationen mit den anderen beiden Genotypen (Abb. 18).

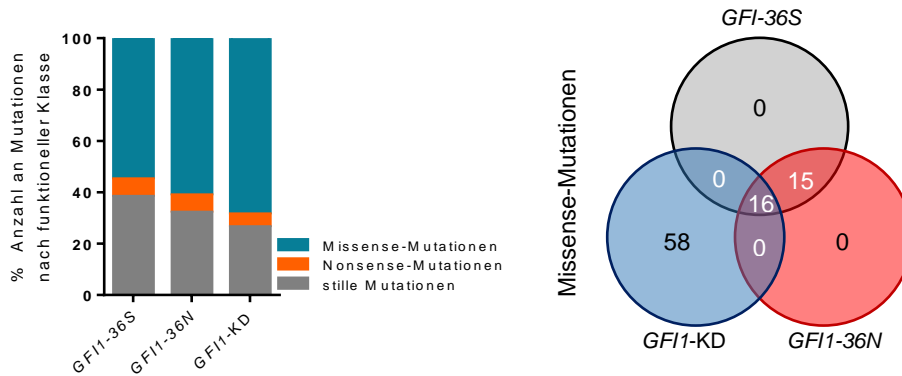


Abbildung 18: Anzahl an Mutationen geordnet nach funktioneller Klasse in nicht leukämischen Zellen

Dargestellt ist die jeweilige Anzahl an Mutationen in *GFI1*-36S-, *GFI1*-36N- und *GFI1*-KD-*Lin⁻*-nicht leukämischen Zellen (RNA-Sequenzierung). Die Mutationen wurden in die funktionellen Klassen eingeteilt. links: prozentualer Anteil der funktionellen Klassen (Missense-, Nonsense- und stille Mutationen) rechts: Venn-Diagramm der Überschneidungen an Missense-Mutationen zwischen den drei Genotypen.

In den leukämischen Zellen waren die Unterschiede der funktionellen Mutationen deutlich ausgeprägter. Auf der einen Seite war der prozentuale Anteil an Nonsense- und stillen Mutationen in den *GFI1*-36S-leukämischen Proben deutlich höher als in den *GFI1*-36N- und *GFI1*-KD-leukämischen Proben. Auf der anderen Seite lag der Anteil an Missense-Mutationen in den *GFI1*-36N-leukämischen Proben um ca. 25% und in den *GFI1*-KD-leukämischen Proben um ca. 26% höher als in den *GFI1*-36S-leukämischen Proben. Bei der genauen Analyse der Missense-Mutationen wurde festgestellt, dass die *GFI1*-36S-Proben insgesamt 17, die *GFI1*-36N-Proben insgesamt 48 und die *GFI1*-KD-Proben insgesamt 85 Missense-Mutationen besaßen. Die *GFI1*-36S-leukämischen Proben hatten lediglich 2 exklusive Missense-Mutationen. Bei den *GFI1*-36N-leukämischen Proben waren es dagegen 26 und bei den *GFI1*-KD-leukämischen Proben 62 Missense-Mutationen, welche für den jeweiligen Genotyp ausschließlich waren. Zwischen den Genotypen gab es nur wenige Überschneidungen. Lediglich 8 der detektierten Missense-Mutationen traten sowohl in den *GFI1*-36S- als auch den *GFI1*-36N- und *GFI1*-KD-leukämischen Proben auf (Abb. 19).

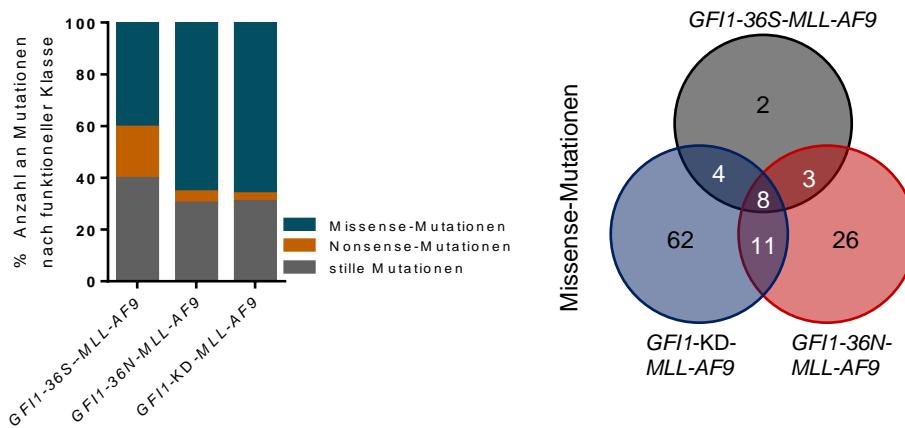


Abbildung 19: Anzahl an Mutationen geordnet nach funktioneller Klasse in murinen leukämischen Knochenmarkzellen

Dargestellt ist die jeweilige Anzahl an Mutationen in GFI1-36S-, GFI1-36N- und GFI1-KD-leukämischen-MLL-AF9-Zellen (RNA-Sequenzierung). Die Mutationen wurden in die drei funktionellen Klassen eingeteilt. links: prozentualer Anteil der funktionellen Klassen (Missense-, Nonsense- und stille Mutationen) rechts: Venn-Diagramm der Überschneidungen an Missense-Mutationen zwischen den drei Genotypen. $n=3$

Zur genaueren Untersuchung, warum GFI1-36N- und GFI1-KD-Zellen mehr Veränderungen aufzeigen, wurden die Unterschiede in der globalen Genexpression zwischen dem GFI1-36S- und dem GFI1-36N- sowie dem GFI1-KD-Genotyp analysiert. Hierfür wurden die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung der murinen nicht leukämischen (Lin⁻) Zellen sowie der murinen leukämischen Knochenmarkzellen (MLL-AF9) zunächst mithilfe der „Gene Set Enrichment Analysis“ (GSEA) analysiert, um einen ersten Überblick der veränderten Genexpressionen zu bekommen. Bei der GSEA wurden die „Hallmark gene sets“ untersucht. Bei dem Vergleich zwischen GFI1-36S- und GFI1-36N-nicht leukämischen Zellen (Lin⁻-Zellen) konnte kein Gen-Set der „Hallmark gene sets“ gefunden werden, welches in GFI1-36S-Lin⁻-Zellen signifikant angereichert war. Dagegen waren 7 Gen-Sets in den GFI1-36N-Lin⁻-Zellen signifikant (FDR q-Wert $\leq 0,05$) angereichert (Abb. 20). Darunter befand sich das Gen-Set „Hallmark_UV_Response_Dn“, welches Gene beinhaltet, die in Folge von UV-Strahlung herunterreguliert werden, das Gen-Set „Hallmark_G2M_Checkpoint“, welches Gene enthält, die beim G2/M-Checkpoint eine Rolle spielen und das Gen-Set „Hallmark_E2F_Targets“, welches Gene enthält, die zellzyklusbezogene Ziele der E2F-Proteine codieren (Abb. 20 & 21).

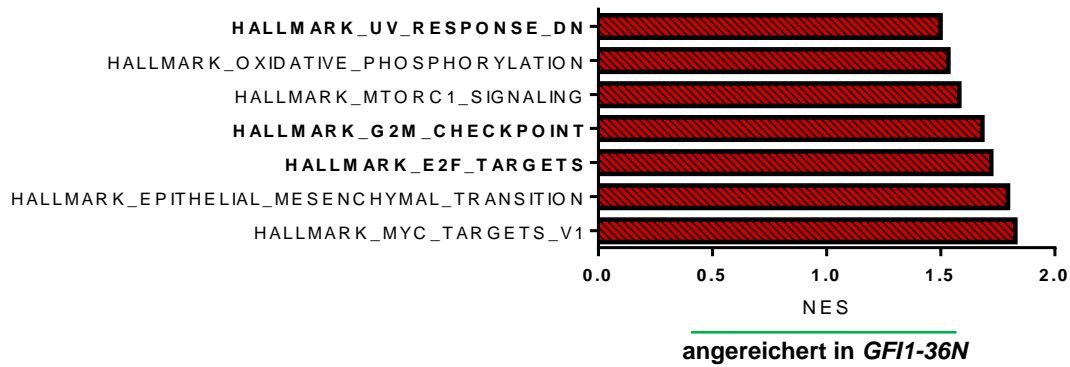


Abbildung 21: Veränderte Gen-Sets zwischen nicht leukämischen *GFI1-36N*- und *GFI1-36S*-Zellen

Dargestellt sind die NES- („normalized enrichment score“) Werte der veränderten „Hallmark gene sets“, welche einen FDR q-Wert von $\leq 0,05$ hatten. Für die Analyse wurden die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung der *GFI1-36S* (+/ki)- und *GFI1-36N* (ki/ki)-Lin⁻-Zellen verwendet und mittels GSEA 7.1 analysiert. $n=3$

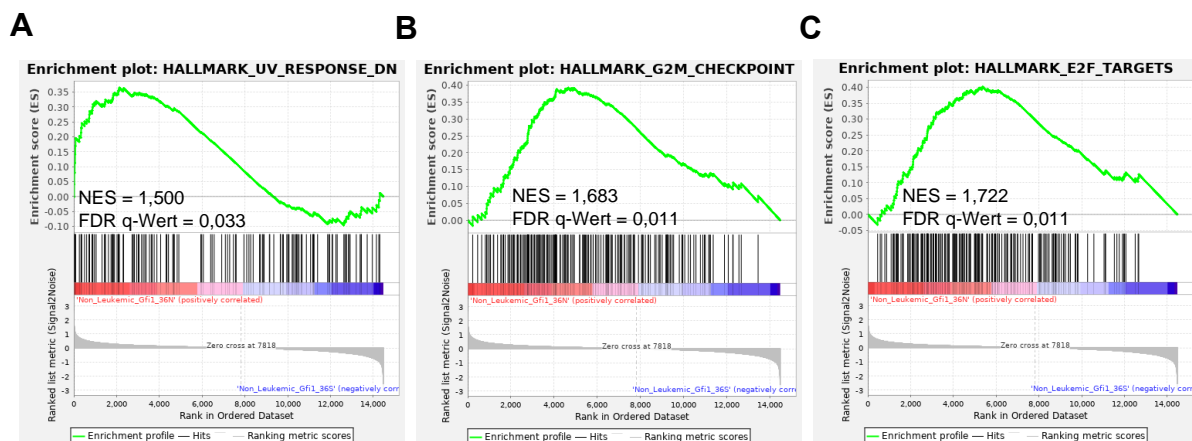


Abbildung 20: Enrichment Plots ausgewählter, angereicherter Gen-Sets in *GFI1-36N*- gegenüber *GFI1-36S*-nicht leukämischen Zellen

Dargestellt sind die „Enrichment Plots“ der Gen-Sets der **A)** Gene, die in Folge von UV-Strahlung herunterreguliert werden, **B)** Gene, welche beim G2/M Checkpoint eine Rolle spielen sowie **C)** Gene, welche zellzyklusbezogene Ziele der E2F-Proteine codieren. NES=normalized enrichment score, FDR= False discovery rate; rot=nicht leukämische *GFI1-36N* (ki/ki)-Zellen, blau=nicht leukämische *GFI1-36S* (+/ki)-Zellen; $n=3$

Bei der GSEA der *GFI1-36S*- und *GFI1-36N*-leukämischen Proben wurden 11 Gen-Sets gefunden, welche in den *GFI1-36S*-leukämischen Zellen signifikant angereichert waren. Darunter befand sich das Gen-Set „Hallmark_DNA_Repair“, welches Gene der DNA-Reparatur enthält, das Gen-Set „Hallmark_UV-Response_up“, welches Gene beinhaltet, die in Folge von UV-Strahlung hochreguliert werden und das Gen-Set „Hallmark_p53_Pathway“, welches Gene der p53-Signalwege bzw. des p53-Netzwerkes enthält (Abb. 22 & 23). Im Gegensatz zu den GSEA der nicht

leukämischen Zellen wurden keine signifikant angereicherten Gen-Sets in den *GFI1-36N*-leukämischen Proben gegenüber den *GFI1-36S*-leukämischen Proben gefunden.

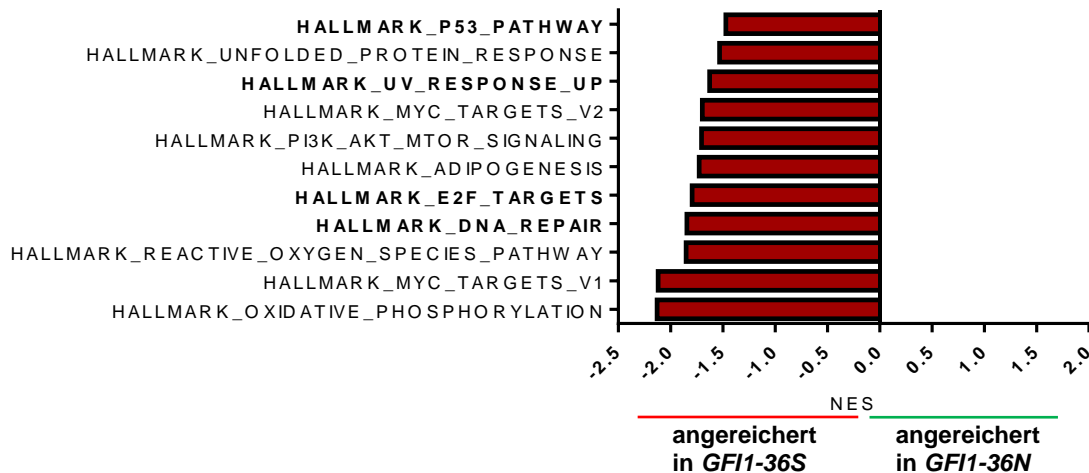


Abbildung 22: Veränderte Gen-Sets zwischen leukämischen *GFI1-36N*- und *GFI1-36S*-Zellen

Dargestellt sind die NES-Werte der veränderten „Hallmark gene sets“, welche einen FDR q-Wert von $\leq 0,05$ hatten. Für die Analyse wurden die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung der murinen *GFI1-36S* (ki/ki)- und *GFI1-36N* (ki/ki)-MLL-AF9-Zellen verwendet und mittels GSEA 7.1 analysiert. NES: normalized enrichment score; n=3

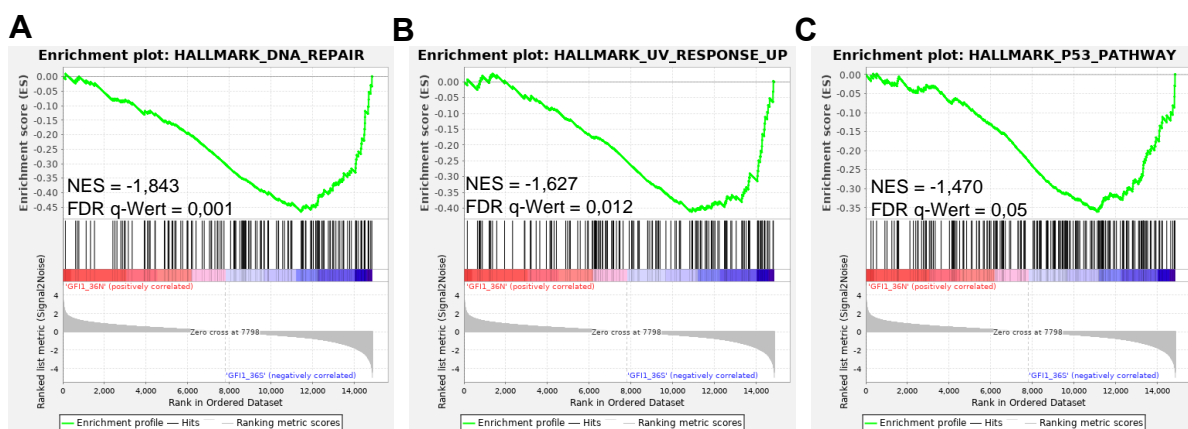


Abbildung 23: Enrichment Plots ausgewählter, angereicherter Gen-Sets in *GFI1-36S*- gegenüber *GFI1-36N*-leukämischen Zellen

Dargestellt sind die „Enrichment Plots“ der Gen-Sets, der **A)** Gene, welche bei der DNA-Reparatur involviert sind, **B)** Gene, die in Folge von UV-Strahlung hochreguliert werden sowie **C)** Gene, welche bei den p53-Signalwegen involviert sind. NES= normalized enrichment score, FDR= False discovery rate; rot=leukämische *GFI1-36N* (ki/ki)-Zellen, blau=leukämische *GFI1-36S* (ki/ki)-Zellen; n=3

Als Nächstens wurden die differentiell exprimierte Gene (DEG) zwischen *GFI1-36S*- und *GFI1-36N*-leukämischen Zellen analysiert. Für diese Analyse wurden die RNA-Sequenzierungsergebnisse der murinen Lin⁻ sowie *MLL-AF9*-Zellen verwendet. Bei der DEG-Analyse wird die Expression einzelner Gene betrachtet. Dagegen wird bei der GSEA die Expression der gesamten Gen-Sets untersucht. Daher liefert die

Analyse der DEG andere Ergebnisse als die GSEA (Subramanian et al., 2005; Love et al., 2014). Bei der Untersuchung der DEG zwischen *GF11-36S*- und *GF11-36N*-nicht leukämischen Zellen wurden lediglich 63 signifikante ($p < 0,05$) DEG gefunden, darunter 9 Gene, welche in *GF11-36N*-Lin⁻-Zellen höher exprimiert waren und 54 Gene, welche eine geringere Expression in *GF11-36N*-Lin⁻-Zellen zeigten. Dagegen wurden in leukämischen Zellen 1.779 signifikante ($p < 0,05$) DEG zwischen *GF11-36S*- und *GF11-36N*-Zellen gefunden. Die Anzahl an Genen, welche eine stärkere Expression in *GF11-36N*-leukämischen Zellen zeigten (1.021 Gene), lag höher als die Anzahl an Genen, welche eine geringere Expression in *GF11-36N*-leukämischen Zellen hatten (758 Gene). Unter den Genen, welche höher exprimiert in den *GF11-36N-MLL-AF9*-Zellen waren, befanden sich 25 Gene, welche direkt oder indirekt bei der DNA-Reparatur beteiligt sind (z.B.: *Cul4b*, *Dna2*, *Gen1*, *Neil3*). Unter den Genen, welche in den *GF11-36N-MLL-AF9*-Zellen niedriger exprimiert waren, wurden 29 Gene der DNA-Reparatur bzw. Gene aus Signalwegen, welche mit der DNA-Reparatur in Zusammenhang stehen, gefunden (z.B.: *Mid1*, *NdrG1*, *Nhej1*, *Ogg1*, *Pold2*) (Abb. 24).

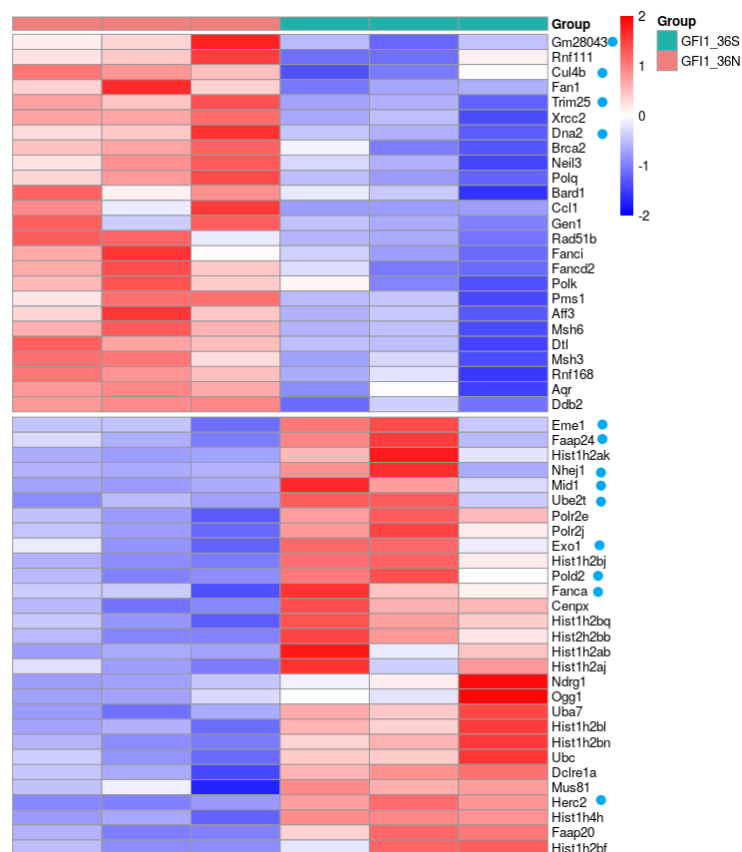


Abbildung 24: Heatmap der DEG der DNA-Reparatur oder DNA-Schadensantwort in *GF11-36N*-leukämischen-Zellen im Vergleich zu *GF11-36S*-leukämischen Zellen

Hier dargestellt sind die DEG zwischen den murinen leukämischen *GF11-36S*- (grün) und *GF11-36N-MLL-AF9*-Knochenmarkszellen (rot), welche direkt oder indirekt bei der DNA-Reparatur eine Rolle spielen. Die Gene wurden aus der Liste an DEG mithilfe der Reactom Pathway Browser version 3.7 ausgewählt. rot: höher exprimiert blau: niedriger exprimiert; blauer Punkt hinter den Gennamen: Überschneidungen mit *GF11-KD-MLL-AF9*; $p < 0,05$

Beim Vergleich von *GF11-36S*-leukämischen und *GF11-KD*-leukämischen Zellen wurden ebenfalls Unterschiede in der Genexpression gefunden. Bei der GSEA wurden 15 Gen-Sets gefunden, welche in *GF11-36S*-leukämischen Zellen angereichert waren. Kein Gen-Set war in den *GF11-KD*-leukämischen Zellen angereichert (Abb. 25). Es gab einige Überschneidungen zwischen den Ergebnissen der *GF11-36N*- und *GF11-KD*-leukämischen Zellen. Wie bereits beim Vergleich der *GF11-36N*-leukämischen Zellen, konnte bei den *GF11-36S*-leukämischen Zellen gegenüber *GF11-KD*-leukämischen Zellen unter anderem eine Anreicherung der Gene der Gen-Sets „UV-Response_Up“ (Abb. 26 A) sowie „P53_Pathway“ (Abb. 26 B) festgestellt werden.

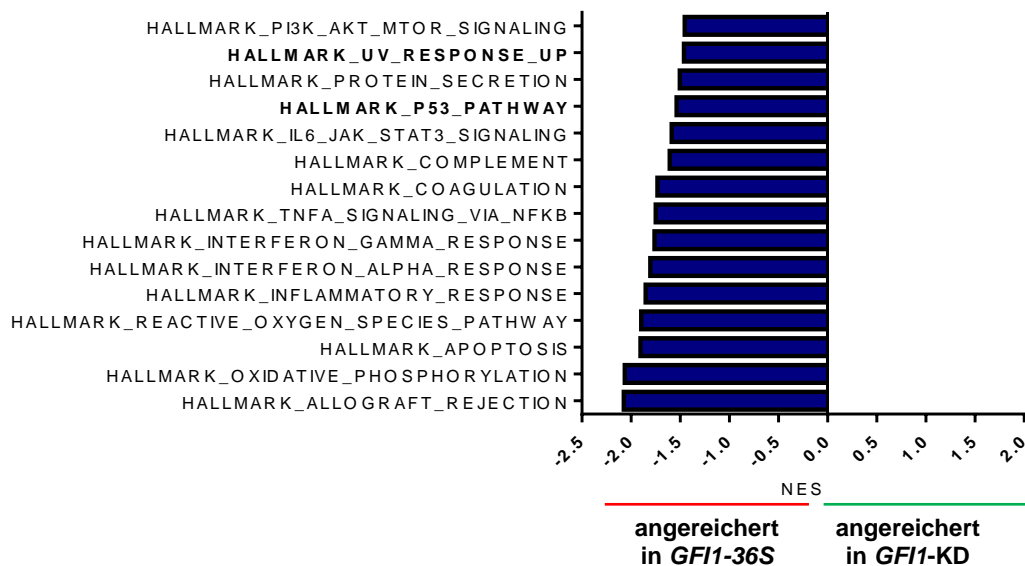


Abbildung 25: Veränderte Gen-Sets zwischen murinen *GF11-KD*- und *GF11-36S*-leukämischen Zellen

Dargestellt sind die NES-Werte der veränderten „Hallmark gene sets“ zwischen *GF11-36S* (*ki/ki*)- und *GF11-KD* (*kd/kd*)-*MLL-AF9*-Zellen, welche einen FDR q -Wert von $\leq 0,05$ hatten. Für die Analyse wurden die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung mittels GSEA 7.1 analysiert. NES: normalized enrichment score; $n=3$

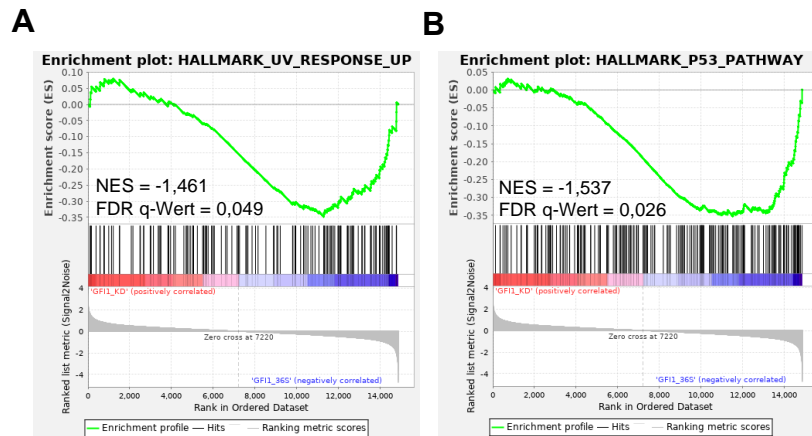


Abbildung 26: Enrichment Plots ausgewählter, angereicherter Gen-Sets in GFI1-36S-leukämischen Zellen gegenüber GFI1-KD-leukämischen Zellen

Dargestellt sind die „Enrichment Plots“ der Gen-Sets, der **A)** Gene, die in Folge von UV-Strahlung hochreguliert werden, sowie **B)** der Gene, welche bei p53-Signalwegen involviert sind. NES= normalized enrichment score, FDR= False discovery rate; rot=leukämische GFI1-KD (kd/kd)-Zellen, blau=leukämische GFI1-36S (ki/ki)-Zellen; n=3

Des Weiteren wurden auch die DEG zwischen GFI1-KD-MLL-AF9-Zellen und GFI1-36S-MLL-AF9-Zellen analysiert. Insgesamt wurden 1.939 signifikante DEG ($p < 0,05$) gefunden, darunter 1.226 Gene, welche eine höhere Expression in GFI1-KD-leukämischen Zellen zeigten und 713 Gene, welche eine niedrigere Expression in den GFI1-KD-Zellen im Vergleich zu GFI1-36S-leukämischen Zellen zeigten. Unter diesen 1.226 DEG waren 42 Gene, welche direkt oder indirekt bei der DNA-Reparatur beteiligt sind. Von diesen 42 DEG zeigten 16 Gene eine höhere Expression (z.B.: *Cul4b*, *Dna2*, *Sumo1*, *Ube2b*) und 26 Gene eine geringere Expression (z.B.: *Mid1*, *Nhej1*, *Pold2*, *Rad50*) in GFI1-KD- gegenüber GFI1-36S-MLL-AF9-Zellen (Abb. 27). Es wurden insgesamt 536 Überschneidungen mit den DEG der GFI1-36S-leukämischen Zellen im Vergleich zu GFI1-36S-leukämischen Zellen gefunden. Unter diesen 536 Überschneidungen waren 13 Gene, deren Produkte eine direkte Rolle bei der DNA-Reparatur oder eine indirekt Rolle bei der Schadensantwort spielen (z.B.: *Cul4b*, *Dna2*, *Nhej1*) (Abb. 27, blaue Punkte).

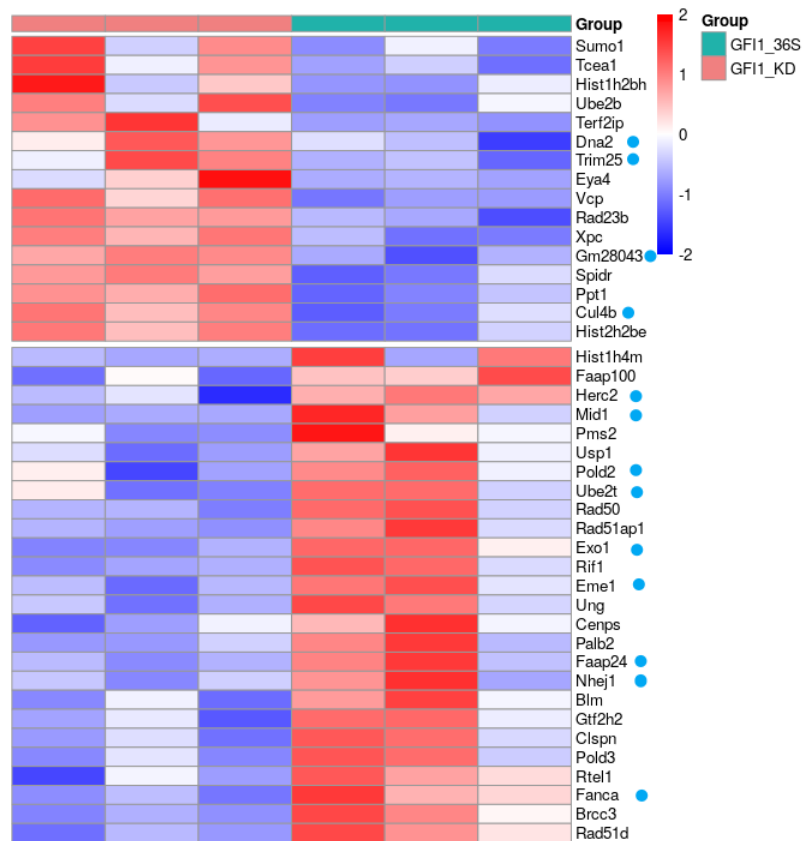


Abbildung 27: Heatmap der DEG der DNA-Reparatur oder DNA-Schadensantwort zwischen GFI1-KD- und GFI1-36S-leukämischen Zellen.

Hier dargestellt sind die DEG zwischen den murinen leukämischen GFI1-36S- (grün) und GFI1-KD-MLL-AF9-Knochenmarkszellen (rot), welche bei der DNA-Reparatur oder der Schadensantwort eine Rolle spielen. Die Gene wurden aus der Liste an DEG mithilfe der Reactom Pathway Browser version 3.7 ausgewählt. rot: höher exprimiert, blau: niedriger exprimiert; blauer Punkt hinter den Gennamen: Überschneidungen mit GFI1-36N-MLL-AF9; $p < 0,05$

Von den humanen und den murinen Daten kann zusammengefasst werden, dass leukämische GFI1-36N-Zellen eine höhere Anzahl an genomischen Veränderungen aufweisen und viele Gene der DNA-Reparatur verändert bzw. differentiell exprimiert sind. Das Gleiche konnte in murinen leukämischen GFI1-KD-Zellen gezeigt werden. Diese Ergebnisse lieferten außerdem erste Hinweise darauf, dass in Zellen mit verändertem GFI1 ein Defekt der DNA-Reparatur vorliegt.

4.2 Geringe GF11-Level und die *GF11-36N*-Variante beeinflussen die DNA-Reparatur und erhöhen den DNA-Schaden

Es wurde publiziert, dass GF1-KO-hämatopoetischen Zellen eine Herunterregulierung von Genen der DNA-Reparatur aufweisen (Khandanpour et al., 2013). Außerdem wurde beschrieben, dass es auf Grund von epigenetischen Veränderungen in *GF11-36N*-leukämischen Zellen zu einer veränderten Genexpression von DNA-Reparaturgenen kommt (Botezatu et al., 2016b). Angesichts dieser Hinweise, dass GF11 bei der DNA-Reparatur eine Rolle spielen könnte sowie den Ergebnissen der RNA-Sequenzierung, dass in *GF11-36N*- und *GF11-KD*-leukämischen Zellen Gene der DNA-Reparatur verändert exprimiert waren, wurde die Rolle von GF11 in der DNA-Reparatur näher untersucht.

4.2.1 *GF11-KD*- und *GF11-36N*-Zellen haben einen höheren DNA-Schaden

Zur näheren Untersuchung der Rolle von GF11 in der DNA-Reparatur wurde zunächst die Fähigkeit von *GF11-36N*- und *GF11-KD*-Zellen, durch Strahlung induzierte DNA-Schäden zu reparieren, gemessen. Hierfür wurde zuerst der γ H2AX-Assay verwendet. Dieser Assay basiert darauf, dass eine der ersten Schadensantworten auf Grund von DSB die Phosphorylierung des Histons H2AX ist. Nach der Phosphorylierung wird das Histon γ H2AX genannt (Ciccica and Elledge, 2010). Die γ H2AX-Stellen können mittels Antikörpern nachgewiesen werden und die Anzahl an γ H2AX-Foci liefert einen indirekten Nachweis des DNA-Schadens in den Zellen. Hierbei ist die Anzahl an Foci proportional zur Anzahl der DSB (Ibuki and Toyooka, 2015). Zuerst wurde die Funktionsfähigkeit des Assays überprüft. Hierfür wurden Thymozyten aus WT-Mäusen mit unterschiedlicher Bestrahlungsintensität (1, 2 und 5 Gy) bestrahlt und die Anzahl an γ H2AX-Foci nach unterschiedlichen Zeitpunkten (30, 60, 120 und 240 min) gemessen. Thymozyten wurden gewählt, da diese eine hohe *GF11*-Expression zeigen und im Vergleich zu HSCs leichter zu isolieren sind (Gilks et al., 1993; Karsunky et al., 2002). Die Thymozyten, welche nicht bestrahlt wurden, zeigten nahezu keine Foci und mit steigender Bestrahlungsintensität stieg die Anzahl an γ H2AX-Foci. Das Maximum der Foci wurde 120 min nach der Bestrahlung detektiert und nach 240 min hatten alle Proben wieder den Ausgangswert an γ H2AX-Foci erreicht (Abb. 28 A). Die Korrelation zwischen γ H2AX-Foci und der Bestrahlungsintensität ist bereits nach 60 min deutlich auf den Immunfluoreszenzbildern zu sehen (Abb. 28 B). Bereits mit einer Bestrahlungsintensität von 2 Gy ist die Reparaturkinetik deutlich zu sehen (Abb. 28).

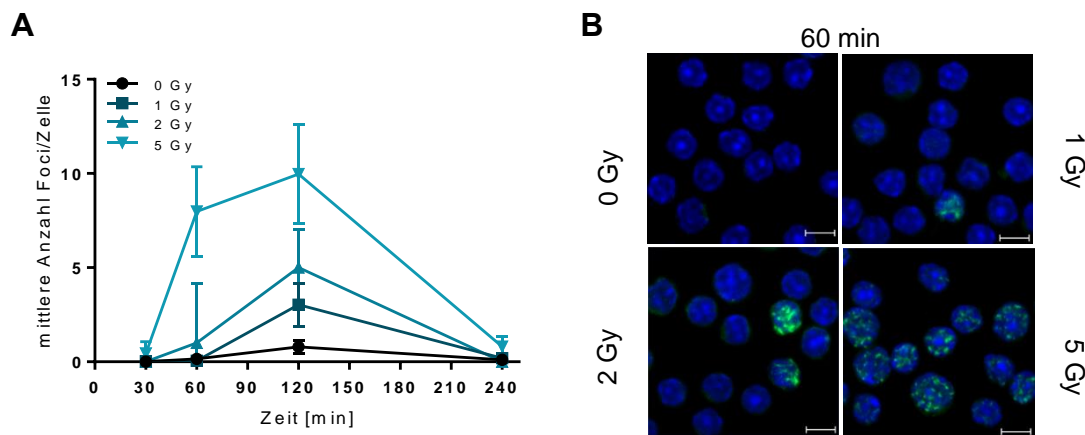


Abbildung 28: Test γ H2AX-Assay

WT-Thymozyten wurden zum Test mit unterschiedlicher Intensität bestrahlt (1, 2, 5 Gy). Als Kontrolle dienten nicht bestrahlte (0 Gy) Thymozyten. Der DNA-Schaden wurde mittels γ H2AX-Assay (Immunfluoreszenz) 30, 60 und 120 min nach der Bestrahlung gemessen. **A)** Dargestellt sind die mittleren Anzahlen der γ H2AX-Foci/Zelle. Es wurden 20-30 Zellen pro Bedingung ausgewertet. Zur Analyse der Foci wurde Imaris verwendet. Mittelwert \pm SD. In **B)** sind repräsentative Bilder der Zellen des 60 min Zeitpunkt nach Bestrahlung dargestellt.

Auf Grund dieser Vorversuche wurden für die Versuche zur Untersuchung der DNA-Reparatur bzw. des DNA-Schadens in murinen *GFI1-36S*-, *GFI1-36N*- und *GFI1-KD*-Thymozyten die Proben mit 2 Gy bestrahlt. Der γ H2AX-Assay wurde 30, 60 und 120 min nach Bestrahlung durchgeführt. Als Kontrolle wurden nicht bestrahlte Zellen verwendet und zu denselben Zeitpunkten wie die bestrahlten Proben gefärbt (Abb. 29).

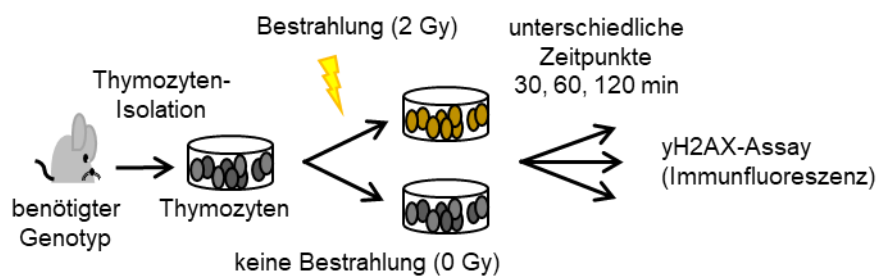


Abbildung 29: Schematischer Versuchsablauf des γ H2AX-Assay

Zur Auswertung der γ H2AX-Foci wurden mindestens 50 Zellen/Probe mit einem Konfokalmikroskop aufgenommen („Z-Stacks“) und mithilfe des Programms Imaris konnte die Anzahl an Foci in einzelnen Zellen bestimmt werden. Der γ H2AX-Test wurde viermal mit *GFI1-36N*- und *GFI1-36S*-Thymozyten durchgeführt und zweimal davon wurden *GFI1-KD*-Thymozyten mituntersucht. In Abbildung 30 und 31 sind die Ergebnisse eines repräsentativen Assays dargestellt. Abbildung 30 zeigt

repräsentative Bilder eines γ H2AX-Assays. Die grünen Punkte im Zellkern (blau, DAPI-Färbung) sind die γ H2AX-Foci. In den nicht bestrahlten Kontroll-Proben waren nahezu keine Foci zu sehen. Dagegen stieg die Anzahl an Foci nach der Bestrahlung und erreichte den Maximalwert nach 60 min. Die *GFI1-36N*- und *GFI1-KD*-Thymozyten hatten nach 60 min mehr γ H2AX-Foci als die *GFI1-36S*-Thymozyten. Außerdem waren in den *GFI1-36N*- und *GFI1-KD*-Zellen nach 120 min noch mehr Foci zu sehen als in den *GFI1-36S*-Proben (Abb. 30).

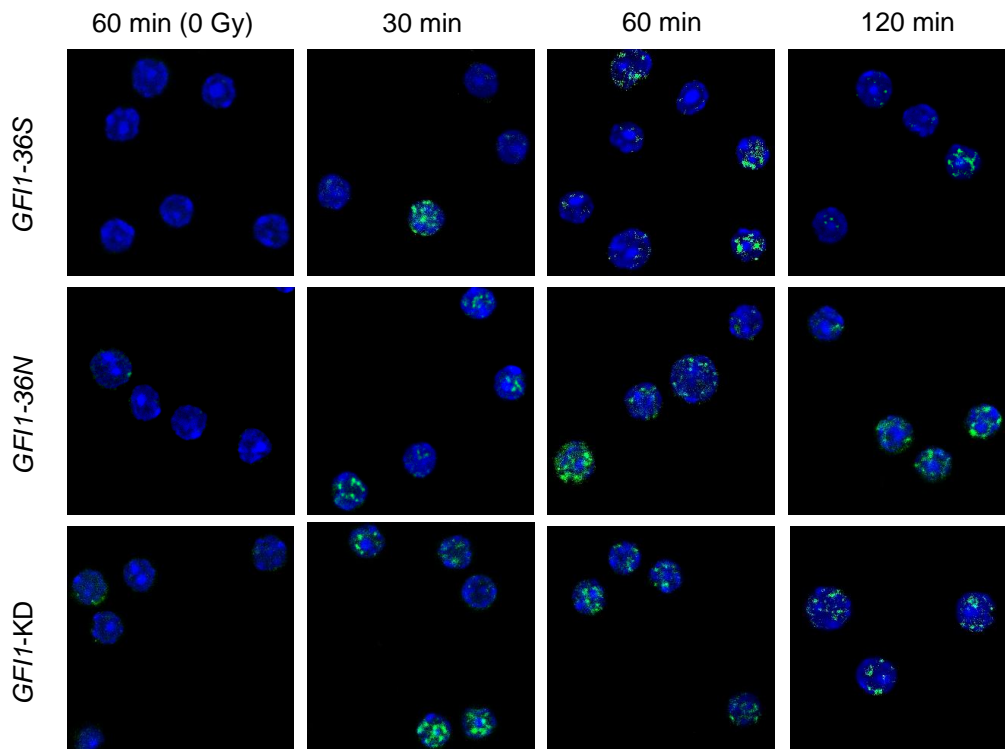


Abbildung 30: Repräsentative Bilder des γ H2AX-Assays mit bestrahlten Thymozyten

Die Bilder wurden mit dem Zeiss ELYRA PS.1 Super-resolution and TIRF Mikroskop mit einem 64x Objektiv aufgenommen. 0 Gy=Kontrolle; blau=DAPI-Färbung, grün (Alexa-Fluor 488)= γ H2AX-Foci

Noch deutlicher wird der Unterschied zwischen den drei Genotypen bei der Analyse der prozentualen Anzahl an Foci/Zelle (Abb. 31 A). Die nicht bestrahlten Proben der *GFI1-36S*- und *GFI1-36N*-Thymozyten haben nahezu die gleiche Anzahl an γ H2AX-Foci/Zelle, sowohl nach 30, 60 als auch 120 min. Die prozentuale Anzahl der Zellen mit 1-4 Foci lag ohne Bestrahlung bei den *GFI1-KD*-Thymozyten etwas höher (49,2%) als bei den anderen beiden Genotypen (*GFI1-36S*: 31,6%, *GFI1-36N*: 28,5%). Bei allen drei Genotypen (ohne Bestrahlung) lag der prozentuale Anteil an Zellen mit null Foci jedoch bei über 50% (Abb. 31 B). Bei allen drei untersuchten Genotypen war das Maximum an γ H2AX-Foci 60 min nach der Bestrahlung erreicht (Abb. 31 A & C). Die *GFI1-36N*- (27,54%) und *GFI1-KD*-Thymozyten (8,57%) hatten bereits 30 min nach

Initiierung des DNA-Schadens einen geringeren Anteil an Zellen mit null Foci gegenüber den *GF11-36S*-Thymozyten (43,80%). Mit der Zeit stieg auch die Anzahl an Foci/Zelle. Nach 60 min lag der Anteil an Zellen mit 20 oder mehr Foci in den *GF11-36N*-Thymozyten bei 23,08% und in *GF11-KD*-Thymozyten bei 19,23% und war demnach höher als in den *GF11-36S*-Thymozyten (11,88%). Nach 120 min sank der Anteil an Zellen mit vielen H2AX-Foci und der Anteil an Zellen mit null Foci stieg an. Zu diesem Zeitpunkt gab es in den *GF11-36S*-Thymozyten keine Zelle mit 20 oder mehr Foci. Dagegen hatten bei den *GF11-36N*-Proben noch 4,8% und bei den *GF11-KD*-Proben noch 1,9% der Thymozyten 20 oder mehr Foci. Der Anteil an Thymozyten mit null Foci 120 min nach der Bestrahlung, betrug bei den *GF11-36S*-Proben 30,0% und war höher als bei den *GF11-36N*-Proben (20,5%) und bei den *GF11-KD*-Proben (13,0%) (Abb. 31 A). Bei der Analyse der mittleren Anzahl an Foci/Zelle über die Zeit hatten die *GF11-36N*- ($p=0,044$) und *GF11-KD*-Thymozyten ($p=0,037$) signifikant mehr γ H2AX-Foci und demnach mehr DNA-Schäden. Trotz des höheren DNA-Schadens sank die Anzahl an Foci nach 120 min in den *GF11-36N*-Zellen nahezu parallel zu den *GF11-36S*-Zellen mit geringerem Schaden. Nach 120 min betrug die Anzahl an γ H2AX-Foci in den *GF11-36N*-Thymozyten noch ca. 45% von der maximalen Anzahl an Foci/Zelle (nach 60 min). Bei den *GF11-36S*-Proben betrug die Anzahl an Foci nach 120 min noch ca. 30% des Maximalwertes. Die mittlere Anzahl an Foci/Zelle in den *GF11-KD*-Zellen ist nach 120 min nur etwas geringer ($8,45 \pm 5,37$) als nach dem Maximum bei 60 min ($10,35 \pm 8,48$) (Abb. 31 C). Zusammenfassend hatten die *GF11-36N*- und die *GF11-KD*-Zellen mehr γ H2AX-Foci und demnach mehr durch Bestrahlung induzierten DNA-Schaden. Der Schaden nahm in den *GF11-36S*- und *GF11-36N*-Thymozyten nach 120 min wieder ab, wohingegen die Anzahl an Foci in den *GF11-KD*-Zellen nur langsam abnahm.

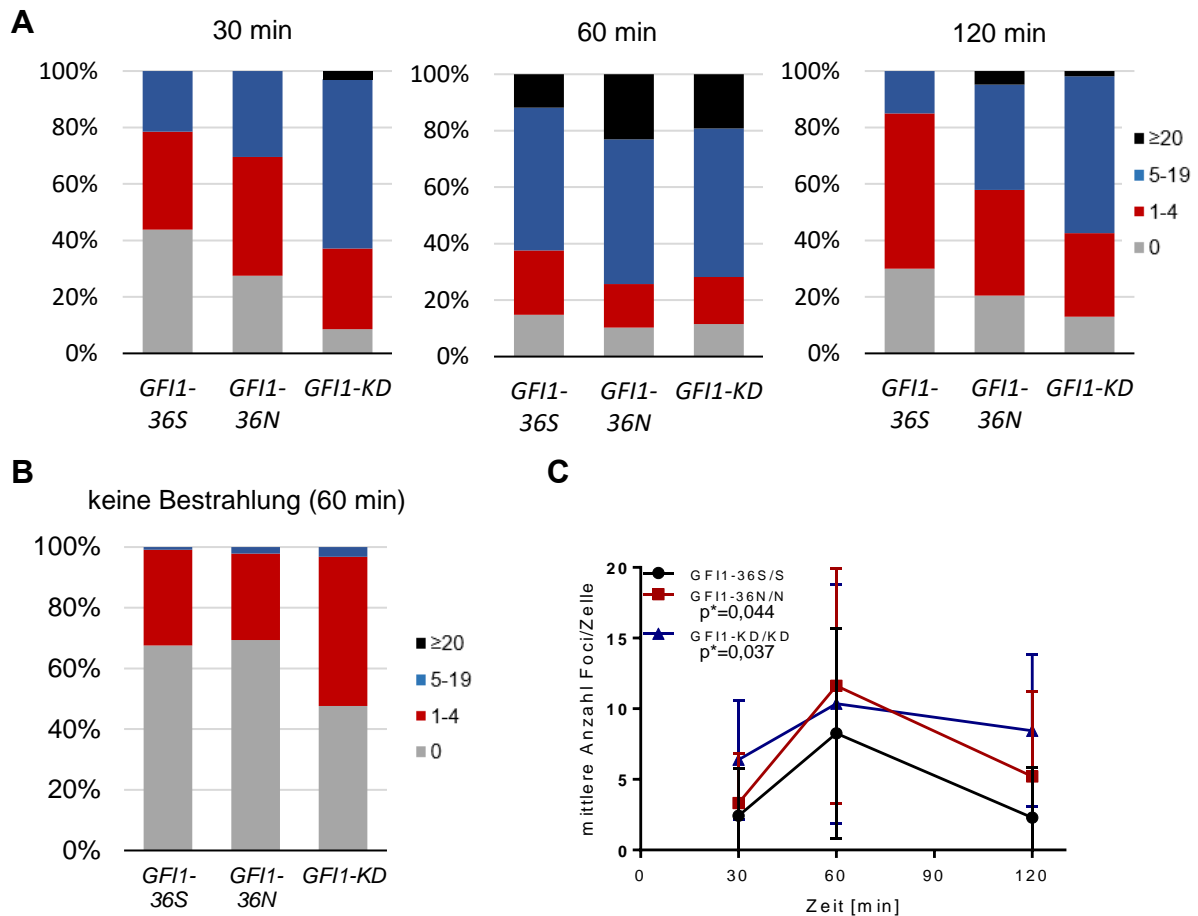


Abbildung 31: Höherer DNA-Schaden nach Bestrahlung in GFI1-36N- und GFI1-KD-Thymozyten als in GFI1-36S-Thymozyten

Dargestellt sind die Ergebnisse eines (von vier) γ H2AX-Assays. GFI1-36N- und GFI1-36S- sowie GFI1-KD-Thymozyten wurden mit 2 Gy bestrahlt. Der DNA-Schaden wurde mittels γ H2AX-Assay 30, 60 und 120 min nach der Bestrahlung gemessen. Zur Bestimmung der Foci/Zelle wurde Imaris verwendet. In **A** ist die Anzahl an Foci/Zellen [%] ($x\%$ Zellen haben y Foci) dargestellt. Es wurden 50 - 197 Zellen pro Bedingung ausgewertet. In **B** sind die Ergebnisse ohne Bestrahlung dargestellt. Die nicht bestrahlten Proben wurden zusammen mit dem 60 min Zeitpunkt (nach Bestrahlung) durchgeführt. Es wurden 50 - 176 Zellen pro Bedingung ausgewertet. Aufgetragen ist die Anzahl an Foci/Zellen [%]. In **C** ist die mittlere Anzahl Foci/Zelle (Gesamtanzahl Foci/Gesamtzahl Zellen) dargestellt. Mittelwert \pm SD; GFI1-36N vs. GFI1-36S: $p^*=0,044$; GFI1-KD vs. GFI1-36S: $p^*=0,037$.

Zur Überprüfung der Ergebnisse des γ H2AX-Assay wurde der Comet-Assay verwendet. Der Comet-Assay hat seinen Namen daher, dass die Zellen nach der Elektrophorese wie ein Komet aus einem Kopf und einem Schweif bestehen. Der Schweif enthält die geschädigte, fragmentierte DNA und im Kopf ist die unbeschädigte DNA zu finden (Pu et al., 2015; Lu et al., 2017). In dieser Arbeit wurde der alkalische Comet-Assay verwendet. Mit dem alkalischen Comet-Assay können u.a. DSB und SSB nachgewiesen werden (Olive and Banáth, 2006; Pu et al., 2015). Zur Auswertung des Comet-Assays bzw. zur Angabe des DNA-Schadens in den Einzelzellen wurde der mittlere Tail Moment mithilfe der Open Comet Software sowie dem CaspLab-Programm analysiert. Der Parameter „Tail Moment“ ist das Produkt aus Schweiflänge

und prozentualem Anteil der DNA im Schweif (Gyori et al., 2014). Wie bereits beim γ H2AX-Assay, wurde hier zunächst die Funktionalität des Assays mittels unterschiedlicher Bestrahlungsintensitäten nachgewiesen. Es wurden Thymozyten aus WT-Mäusen mit 5 Gy und 30 Gy bestrahlt. Als Kontrolle dienten nicht bestrahlte Thymozyten. Es konnte gezeigt werden, dass der mittlere Tail Moment mit steigender Bestrahlungsintensität zunimmt und in nicht bestrahlten Zellen nahezu null beträgt (Abb. 32).

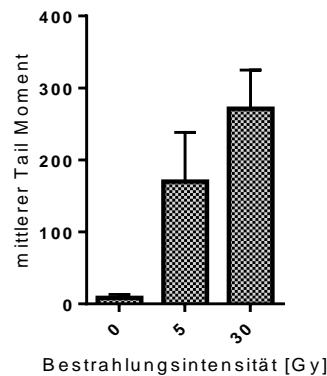


Abbildung 32: Test Comet-Assay

Zur Überprüfung der Funktion des alkalischen Comet-Assays wurden Thymozyten mit 5 Gy und 30 Gy bestrahlt. Als Kontrolle wurden nicht bestrahlte Thymozyten verwendet. Der Comet-Assay wurde 60 min nach Bestrahlung durchgeführt. Es wurden ca. 50 Zellen/Bedingung ausgewertet. Für die Bestimmung des mittleren Tail Moments wurde die Open Comet Software verwendet. Mittelwert \pm SD

Da 5 Gy bereits genügte, um ausreichend Schäden zu induzieren und diesen mittels Comet-Assay zu detektieren, wurden die Thymozyten der *GFI1-36S*-, *GFI1-36N*- sowie *GFI1-KD*-Mäuse *in vitro* mit 5 Gy bestrahlt und anschließend wurde der Comet-Assay nach 15, 30, 45 und 60 min durchgeführt. Als Kontrolle wurden nicht bestrahlte Thymozyten des jeweiligen Genotyps verwendet (NoIr) (Abb. 33).

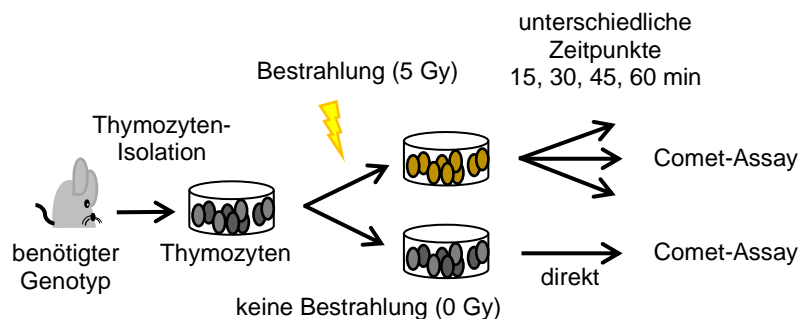


Abbildung 33: Schematische Versuchsdurchführung Comet-Assay

Zunächst wurde der Comet-Assay mit *GF11-36S*- und *GF11-36N*-Thymozyten durchgeführt. In Abbildung 34 ist eins von drei Ergebnissen dargestellt. Ohne Bestrahlung hatten die Zellen keinen Schweif und somit nahezu keine DNA-Fragmente bzw. DNA-Schäden (Pu et al., 2015). Die Größe sowie die Intensität des Schweifs und somit der DNA-Schaden war nach 15 min in beiden Genotypen am größten. In den *GF11-36N*-Thymozyten wurde der Schweif nach Bestrahlung jedoch größer als in den *GF11-36S*-Thymozyten (Abb. 34 A). Dies spiegelte sich auch in den mittleren Tail Momenten wider. Beide Genotypen hatten ohne Bestrahlung nahezu den gleichen mittleren Tail Moment und somit nahezu den gleichen DNA-Schaden. Mit Bestrahlung stieg der mittlere Tail Moment bei den *GF11-36N*-Thymozyten 15 min nach der Bestrahlung auf bis zu $16,21 \pm 4,63$, wohingegen der mittlere Tail Moment in den *GF11-36S*-Thymozyten auf lediglich $8,73 \pm 3,31$ anstieg und somit nur ca. halb so groß war wie in *GF11-36N*-Thymozyten. In den *GF11-36S*-Thymozyten war der mittlere Tail Moment bereits nach 45 min geringer ($2,31 \pm 0,95$) als in den nicht bestrahlten Kontrollzellen ($4,16 \pm 2,44$), der DNA-Schaden war in diesen Zellen somit nahezu repariert. Bei den *GF11-36N*-Thymozyten nahm der mittlere Tail Moment nach 15 min deutlich ab. Dennoch erreichten die bestrahlten *GF11-36N*-Thymozyten nach 60 min nicht ganz den Wert der nicht bestrahlten Zellen (5 Gy: $5,26 \pm 3,10$; NoIR: $4,90 \pm 2,05$). Der mittlere Tail Moment bzw. der DNA-Schaden über die gesamte Zeit war, wie bereits beim γ H2AX-Assay, in *GF11-36N*-Thymozyten signifikant ($p=0,008$) höher als in *GF11-36S*-Thymozyten (Abb. 34 B).

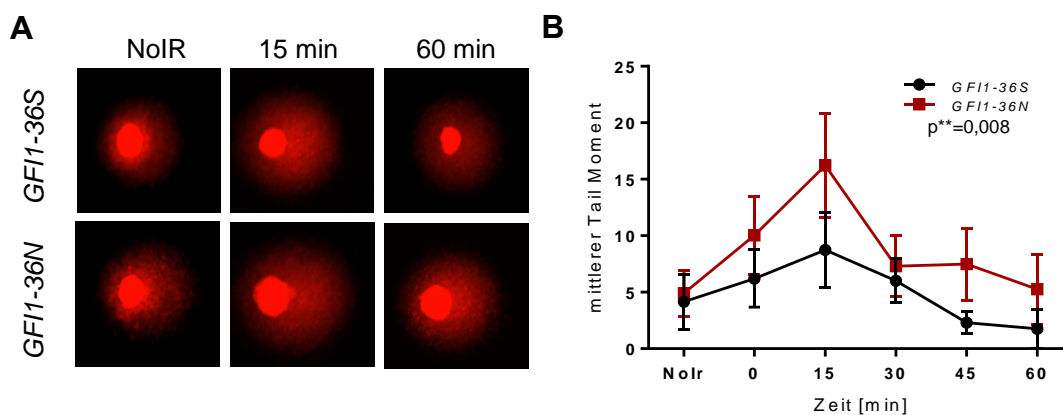


Abbildung 34: Höherer direkter DNA-Schaden nach Bestrahlung in *GF11-36N*-Thymozyten als in *GF11-36S*-Thymozyten

Dargestellt ist einer von drei alkalischen Comet-Assays mit murinen *GF11-36N*- und *GF11-36S*-Thymozyten. Die Zellen wurden mit 5 Gy bestrahlt und der DNA-Schaden wurde nach 0, 15, 30, 45 und 60 min gemessen. Als Kontrolle wurde der Comet-Assay mit Zellen ohne Bestrahlung (NoIR) durchgeführt. **A**) Repräsentative Bilder von Kometen ohne Bestrahlung und 15 min bzw. 60 min nach Bestrahlung. Die Bilder wurden mit dem Zeiss Axio Observer.Z1 and Apotome aufgenommen. In **B**) ist die graphische Auswertung dargestellt. Es wurden 34-65 Zellen pro Bedingung ausgewertet. Zur Bestimmung des Tail Moments wurde die Comet-Assay Software von CaspLab verwendet. Mittelwert \pm SD; $**p=0,008$

Der gleiche Versuchsaufbau wurde mit *GFI1*-KD-Thymozyten im Vergleich mit *Gfi1*-36S-Thymozyten durchgeführt. In Abbildung 35 ist ein repräsentatives Ergebnis des Comet-Assays dargestellt. Die nicht bestrahlten Kontrollen von beiden Genotypen hatten nahezu keinen Comet-Schweif bzw. keinen DNA-Schaden. Nach der Bestrahlung wurde der Schweif deutlich größer und erreichte beim 30 min-Zeitpunkt sein Maximum (Abb. 35 A). Bei der Auswertung der mittleren Tail Momente wurde deutlich, dass die *GFI1*-KD-Thymozyten nur nach 30 min einen Unterschied gegenüber den *Gfi1*-36S-Thymozyten zeigten. Nach 30 min war der Tail Moment der *GFI1*-KD-Zellen ($33,14 \pm 15,09$) höher als der der *Gfi1*-36S-Zellen ($20,44 \pm 4,39$). Bei allen anderen Zeitpunkten konnte kein großer Unterschied zwischen den zwei Genotypen festgestellt werden (Abb. 35 B).

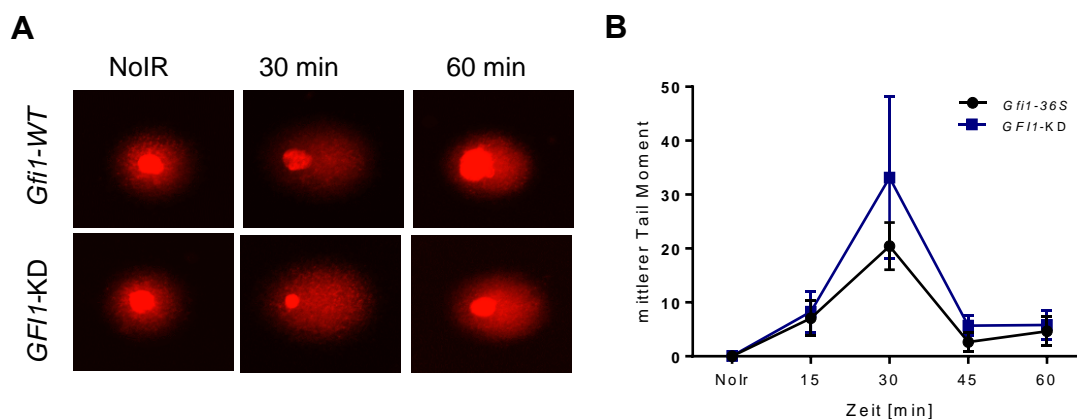


Abbildung 35: Comet Assay der *GFI1*-KD- und *Gfi1*-WT-Thymozyten

Dargestellt ist ein repräsentativer Comet-Assay von *GFI1*-KD- und *Gfi1*-36S-Thymozyten. Der Comet-Assay wurde 15, 30, 45 und 60 min nach Bestrahlung (5 Gy) durchgeführt. Als Kontrolle wurde der Comet-Assay mit Zellen des jeweiligen Genotyps ohne Bestrahlung (NoIR) durchgeführt. **A)** Repräsentative Bilder von Kometen ohne Bestrahlung, 30 min und 60 min nach Bestrahlung. Die Bilder wurden mit dem Zeiss Axio Observer.Z1 und Apotome aufgenommen. In **B)** ist die graphische Auswertung der mittleren Tail Momente von *GFI1*-KD- und *Gfi1*-36S-Thymozyten im Vergleich dargestellt. Es wurden 22-50 Zellen ausgewertet. Zur Bestimmung des Tail Moments wurde die Comet-Assay Software von CaspLab verwendet. Mittelwert \pm SD

Die *GFI1*-36N- sowie *GFI1*-KD-Thymozyten zeigten nach Bestrahlung sowohl indirekt als auch direkt einen höheren DNA-Schaden als *GFI1*-36S-Zellen. Je nach DNA-Schaden werden in den Zellen unterschiedliche Reparaturwege eingeleitet (Dexheimer, 2013). Bei der Untersuchung mittels γ H2AX-Assay und Comet-Assay kann lediglich eine Aussage zum DNA-Schaden sowie zur DNA-Reparatur allgemein getroffen werden, nicht aber welcher DNA-Reparaturweg ggf. gehemmt oder hochreguliert ist. Deshalb wurde die Fähigkeit der Zellen, die homologe Rekombination durchzuführen, mittels Plasmid-basiertem Assay näher untersucht. Hierfür wurden

murine Zellen *in vitro* mit zwei Plasmiden transfiziert. Diese zwei Plasmide bilden nach erfolgreicher HR ein HR-Produkt, welches mit einem speziellen Primer mittels RT-PCR detektiert werden kann (Abb. 36). In Zellen mit hoher „Expression“ des HR-Produkts wird dementsprechend häufiger die HR durchgeführt. Zunächst wurde der HR-Assay mit *GFI1-36S*- und *GFI1-36N*-Lin⁻-nicht leukämischen Zellen ohne vorherige Bestrahlung durchgeführt (Abb. 36). Die Expression des HR-Produkts der *GFI1-36S*-nicht leukämischen Zellen wurde auf eins gesetzt und die *Fold-change* Expression der *GFI1-36N*-Zellen hierzu normalisiert. Die *GFI1-36N*-Lin⁻-Zellen zeigten eine höhere *Fold-change* Expression des HR-Produkts und somit eine höhere HR-Rate als die *GFI1-36S*-Lin⁻-Zellen ($1,47 \pm 1,04$ vs. $1,00 \pm 0,61$) (Abb. 37 A). Des Weiteren wurde die Expression des HR-Produkts in den zwei Genotypen nach einer zusätzlichen Bestrahlung mit 2 Gy untersucht (Abb. 36). Einen Tag nach der zusätzlichen Bestrahlung, war die *Fold-change* Expression des HR-Produkts in *GFI1-36N*-nicht leukämischen Zellen im Vergleich zu den *GFI1-36S*-nicht leukämischen Zellen deutlich angestiegen ($3,60 \pm 1,67$ vs. $1,00 \pm 1,22$) und der Unterschied war nahezu doppelt so hoch wie in nicht bestrahlten *GFI1-36N*-Zellen ($1,47 \pm 1,04$) (Abb. 37 B).

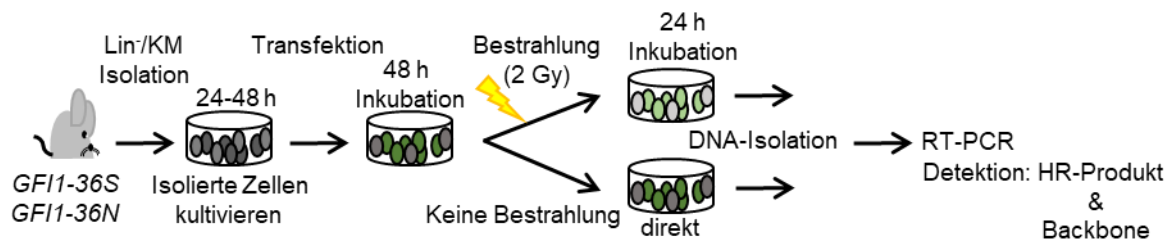


Abbildung 36: Schematischer Versuchsaufbau des Homologen-Rekombinations-Assays

GFI1-36S- und *GFI1-36N*-Lin⁻- bzw. -leukämische Knochenmarkzellen wurden mit den Plasmiden des „Homologous Recombination Assay Kit“ transduziert. Bei einem Versuchsaufbau wurden die Zellen 24 h vor der DNA-Isolation mit 2 Gy bestrahlt. Beim anderen Versuchsaufbau wurden die Zellen 48 h nach der Transfektion direkt für die RT-PCR vorbereitet. Es wurden Primer zur Detektion des HR-Produktes eingesetzt und als Kontrolle wurden Primer zur Detektion des „Primer-Backbones“ verwendet.

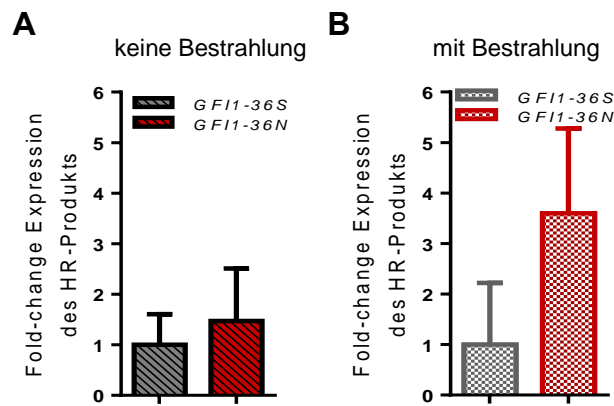


Abbildung 37: Höhere HR-Rate in GFI1-36N-nicht leukämischen Zellen gegenüber GFI1-36S-nicht leukämischen Zellen

Durchgeführt wurde der Homologe Rekombinations-Assay mit *Lin⁻*-nicht leukämischen Zellen aus GFI1-36S- und GFI1-36N-Mäusen. Die Ergebnisse der Expression des HR-Produkts wurden zu den Ergebnissen des Backbones normalisiert. Die Fold-change Expression der GFI1-36N-Zellen wurde relativ zu denen der GFI1-36S-Zellen berechnet. In **A**) sind die Ergebnisse des HR-Assays ohne zusätzliche Bestrahlung dargestellt. $n=3$; Mittelwert \pm SEM. In **B**) sind die Ergebnisse des HR-Assays mit zusätzlicher Bestrahlung dargestellt. $n=2$; Mittelwert \pm SD

Als Nächstens wurde die Fähigkeit, die HR durchzuführen, in leukämischen Knochenmarkzellen aus, mit *MLL-AF9*-transplantierten Mäusen untersucht. Bei dieser Analyse konnte ohne zusätzliche Bestrahlung gezeigt werden, dass die *Fold-change* Expression des HR-Produktes in GFI1-36N-leukämischen Zellen geringer war ($0,36 \pm 0,92$) als in den GFI1-36S-leukämischen Zellen ($1,00 \pm 1,33$). Die GFI1-36N-leukämischen Zellen hatten somit eine niedrigere HR-Rate als die leukämischen Zellen mit GFI1-36S-Genotyp (Abb. 38 A). Des Weiteren wurde die *Fold-change* Expression des HR-Produkts der GFI1-36S- bzw. GFI1-36N-leukämischen-Zellen zu den dazugehörigen GFI1-36S- bzw. GFI1-36N-nicht leukämischen Zellen normalisiert. Hierbei wurde festgestellt, dass es zwischen den GFI1-36S-leukämischen Zellen ($1,00 \pm 0,99$) und den GFI1-36S-nicht leukämischen Zellen ($1,00 \pm 0,61$) keinen Unterschied in der *Fold-change* Expression des HR-Produkts gab. Dagegen war der Unterschied zwischen den GFI1-36N-leukämischen Zellen und den GFI1-36N-nicht leukämischen Zellen deutlich größer. Die GFI1-36N-leukämischen-Zellen hatten eine geringere *Fold-change* Expression des HR-Produkts ($0,24 \pm 0,56$) als die GFI1-36N-nicht leukämischen Zellen ($1,00 \pm 0,81$) (Abb. 38 B). Somit hatten GFI1-36N-leukämische Zellen eine geringere HR-Rate als GFI1-36S-leukämische Zellen und GFI1-36N-nicht leukämische Zellen (Abb. 38).

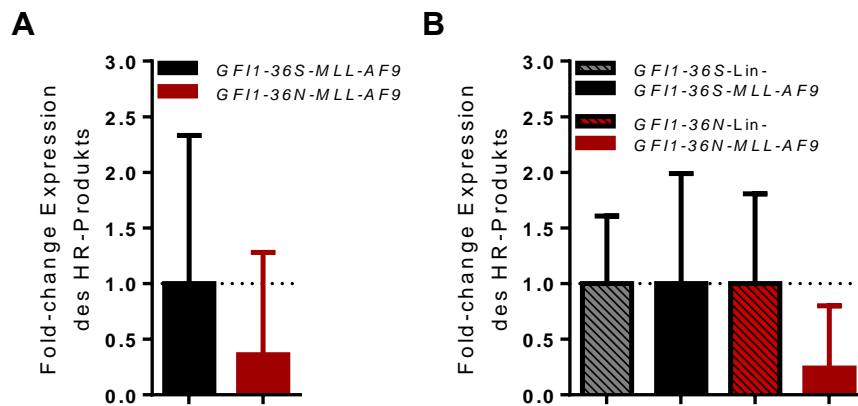


Abbildung 38: Geringere HR-Rate in GF11-36N-leukämischen Knochenmarkzellen als in GF11-36S-leukämischen und nicht leukämischen Zellen

A) Durchgeführt wurde der Homologe Rekombinations-Assay mit GF11-36S- und GF11-36N-leukämischen Knochenmarkzellen aus transplantierten Mäusen (MLL-AF9). Dargestellt sind die Ergebnisse der RT-PCR des HR-Produkts normalisiert zur Expression des „Primer-Backbones“. Die normalisierten Ergebnisse der GF11-36N-MLL-AF9-Zellen wurden relativ zu den normalisierten Ergebnissen der GF11-36S-MLL-AF9-Zellen berechnet. GF11-36S-MLL-AF9: $n=5$, GF11-36N-MLL-AF9: $n=3$, Mittelwert \pm SEM. In **B)** wurden die Ergebnisse der RT-PCR von den GF11-36S- und GF11-36N-leukämischen Zellen aus A) zu den dazugehörigen nicht bestrahlten GF11-36S- bzw. GF11-36N-nicht leukämischen Zellen aus Abb. 37 A) normalisiert. GF11-36S-Lin: $n=3$, GF11-36S-MLL-AF9: $n=5$, GF11-36N-Lin & -MLL-AF9: $n=3$, Mittelwert \pm SEM

Bei den Analysen der DNA-Schäden nach Bestrahlung wurden Unterschiede zwischen den GF11-36N- und GF11-KD-Zellen im Vergleich mit den GF11-36S-Zellen gefunden. Außerdem zeigten die funktionellen Untersuchungen zur HR-Rate Veränderungen zwischen GF11-36N-Zellen im Vergleich mit GF11-36S-Zellen und es wurden Unterschiede in der DNA-Reparaturkapazität zwischen GF11-36N-nicht leukämischen und GF11-36N-leukämischen Zellen detektiert. Damit diese detektierten Unterschiede besser nachvollzogen werden konnten, wurde die Genexpression von 84 DNA-Reparaturgenen mittels RT²-Profiler PCR-Array näher untersucht. Hierzu wurden Thymozyten aus nicht leukämischen Mäusen mit und ohne Bestrahlung sowie leukämische Knochenmarkzellen (MLL-AF9) aus transplantierten Mäusen mit 5 Gy Bestrahlung und ohne Bestrahlung verwendet. Die Bestrahlung fand eine Stunde vor der Probenvorbereitung statt. In den GF11-36N-Zellen wurden 20 Gene gefunden, welche in mindestens zwei Zelltypen große Unterschiede in deren Expression (Fold-change Expression ≥ 2 bzw. ≤ -2), im Vergleich zu GF11-36S-Zellen zeigten. Die meisten der Gene hatten eine geringere Expression in GF11-36N-Zellen und dabei vor allem in GF11-36N-leukämischen Zellen. Unter den besten Ergebnissen kamen die Gene *Mgmt*, *Apex1*, *Ogg1* und *Rad51b* vor. *Mgmt* war in allen getesteten GF11-36N-Zellen gegenüber den GF11-36S-Zellen herunterreguliert. Lediglich *Cdkn1a* hatte eine höhere Expression in GF11-36N-leukämischen Zellen und *Chek2* zeigte eine höhere

Expression in bestrahlten Thymozyten aus nicht leukämischen *GF11-36N*-Mäusen (Tab. 16).

Tabelle 16: Liste der veränderten DNA-Schadensantwortgene in *GF11-36N*-Zellen im Vergleich mit *GF11-36S*-Zellen

Dargestellt sind die Gene, welche in mindestens zwei Proben eine Fold-change Expression von ≥ 2 bzw. ≤ -2 , zwischen *GF11-36N*- und *GF11-36S*-Zellen zeigten. Die Ergebnisse stammen vom RT² Profiler PCR Array „DNA Damage Signaling Pathway“. Es wurden folgende Zelltypen getestet: nicht bestrahlte und bestrahlte Thymozyten sowie nicht bestrahlte und bestrahlte leukämische (*MLL-AF9*) Knochenmarkzellen. Die Bestrahlung wurde mit 5 Gy eine Stunde vor Probenvorbereitung durchgeführt. Zur Normalisierung der Array-Ergebnisse wurden 5 Haushaltsgene (eng.: housekeeping genes) mitgetestet und zur Validierung der Ergebnisse wurden 5 Kontrollen (*GDC*, *PPC* & *RTC*) verwendet. Negative Werte: geringe Genexpression in *GF11-36N*; positive Werte: höhere Genexpression in *GF11-36N* (grün); pro Zelltyp: n=1

Gen	GF11-36N vs. GF11-36S			
	Thymozyten 0 Gy	Thymozyten 5 Gy	KM von leukämischen Mäusen 0 Gy	KM von leukämischen Mäusen 5 Gy
<i>Mgmt</i>	(-2.53)	(-2.21)	(-2.57)	(-3.05)
<i>Chek2</i>		(+2.22)	(-3.94)	(-4.32)
<i>Apex1</i>			(-3.21)	(-3.00)
<i>Cdc25c</i>			(-2.67)	(-2.50)
<i>H2afx</i>			(-3.27)	(-2.79)
<i>McpH1</i>			(-3.23)	(-2.89)
<i>Nth1</i>			(-4.32)	(-3.10)
<i>Xrcc6</i>			(-2.11)	(-2.51)
<i>Abl1</i>			(-2.27)	(-2.09)
<i>Cdc25a</i>			(-2.60)	(-2.96)
<i>Fancg</i>			(-2.54)	(-3.01)
<i>Mlh3</i>			(-2.60)	(-2.61)
<i>Ogg1</i>			(-2.85)	(-2.35)
<i>Rad51b</i>			(-2.57)	(-2.43)
<i>Ung</i>			(-4.41)	(-2.84)
<i>Xrcc2</i>			(-3.58)	(-2.21)
<i>Atm</i>			(-2.15)	(-2.00)
<i>Cdkn1a</i>			(+2.73)	(+2.49)
<i>Fancc</i>			(-2.18)	(-2.27)
<i>Atr</i>	(-2.12)		(-2.38)	

Beim Vergleich der Genexpression der DNA-Schadensantwortgene in *GF11-KD*-Zellen im Verhältnis zu *GF11-36S*-Zellen, wurden deutlich mehr Abweichungen detektiert. Nahezu alle Gene zeigten eine geringere Expression in *GF11-KD*-Zellen im Vergleich mit *GF11-36S*-Zellen (Tab. 17). Es wurden 20 Gene gefunden, welche in mindestens

drei der vier getesteten Zelltypen eine Fold-change Expression von ≤ -2 in den *GFI1*-KD-Zellen gegenüber der *GFI1*-36S-Zellen hatten. Es gab einige Überschneidungen mit den Genen, welche bereits eine niedrigere Expression in *GFI1*-36N-Zellen hatten, z.B. *Ogg1*, *Rad51b*, *Apex1*, *Mgmt* und weitere Gene. *Mgmt* zeigte die niedrigste Fold-change Expression in *GFI1*-KD-Zellen und war, wie bereits bei den *GFI1*-36N-Zellen, in allen *GFI1*-KD-Zellen herunterreguliert (Tab. 17).

Tabelle 17: Liste der veränderten DNA-Schadensantwortgene in *GFI1*-KD-Zellen im Vergleich mit *GFI1*-36S-Zellen

Dargestellt sind die Gene, welche in mindestens drei *GFI1*-KD-Proben eine Fold-change Expression von ≤ -2 oder in einer Probe ≤ -2 und einer anderen $\leq -3,5$ gegenüber *GFI1*-36S-Proben hatten. Die Ergebnisse stammen vom RT² Profiler PCR Array „DNA Damage Signaling Pathway“. Es wurden folgende Zelltypen getestet: nicht bestrahlte und bestrahlte Thymozyten sowie nicht bestrahlte und bestrahlte leukämische (MLL-AF9) Knochenmarkzellen. Die Bestrahlung wurde mit 5 Gy eine Stunde vor Probenvorbereitung durchgeführt. Zur Normalisierung der Array-Ergebnisse wurden 5 Haushaltsgene (eng.: housekeeping genes) mitgetestet und zur Validierung der Ergebnisse wurden 5 Kontrollen (GDC, PPC & RTC) verwendet. Negative Werte: geringe Genexpression in *GFI1*-KD; pro Zelltyp: n=1

Genname	GFI1-KD vs. GFI1-36S			
	Thymozyten 0 Gy	Thymozyten 5 Gy	KM von leukämischen Mäusen 0 Gy	KM von leukämischen Mäusen 5 Gy
<i>Mgmt</i>	(-6,56)	(-6.15)	(-2.66)	(-2.95)
<i>Apex1</i>		(-2.77)	(-3.90)	(-5.09)
<i>Cdc25c</i>		(-3.43)	(-2.07)	(-2.14)
<i>H2afx</i>		(-2.24)	(-2.07)	(-2.21)
<i>Mcph1</i>		(-3.55)	(-2.49)	(-2.86)
<i>Nthl1</i>	(-2.23)	(-2.37)	(-4.84)	(-3.50)
<i>Xrcc6</i>		(-2.38)	(-2.22)	(-3.67)
<i>Rad1</i>		(-2.75)	(-2.17)	(-2.10)
<i>Rpa1</i>		(-2.25)	(-2.31)	(-2.72)
<i>Nbn</i>		(-2.95)	(-2.08)	(-2.08)
<i>Trp53bp1</i>	(-2.10)	(-2.26)	(-2.60)	
<i>Chek2</i>	(-2.69)			(-4.79)
<i>Cdc25a</i>		(-2.95)	(-2.50)	(-3.09)
<i>Mlh3</i>			(-4.84)	(-2.42)
<i>Ogg1</i>			(-3.26)	(-3.54)
<i>Rad51b</i>		(-3.40)	(-2.15)	(-2.68)
<i>Ung</i>			(-4.58)	(-4.16)
<i>Xrcc2</i>		(-2.15)	(-2.65)	(-2.29)
<i>Fanca</i>		(-3.68)	(-2.99)	(-3.00)
<i>Lig1</i>		(-2.59)	(-2.30)	(-3.00)
<i>Rad51</i>		(-3.40)	(-2.12)	(-2.15)
<i>Brca2</i>		(-2.41)	(-2.28)	(-2.13)
<i>Brip1</i>		(-2.84)	(-2.82)	(-2.66)
<i>Chek1</i>		(-2.16)		(-2.75)
<i>Mdc1</i>	(-2.07)	(-2.01)		(-2.11)
<i>Poli</i>		(-2.54)	(-2.31)	(-2.62)
<i>Rad52</i>		(-2.43)	(-2.01)	
<i>Atm</i>			(-2.97)	(-4.51)

In Abbildung 39 sind die Werte der *Fold-change* Expression von *Mgmt* in den unterschiedlichen Zellentypen noch einmal separat aufgezeigt. Die Ergebnisse der *GFI1-36N*- sowie der *GFI1-KD*-Proben wurden relativ zu der dazugehörigen *GFI1-36S*-Probe berechnet. Sowohl in den getesteten *GFI1-36N*-Zellen als auch in den Zellen mit niedrigem *GFI1*-Level, war *Mgmt* gegenüber den *GFI1-36S*-Zellen herunterreguliert (Abb. 39).

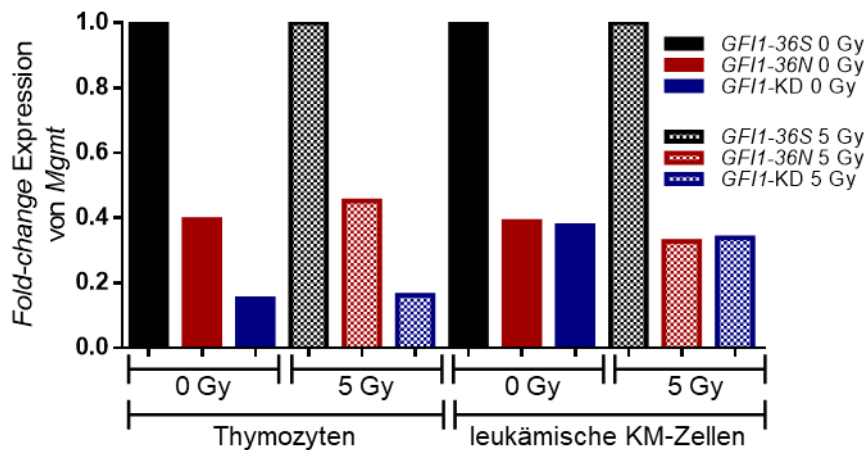


Abbildung 39: Geringere *Mgmt*-Expression in *GFI1-36N*- und *GFI1-KD*-Zellen gegenüber *GFI1-36S*-Zellen

Dargestellt sind die Ergebnisse der *Mgmt*-Expression aus Tabelle 16 und 17 des RT² Profiler PCR Arrays „DNA Damage Signaling Pathway“. Getestet wurden von dem *GFI1-36S*-, *GFI1-36N*- und *GFI1-KD*-Genotyp jeweils nicht bestrahlte (0 Gy) und bestrahlte (5 Gy) Thymozyten sowie leukämische (MLL-AF9) Knochenmarkzellen. Die Ergebnisse der *GFI1-36N*- sowie *GFI1-KD*-Proben wurden nach der Normalisierung zu den Haushaltsgenen (engl.: housekeeping genes) zu den jeweiligen dazugehörigen *GFI1-36S*-Zellen normalisiert. $n=1$

4.2.2 *GFI1-KD*- sowie *GFI1-36N*-leukämische Zellen haben niedrigere *Mgmt*-Level

Die Ergebnisse der RT²-Profiler PCR Arrays lieferten erste Hinweise, dass die *Mgmt*-Expression in *GFI1-36N*- und *GFI1-KD*-Zellen gegenüber *GFI1-36S*-Zellen herunterreguliert ist. Zur Überprüfung dieser Ergebnisse wurden zunächst RT-PCRs zur Untersuchung der *Mgmt*-Expression durchgeführt. Die Ergebnisse der *Mgmt*-Expression wurden mit Hilfe der *Hprt*-Expression normalisiert. Die normalisierten Werte der *GFI1-36N*- und *GFI1-KD*-Proben wurden dann relativ zu den normalisierten Werten der *GFI1-36S*-Proben kalkuliert und dargestellt. Als erstens wurde die *Mgmt*-Expression in nicht bestrahlten und bestrahlten (5 Gy) Thymozyten aus *GFI1-36S*-, *GFI1-36N*- sowie *GFI1-KD*-nicht leukämischen Mäusen überprüft. In *GFI1-36N*- ($0,62 \pm 0,16$) und *GFI1-KD*-Thymozyten ($0,50 \pm 0,18$) konnte bereits ohne vorherige

Bestrahlung eine niedrigere Expression von *Mgmt* detektiert werden als in *GF11-36S*-Thymozyten (Abb. 40 A). Mit zusätzlicher Bestrahlung von 5 Gy wurde die *Fold-change* Expression von *Mgmt* in *GF11-36N*-Thymozyten ($0,54 \pm 0,29$) im Vergleich mit *GF11-36S*-Thymozyten noch etwas geringer. Die *GF11-KD*-Thymozyten zeigten nach Bestrahlung eine signifikant geringere *Mgmt*-Expression ($0,32 \pm 0,15$; $p=0,044$) gegenüber den *GF11-36S*-Thymozyten (Abb. 40 B). Somit konnten die Ergebnisse der nicht bestrahlten und bestrahlten Thymozyten des RT²-Profilier PCR Arrays bestätigt werden. Die Genexpression von *Mgmt* in *GF11-36N*- und *GF11-KD*-Thymozyten war geringer als in den *GF11-36S*-Thymozyten (Abb. 40).

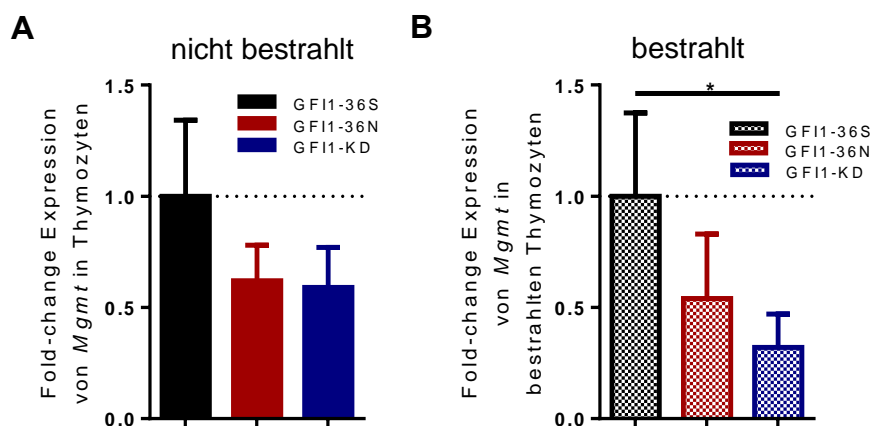


Abbildung 40: Geringere *Mgmt*-Expression in *GF11-36N*- und *GF11-KD*-Thymozyten gegenüber *GF11-36S*-Thymozyten

Hier dargestellt sind die RT-PCR-Ergebnisse, der Expression von *Mgmt* in *GF11-36S*-, *GF11-36N*- und *GF11-KD*-Thymozyten. Die *Mgmt*-Expression wurde relativ zur *Hprt*-Expression kalkuliert. Die normalisierte *Mgmt*-Expression der *GF11-36N*- und *GF11-KD*-Thymozyten wurde dann relativ zur *Mgmt*-Expression in *GF11-36S*-Thymozyten berechnet. **A)** *Mgmt*-Expressionslevel in nicht bestrahlten Thymozyten. $n=3$; Mittelwert \pm SEM. **B)** Thymozyten wurden mit 5 Gy bestrahlt und die *Mgmt*-Expression wurde 1 h nach Bestrahlung mittels RT-PCR überprüft. $n=3$; $*p=0,044$; Mittelwert \pm SEM

Zur Untersuchung, ob die geringere Genexpression von *Mgmt* auch einen Einfluss auf das Proteinlevel hat, wurden Western Blots zur Detektion von *Mgmt* durchgeführt. Dabei wurde ein Antikörper verwendet, welcher neben dem „normalen“, nicht ubiquitinierten *Mgmt* auch ubiquitiniertes *Mgmt* detektieren kann. *MGMT* wird ubiquitiniert sobald das Enzym eine O⁶-MeG-Läsion repariert hat und durch die Reparatur eine zusätzliche Alkylgruppe besitzt. Nach der Ubiquitinierung wird *MGMT* durch Proteasome abgebaut. Ubiquitiniertes *MGMT* ist somit inaktiv und steht der Zelle nicht mehr zur Reparatur zur Verfügung (Srivenugopal et al., 1996; Xu-Welliver and Pegg, 2002; Kaina et al., 2007). In Abbildung 41 sind die Western Blot-Ergebnisse der Analysen von *GF11-36S*-, *GF11-36N*- und *GF11-KD*-Thymozyten zu sehen. In

Abbildung 44 A und B wurden die Blots dargestellt in C und D wurden die Intensitäten der Mgmt-Banden relativ zu der dazugehörigen Lamin B1-Kontrollbande berechnet. Bei der Analyse des Mgmt-Levels in *GF11-36N*-Thymozyten konnte gezeigt werden, dass diese Zellen nahezu kein aktives Mgmt besitzen (Abb. 41 A). In nicht bestrahlten *GF11-36N*-Thymozyten lag sowohl das aktive, nicht ubiquitinierte als auch das ubiquitinierte Mgmt in deutlich niedrigeren Leveln vor als in den *GF11-36S*-Thymozyten. Das nicht ubiquitinierte, aktive Mgmt war ca. 8-fach und das ubiquitinierte und dadurch inaktive Mgmt war ca. 15-fach höher in den *GF11-36S*-Thymozyten gegenüber *GF11-36N*-Thymozyten. (Abb. 41 C). Das ubiquitinierte Mgmt hatte in den bestrahlten *GF11-36N*-Thymozyten eine relative Bandenintensität von 1,75 und war dadurch stärker als in nicht bestrahlten Thymozyten (0,13). Dennoch war die relative Intensität der ubiquitinierten Mgmt-Bande in bestrahlten homozygoten *GF11-36N*-Thymozyten geringer (1,75) als in bestrahlten *GF11-36S*-Thymozyten (2,27) (Abb. 41 A & D). Die Tendenz des Mgmt-Levels in nicht bestrahlten *GF11-KD*-Thymozyten gegenüber *GF11-36S*-Thymozyten war die gleiche wie beim Vergleich mit nicht bestrahlten *GF11-36N*-Thymozyten. Das Mgmt-Level war jedoch in *GF11-KD*-Thymozyten nicht so stark reduziert, vergleichend zu *GF11-36S*-Thymozyten. Die relative Bandenintensität des ubiquitinierten Mgmt war in *GF11-KD*-Thymozyten (1,59) nur minimal niedriger als das in *GF11-36S*-Thymozyten (1,85) (Abb. 41 B & C). Die Tendenz des Mgmt-Levels in nicht bestrahlten und bestrahlten Thymozyten von *GF11-36N*- und *GF11-KD*-Mäusen gegenüber *GF11-36S*-Mäusen, war ähnlich wie die der *Mgmt*-Genexpression.

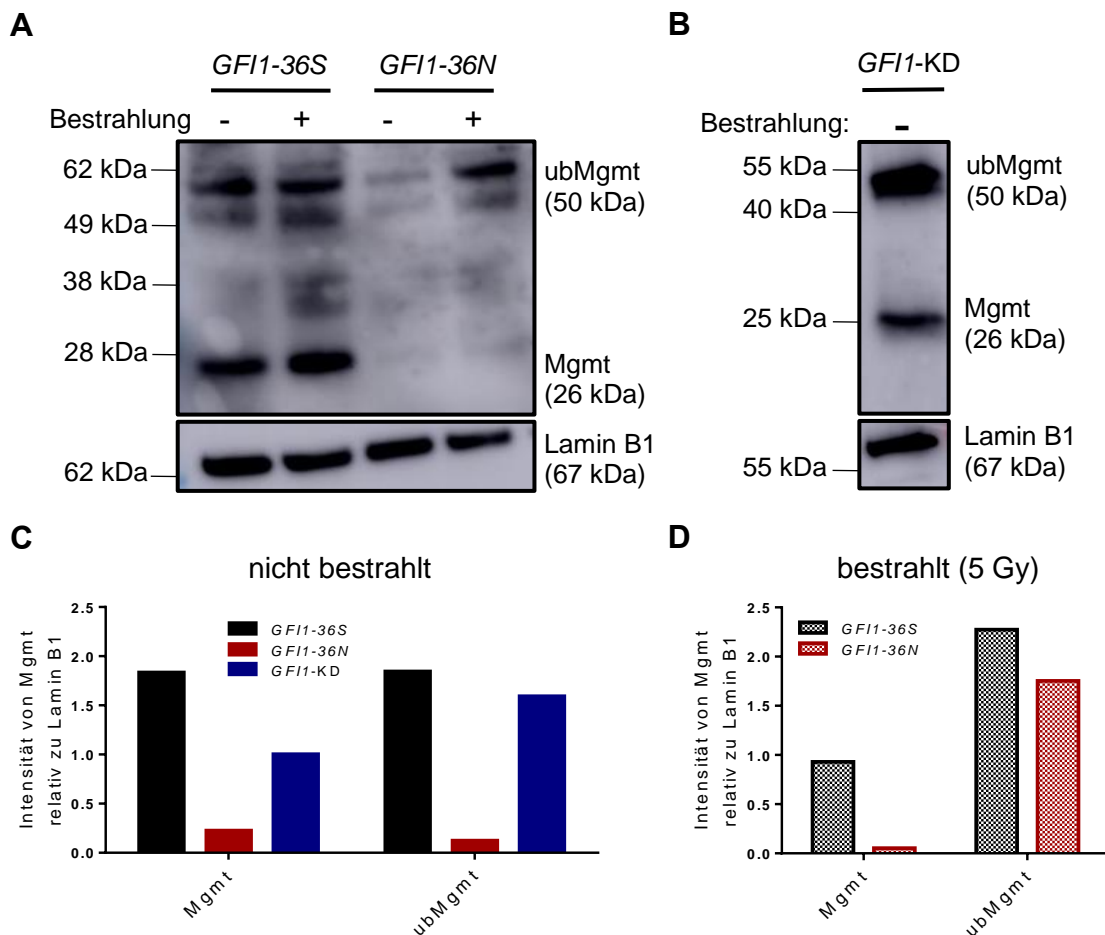


Abbildung 41: Geringeres Mgmt-Proteinlevel in GF11-36N- und GF11-KD-Thymozyten gegenüber GF11-36S-Thymozyten

In **A**) sind die Ergebnisse des Western Blots zur Detektion von Mgmt von bestrahlten (+, 5 Gy) und nicht bestrahlten (-) GF11-36S- und GF11-36N-Thymozyten dargestellt. Als Kontrolle wurde Lamin B1 verwendet. Die Proteinisolierung der bestrahlten Thymozyten fand 1 h nach der Bestrahlung statt. **B**) Dargestellt ist das Ergebnis der Western Blot-Untersuchung zur Detektion von Mgmt in GF11-KD-Thymozyten. In **C**) sind die Bandenintensitäten von Mgmt relativ zur Bandenintensität von Lamin B1 der nicht bestrahlten Proben aus A) und B) dargestellt. In **D**) sind die Bandenintensitäten von Mgmt relativ zur Bandenintensität von Lamin B1 der bestrahlten Proben aus A) dargestellt. Zur Bestimmung der Intensität der jeweiligen Bande wurde Fiji verwendet. Mgmt=nicht-ubiquitiniertes Mgmt; ubMgmt=ubiquitiniertes Mgmt

Um zu untersuchen, ob es einen Unterschied im Mgmt-Niveau zwischen nicht leukämischen und leukämischen Zellen gibt, wurden Lin⁻-Zellen aus nicht leukämischen Mäusen mit Knochenmarkzellen aus leukämischen-*MLL-AF9*- Mäusen der drei Genotypen verglichen. Zunächst wurde, wie schon bei den Thymozyten, RT-PCR-Analysen zur Detektion der *Mgmt*-Expression durchgeführt. In nicht leukämischen Zellen war die normalisierte Expression von *Mgmt* in GF11-36N- (0,73 ±0,28) und GF11-KD-Zellen (0,81 ±0,21) nur minimal niedriger als in GF11-36S-Lin⁻-Zellen (1,00 ±0,22) (Abb. 42 A). Der Unterschied der *Fold-change* Expression von *Mgmt* zwischen GF11-KD- (0,83 ±0,22) und GF11-36S-leukämischen Zellen (1,00 ±0,15) war nahezu der gleiche wie bei den nicht leukämischen Zellen. Dagegen

hatten *GFI1-36N*-leukämische Zellen eine signifikant geringere *Mgmt*-Expression gegenüber *GFI1-36S*-leukämischen Zellen ($0,52 \pm 0,17$ gegenüber $1,00 \pm 0,15$; $p=0,041$) (Abb. 42 B).

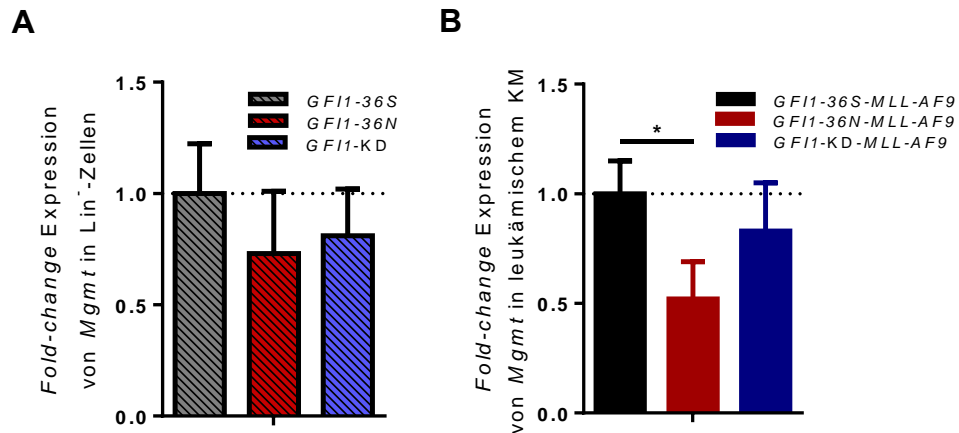


Abbildung 42: Geringere *Mgmt*-Expression in *GFI1-36N*-leukämischen Zellen gegenüber *GFI1-36S*-leukämischen Zellen

Hier dargestellt sind die RT-PCR-Ergebnisse, der *Mgmt*-Expression in murinen *GFI1-36S*-*GFI1-36N*- und *GFI1-KD*- **A**) nicht leukämischen Vorläuferzellen (*Lin*⁻-Zellen) ($n=4$) und **B**) leukämischen Zellen (*MLL-AF9*) ($n=3$). Die *Mgmt*-Expression wurde zu der *Hprt*-Expression normalisiert. Dargestellt sind die *Mgmt*-Expressionslevel von *GFI1-36N*- und *GFI1-KD*-Zellen relativ zur *Mgmt*-Expression in *GFI1-36S*-Zellen. * $p=0,041$; Mittelwert \pm SEM

Anschließend wurde das *Mgmt*-Proteinlevel mittels Western Blot gemessen. In den nicht leukämischen *Lin*⁻-Zellen gab es keine Unterschiede zwischen *GFI1-36S*- und *GFI1-36N*-Zellen. Bereits bei der Proteinfärbung auf dem Gel konnte gezeigt werden, dass es keine Abweichungen zwischen den *GFI1*-Genotypen gab. Außerdem wurde kein inaktiviertes bzw. ubiquitiniertes *Mgmt* detektiert (Abb. 43 A). Bei der Berechnung der Intensität der *Mgmt*-Bande zur Lamin B1-Bande wurde dieses Ergebnis bestätigt (Abb. 43 B).

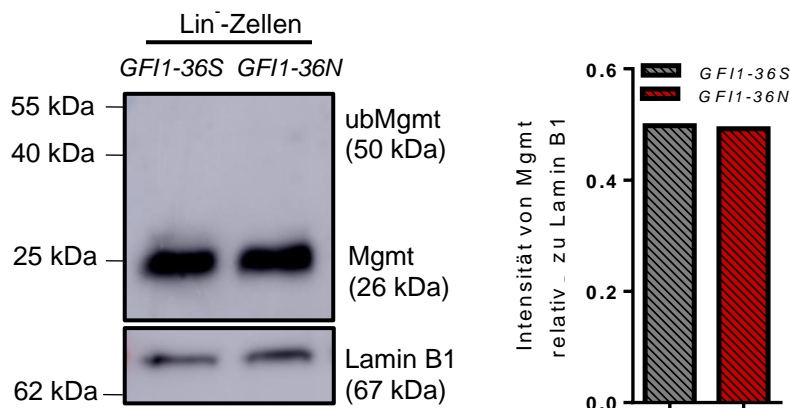


Abbildung 43: Kein Unterschied des *Mgmt*-Proteinlevel in *GFI1-36S*- und *GFI1-36N*-nicht leukämischen Zellen

Dargestellt sind die Western Blot-Ergebnisse zu Detektion von *Mgmt* in murinen *GFI1-36S*- und *GFI1-36N*-*Lin*⁻-Zellen (nicht leukämische Vorläuferzellen). Die Bandenintensitäten von *Mgmt* wurden relativ zur Bandenintensität von Lamin B1 kalkuliert. Zur Bestimmung der Intensität der jeweiligen Bande wurde Fiji verwendet.

In *GFI1-36N*-leukämischen Zellen war das aktive, nicht ubiquitinierte Mgmt-Proteinlevel, wie bereits die *Mgmt*-Genexpression, geringer im Vergleich mit *GFI1-36S*-leukämischen Zellen (*GFI1-36S*: 1,17; *GFI1-36N*: 0,89). Des Weiteren lag das ubiquitinierte Mgmt-Protein in *GFI1-36N*-leukämischen Zellen ca. 2,5-fach höher als in den *GFI1-36S*-Proben vor (Abb. 44 A & C). In *GFI1-KD*-leukämischen Zellen wurde nahezu kein aktives, nicht ubiquitiniertes Mgmt detektiert (Abb. 44 B & C). Dagegen lag das Level an inaktivem, ubiquitiniertem Mgmt in *GFI1-KD*-leukämischen Zellen fast um das 4-fache höher als in *GFI1-36S*-Zellen und war zudem höher als in *GFI1-36N*-leukämischen Zellen (Abb. 44 C).

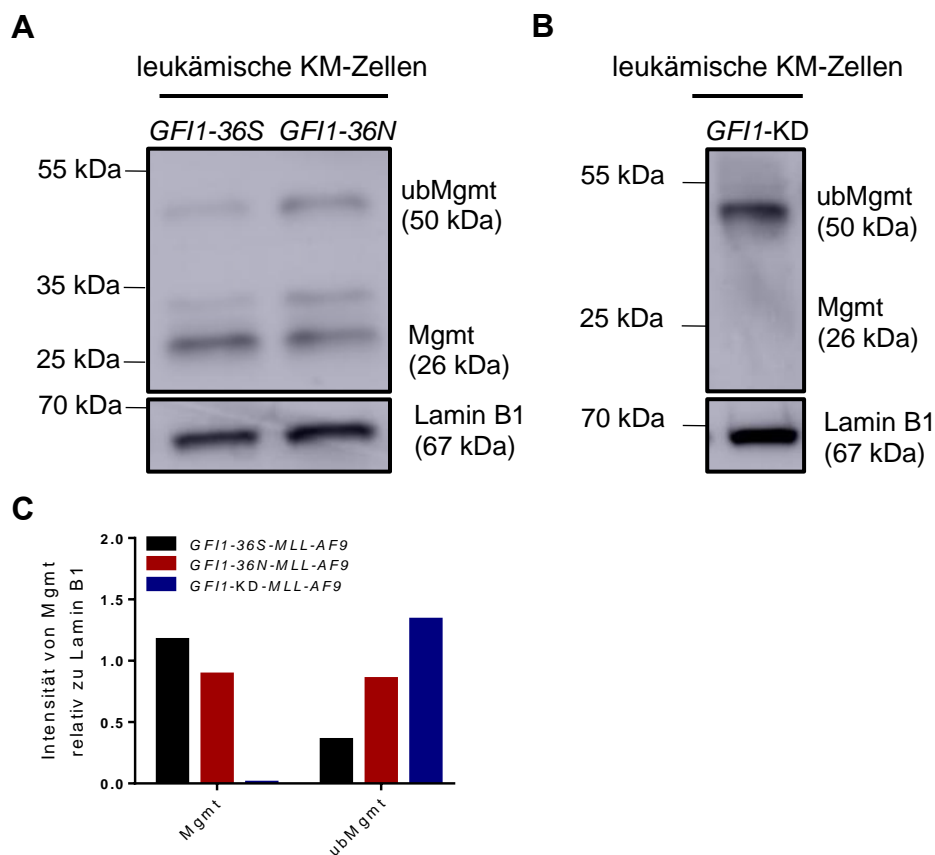


Abbildung 44: Höheres inaktives und geringeres aktives Mgmt-Proteinlevel in *GFI1-36N*- und *GFI1-KD*- im Vergleich zu *GFI1-36S*-leukämischen Knochenmarkzellen

In **A**) sind die Western Blot-Ergebnisse zur Bestimmung des Mgmt-Proteinlevels von murinen leukämischen *GFI1-36S*- und *GFI1-36N-MLL-AF9*-Knochenmarkzellen dargestellt. Als Kontrolle wurde Lamin B1 verwendet. **B**) Dargestellt ist das Ergebnis des Western Blots zur Bestimmung des Mgmt-Proteinlevels von leukämischen *GFI1-KD-MLL-AF9*-Knochenmarkzellen. In **C**) wurden die Bandenintensitäten von Mgmt relativ zur Bandenintensität von Lamin B1 kalkuliert. Zur Bestimmung der Intensität der jeweiligen Bande wurde Fiji verwendet. Mgmt=nicht-ubiquitiniertes Mgmt; ubMgmt=ubiquitiniertes Mgmt

Zur weiteren Detektion von möglichen Unterschieden zwischen *GFI1-36S*- und *GFI1-36N*-Zellen wurden Proteom-Analysen durchgeführt. Mit dieser Analyse kann genau und eindeutig nahezu das gesamte Proteom in Zellen untersucht werden (Mann, 2008; Aebersold and Mann, 2016). Durch diese Eigenschaft kann die Proteomik-Analyse auch Hinweise auf mögliche regulatorische Zusammenhänge liefern. Für die Proteomik-Analyse wurde das Proteom von *GFI1-36N*-leukämischen Knochenmarkzellen mit dem Proteom von *GFI1-36S*-leukämischen Knochenmarkzellen aus transplantierten *MLL-AF9*-Mäusen mittels Massenspektrometrie verglichen. Die Analyse wurde in Kooperation mit Herrn Dr. Ashok Kumar Jayavelu am Max-Planck-Institut für Biochemie in München durchgeführt. Bei der Proteom-Analyse konnte gezeigt werden, dass *Mgmt* in den *GFI1-36N*-leukämischen Zellen in geringerem Level vorlag als in den *GFI1-36S*-leukämischen Zellen (Abb. 45). Der $\log_2(\text{fold-change})$ von *Mgmt* lag bei -0,729 und der $-\log(\text{p-value})$ bei 4,105 (Abb. 45, gelber Punkt). Somit konnte die zuvor detektierte, geringere *Mgmt*-Genexpression (RT-PCR) und das geringere *Mgmt*-Proteinlevel (Western Blot) in den *GFI1-36N*-leukämischen Zellen bestätigt werden. Neben *Mgmt* war *N-Myc Downstream Regulated 1 (Ndr1)* ($\log_2(\text{fold-change}) = -0,553$; $-\log(\text{p-value}) = 3,374$) in *GFI1-36N*-leukämischen Zellen gegenüber *GFI1-36S*-Zellen signifikant (p - & q -Wert $\leq 0,05$) erniedrigt. Insgesamt wurden 643 Proteine gefunden, welche in *GFI1-36N*-leukämischen Zellen gegenüber *GFI1-36S*-Zellen signifikant (p - & q -Wert $\leq 0,05$) erniedrigt waren (Abb. 45 & 46). Darunter befanden sich neben *Mgmt* und *Ndr1* 10 weitere DNA-Reparaturproteine bzw. Proteine, welche bei der DNA-Schadensantwort eine Rolle spielen, wie z.B.: *Apex1* und *Pnkp* (Abb. 46). Etwas mehr Proteine (766) waren in *GFI1-36N*-leukämischen Zellen signifikant erhöht gegenüber den *GFI1-36S*-leukämischen Zellen (Abb. 45 & 46). Unter den 766 Proteinen waren u.a. 34 Proteine der DNA-Schadensantwort (Abb. 46). Darunter wiederum wurden *Cul4b*, *Dna2* sowie *Rad50* detektiert.

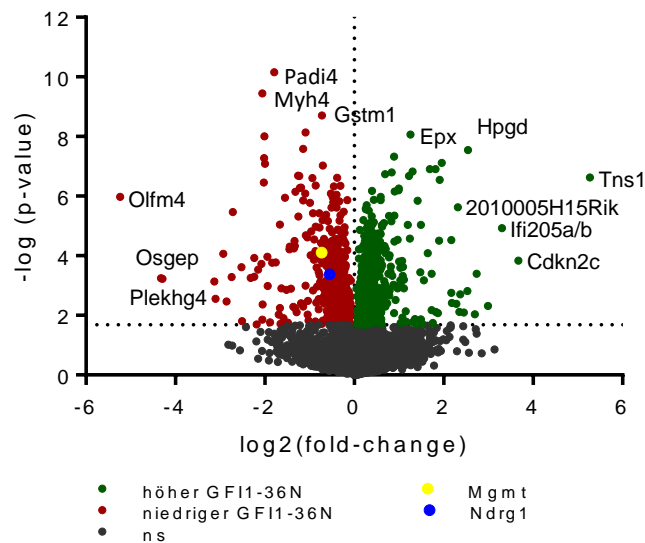


Abbildung 45: Veränderte Proteinlevel in GF11-36N-leukämischen Zellen gegenüber GF11-36S-leukämischen Zellen

Dargestellt ist der „Vulcano-Plot“ der Proteome-Analyse von murinen GF11-36N- im Vergleich mit murinen GF11-36S-MLL-AF9 leukämischen Knochenmarkzellen. Detektiert wurden insgesamt 6.818 Ereignisse. Darunter 1.409 signifikante Ereignisse mit einem p- und q-Wert von $\leq 0,05$. Rote Punkte: Proteinlevel niedriger in GF11-36N-leukämischen Zellen (643); grüne Punkte: Proteinlevel höher in GF11-36N-leukämischen Zellen (766); gelber Punkt: Mgmt; blauer Punkt: Ndr1; graue Punkte: nicht signifikant; n=4

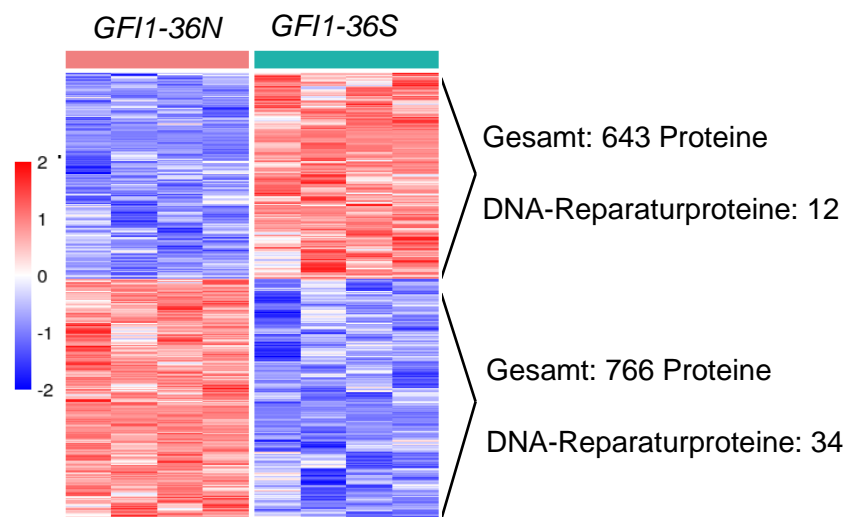


Abbildung 46: Heatmap der signifikant veränderten Proteine in GF11-36N- gegenüber GF11-36S-leukämischen Knochenmarkzellen

Dargestellt ist die Heatmap aller signifikant (p - und q -Wert von $\leq 0,05$) hoch- oder herunterregulierter Proteine in GF11-36N-leukämischen Zellen gegenüber GF11-36S-leukämischen Zellen aus transplantierten Mäusen. Die Ergebnisse stammen von der Proteom-Analyse (Abb. 45). n=4

Um zu überprüfen, ob die unterschiedliche Genexpression auch Auswirkungen auf das dazugehörige Proteinlevel hat wurden die Daten der DEGs (RNA-Sequenzierung) mit den Daten der Proteom-Analyse verglichen. In Abbildung 47 wurden die Ergebnisse des Vergleichs mithilfe eines UpSet-Plots dargestellt. Es wurden 59 Treffer gefunden, welche sowohl eine geringere Genexpression als auch ein geringeres Proteinlevel in *GFI1-36N*-leukämischen Zellen gegenüber den leukämischen Zellen mit *GFI1-36S*-Genotyp zeigten. Darunter befanden sich keine Gene bzw. Protein welche direkt oder indirekt bei der DNA-Reparatur involviert sind. Dagegen waren 53 Gene bzw. Protein höher exprimiert in *GFI1-36N*-leukämischen Zellen als in *GFI1-36S*-leukämischen Zellen (Abb. 47). Unter diesen 53 Treffern waren 4 Gene bzw. Proteine, welche eine Rolle bei der DNA-Reparatur spielen. Darunter befand sich *Ndrp1* sowie *Dna2*, *Gen1* und *Cul4b*.

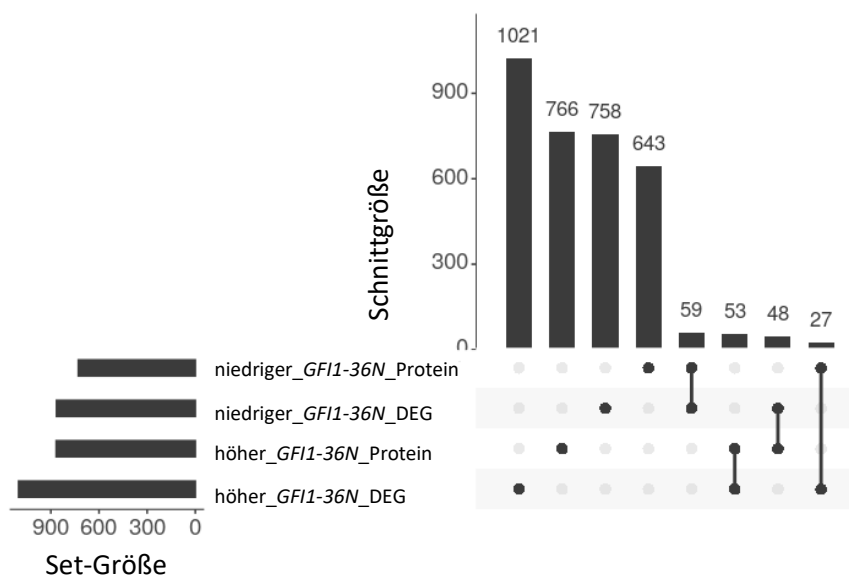


Abbildung 47: Vergleich zwischen differentiell exprimierten Genen und veränderten Proteinlevel

Dargestellt ist ein Upset-Plot zum Vergleich der DEG (RNA-Sequenzierung) und der Proteinlevel (Proteom-Analyse). Verglichen wurden die signifikanten DEG (q -Wert von $\leq 0,05$) zwischen murinen *GFI1-36N*- und *GFI1-36S*-MLL-AF9-Zellen mit den signifikant veränderten Proteinlevel (p - u. q -Wert von $\leq 0,05$) zwischen murinen *GFI1-36N*- und *GFI1-36S*-MLL-AF9-Zellen. Es wurde unterschieden zwischen Genen/Proteinen, welche erhöht oder erniedrigt waren in *GFI1-36N*- gegenüber *GFI1-36S*-leukämischen Zellen. DEG: $n=3$; Proteom: $n=4$

Mit den Überschneidungen der DEG und Proteinen wurden Netzwerkanalysen mithilfe des Cytoscape Plug-In ClueGO durchgeführt. Hierbei wurden die Kandidaten verwendet, welche: a) auf Genexpressions- und Proteinebene in den *GFI1-36N*-leukämischen Proben höher waren als in den *GFI1-36S*-leukämischen Proben (53 Kandidaten) sowie b) auf Genexpressions- und Proteinebene in den *GFI1-36N*-

leukämischen Proben niedriger waren als in den *GFI1-36S*-leukämischen Proben (59 Kandidaten). In Abbildung 48 ist das Ergebnis der Analyse der DEG und Proteine, welche in *GFI1-36N*-leukämischen Zellen gegenüber *GFI1-36S*-leukämischen Zellen verändert waren, dargestellt. Unter den signifikant veränderten Signalwegen befanden sich u.a. „DNA strand elongation“, „flap endonuclease activity“ und „DNA strand elongation involved in DNA replication“ (Abb. 48).

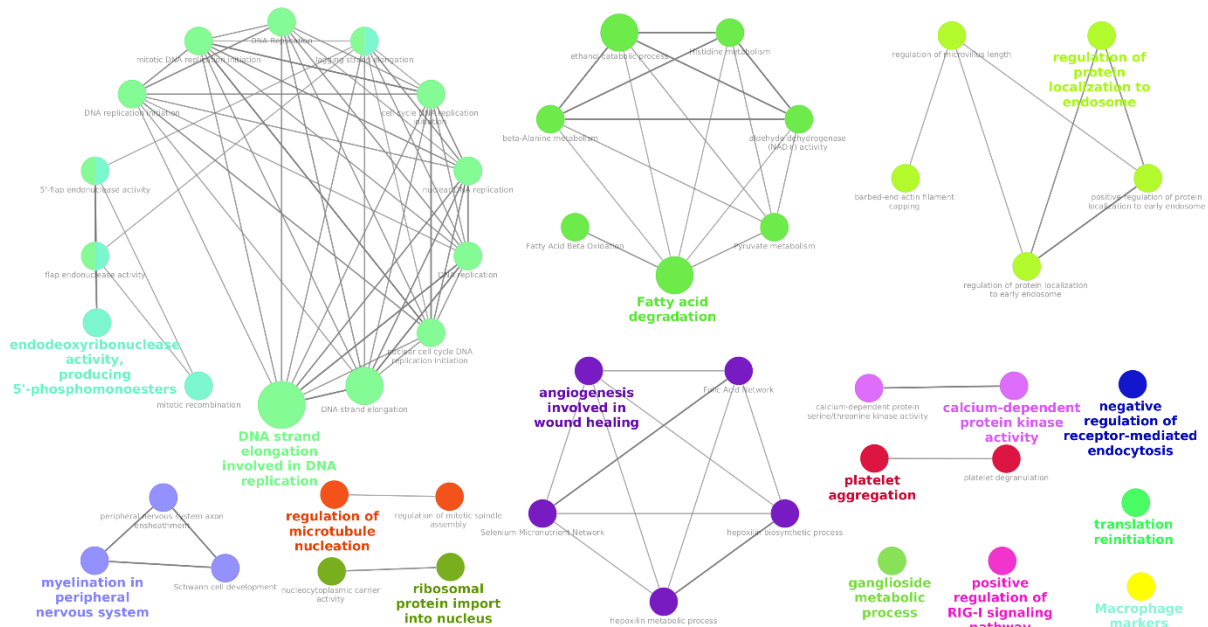


Abbildung 48: Netzwerkanalyse der signifikant veränderten „Signalwege“ in *GFI1-36N*- gegenüber *GFI1-36S*-leukämischen Zellen auf Genexpressions- und Proteinebene

Dargestellt ist das Ergebnis der Netzwerkanalyse der Überschneidungen der DEG- und der Proteom-Ergebnisse der murinen *GFI1-36N*- gegenüber *GFI1-36S*-leukämischen Knochenmarkszellen. Für die Analysen wurden die Kandidaten, welche sowohl auf Genexpressions- als auch Proteinebene in den *GFI1-36N*-leukämischen Proben signifikant höher bzw. niedriger waren, verwendet. Die Analysen wurden mit dem Plug-In ClueGO für Cytoscape durchgeführt.

Zusätzlich wurden die Daten der DEG und Proteom-Analysen mit verfügbaren Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)-Sequenzierungs-Datensätzen von Gfi1 aus CODEX (GSE31657 (Khandanpour et al., 2012), GSE69101 (Goode et al., 2016), GSE50806 (Spooner et al., 2013) und GSE42518 (Moignard et al., 2013)) verglichen. Dabei wurden drei Gene/Proteine gefunden, welche sowohl auf Genexpressions- als auch auf Proteinebene in *GFI1-36N-MLL-AF9*-Zellen gegenüber *GFI1-36S-MLL-AF9*-Zellen herunterreguliert waren und bei den ChIP-Sequenzierungs-Daten als mögliche Gfi1-Zielgene identifiziert werden konnten. Unter diesen drei Kandidaten war Ndrp1 (Abb. 49). Bei dem Datensatz GSE69101 war kein deutlicher Peak zu sehen und wurde deshalb nicht in Abb. 49 dargestellt. Auf der anderen Seite wurden 8 Gene/Protein gefunden, welche in *GFI1-36N-MLL-AF9*-Zellen gegenüber *GFI1-36S*-

MLL-AF9-Zellen hochreguliert waren und in min. zwei der verfügbaren Gfi1-ChIP-Sequenzierungs-Datensätze als potenzielles Gfi1-Target detektiert wurden. Unter diesen 8 Kandidaten befand sich z.B. Ppm1h.

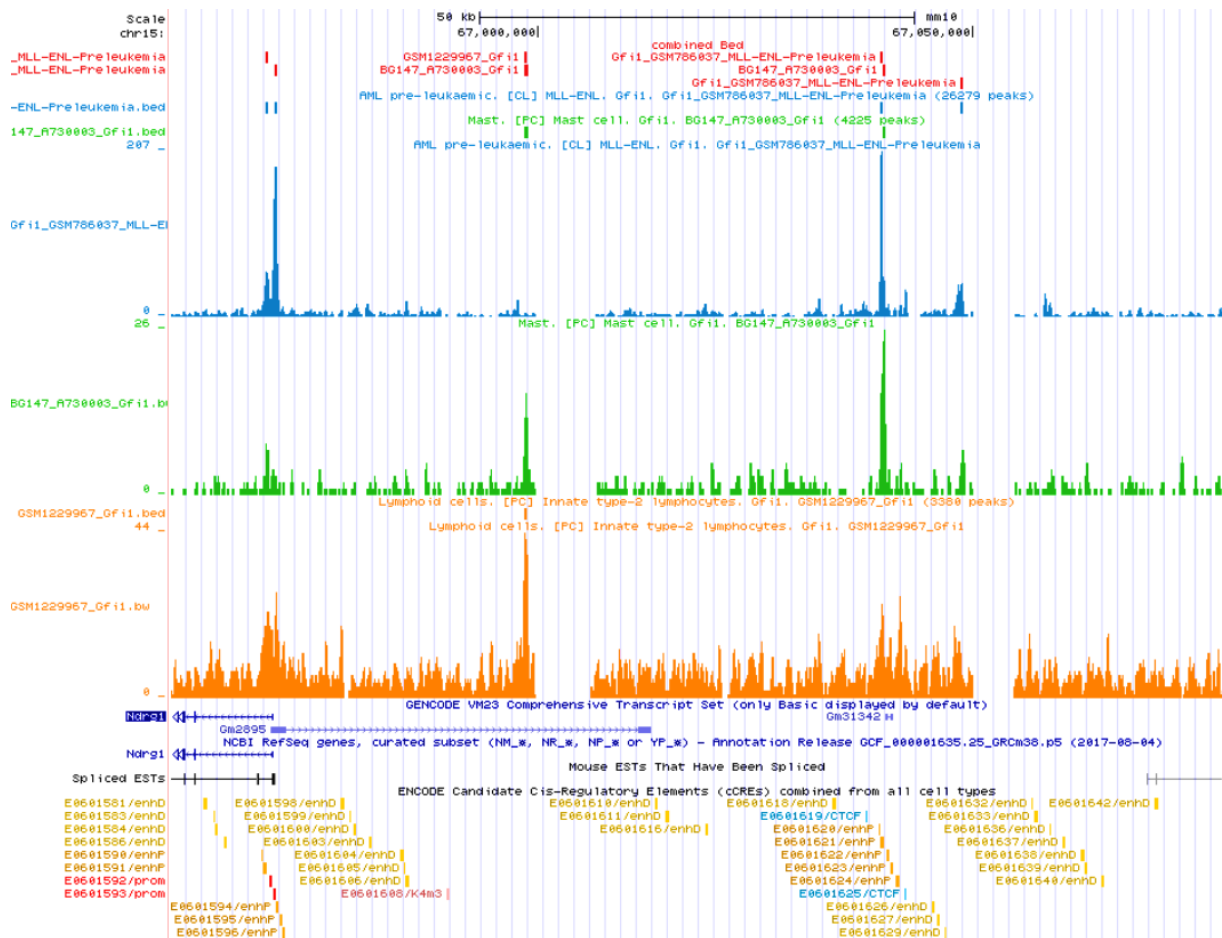


Abbildung 49: Auszug aus drei ChIP-Sequenzierungs-Analysen zu möglichen Gfi1-Bindestellen an regulatorischen Elementen des Ndrp1-Gens

Dargestellt sind die Ergebnisse von drei veröffentlichten Gfi1-ChIP-Sequenzierungsergebnissen (GSE31657 (Khandanpour et al., 2012), GSE50806 (Spooner et al., 2013), GSE42518 (Moignard et al., 2013)). Die Ergebnisse wurden von CODEX bezogen und mit dem UCSC Genome Browsers dargestellt.

Auf Grund der Unterschiede in der *Mgmt*-Expression sowie dem *Mgmt*-Proteinlevel, besonders zwischen den murinen *Gfi1-36N*-leukämischen Zellen und den *Gfi1-36S*-leukämischen Zellen, wurden die möglichen Ursachen und mögliche Ansätze diesen Unterschied therapeutisch auszunutzen näher, analysiert. Die *Mgmt*-Expression wird u.a. durch die Methylierung des *Mgmt*-Promotors reguliert. Die *Mgmt*-Promotor-Methylierung hat zur Folge, dass an diesen Stellen das Chromatin verdichtet wird (Heterochromatin) und dadurch kommt es zu einer verringerten *Mgmt*-Expression. Ist der Promotor dagegen nicht methyliert, korreliert dies mit einer hohen Expression und hohen *MGMT*-Leveln in den Zellen (Watts et al., 1997; Esteller et al., 1999; Hegi et al.,

2008). Deshalb wurde zur Analyse, warum das *Mgmt*-Niveau in *GF11-36N*-leukämischen Zellen im Vergleich zu nicht leukämischen und *GF11-36S*-leukämischen Zellen geringer war, zunächst ein Bisulfit-Assay durchgeführt. Mithilfe des Bisulfit-Assays kann der Promotor-Methylierungsstatus überprüft werden. Hierbei werden zunächst nur die nicht methylierten Cytosine in Uracil umgewandelt und anschließend können diese Veränderungen mit speziellen modifizierten Primern zum Beispiel per PCR detektiert werden (Clark et al., 1994; Yamada et al., 2001). Zur spezifischen Überprüfung des *Mgmt*-Promotors wurden dieselben Primer, wie 2001 von Yamada et al. gegen den nicht methylierten und methylierten *Mgmt*-Promotor, für die Bisulfit-PCR verwendet (Yamada et al., 2001). Anfänglich wurde die Spezifität der eingesetzten Primer kontrolliert. Hierfür wurde die unbehandelte DNA aus Thymozyten von *GF11-36S*-nicht leukämischen Mäusen isoliert und anschließend eine PCR mit den Primern, gegen die mit Bisulfit behandelte Promotorsequenz, durchgeführt. Die Primer für den methylierten und nicht methylierten *Mgmt*-Promotor banden nicht an die normale (nicht modifizierte) DNA und die Sequenz wurde nicht amplifiziert (Spalte 2 & 3 in Abb. 50). Außerdem band der Primer für die Amplifikation der nicht mit Bisulfit behandelten DNA nicht an den Promotor der mit Bisulfit-behandelten DNA (Spalte 4 in Abb. 50). Die Negativkontrollen waren somit negativ und die Primer spezifisch (Abb. 50). Bei der eigentlichen Untersuchung der Methylierung des *Mgmt*-Promotors in *GF11-36S*- im Vergleich mit *GF11-36N*-Thymozyten konnte gezeigt werden, dass die Thymozyten beider Genotypen einen nicht methylierten *Mgmt*-Promotor hatten (Abb. 50). Das deutet auf eine normale *Mgmt*-Expression hin.

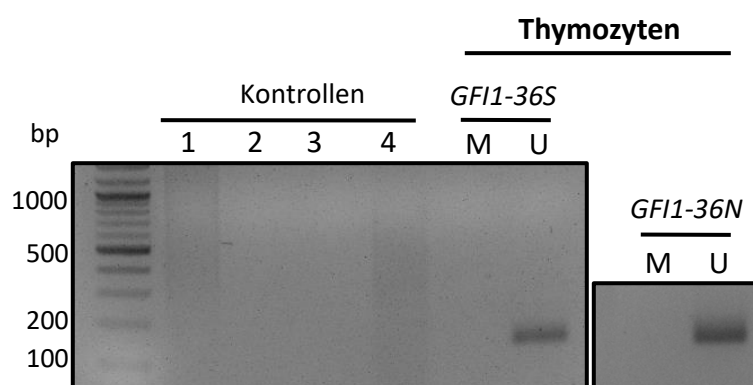


Abbildung 50: Kein Unterschied in der *Mgmt*-Promotor-Methylierung zwischen *GF11-36S*- und *GF11-36N*-Thymozyten

Dargestellt sind die Ergebnisse der Bisulfit-PCR in *GF11-36S*- und *GF11-36N*-Thymozyten. Zur Kontrolle, dass die Bisulfit-Konvertierung und die PCR funktioniert haben, wurden folgende Kontrollen durchgeführt: 1: nicht-modifizierter Primer mit normaler DNA; 2: Primer für methylierten Promotor mit normaler DNA; 3: Primer für nicht-methylierten Promotor mit normaler DNA; 4: nicht-modifizierter Primer mit modifizierter DNA. M: methyliert; U: nicht methyliert

Dagegen war sowohl in den *GFI1-36S*- als auch in den *GFI1-36N*-Lin⁻-Zellen aus nicht leukämischen Mäusen der *Mgmt*-Promotor methyliert. In den *GFI1-36S*-nicht leukämischen Zellen war die Bande, welche auf einen methylierten Promotor hindeutet, schwächer als in *GFI1-36N*-nicht leukämischen Zellen (Abb. 51 A). In den leukämischen *GFI1-36S*- und *GFI1-36N*-Zellen war der *Mgmt*-Promotor methyliert. Das deutet auf eine niedrigere *Mgmt*-Expression hin. Es war kein Unterschied bezüglich der *Mgmt*-Promotor-Methylierung in den leukämischen Proben der beiden *GFI1*-Genotypen zu sehen (Abb. 51 B).

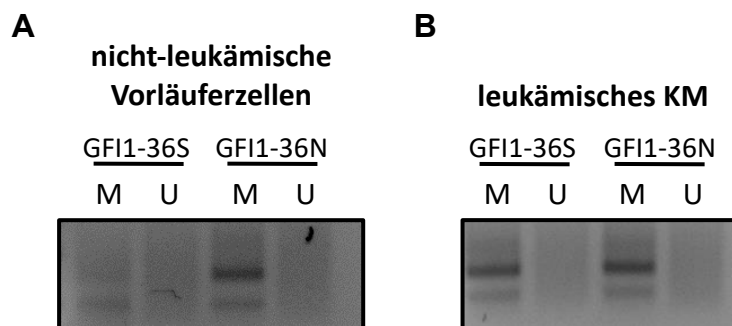


Abbildung 51: Kein Unterschied in der *Mgmt*-Promotor-Methylierung zwischen *GFI1-36S*- und *GFI1-36N*-nicht leukämischen sowie leukämischen Zellen

Dargestellt sind die Ergebnisse der Bisulfit-PCR von **A)** murinen *GFI1-36S*- und *GFI1-36N*-nicht-leukämischen Zellen (Lin⁻-Zellen) und **B)** *GFI1-36S*- und *GFI1-36N*-leukämischen Knochenmarkszellen aus mit *MLL-AF9* transplantierten Mäusen. M: methyliert; U: nicht methyliert

Alle drei getesteten Zelltypen zeigten fast keinen Unterschied in der Methylierung des *Mgmt*-Promotors zwischen dem *GFI1-36S*- und *GFI1-36N*-Genotyp. Es wurde lediglich ein Unterschied zwischen den Thymozyten (nicht methylierter Promotor) und Zellen aus dem Knochenmark (methylierter Promotor) gefunden.

Eine weitere Möglichkeit, warum das *Mgmt*-Level in den *GFI1-36N*-leukämischen Zellen geringer ist als in *GFI1-36S*-leukämischen Zellen, könnte eine direkte Protein-Protein-Bindung zwischen *MGMT* und *GFI1* sein. Zur Überprüfung der direkten Proteininteraktion wurden Co-Immunpräzipitationen (Co-IPs) gegen *MGMT* und *GFI1* durchgeführt. Hierfür wurden THP-1-Zellen verwendet. THP-1-Zellen wurden eingesetzt, da die *GFI1*-Expression in diesen Zellen vergleichsweise hoch ist und diese Zelllinie die *MLL-AF9*-Translokation besitzt (Odero et al., 2000; Hönes et al., 2017). Als Erstes wurde mithilfe eines Antikörpers *MGMT* und dessen Bindungspartner aus den Proteinproben präzipitiert. Als Kontrolle wurde ein Maus-Immunglobulin G (IgG) verwendet. Die Membran des darauffolgenden Western Blots wurde zunächst

mit einem GFI1-Antikörper behandelt, um zu sehen, ob GFI1 in der von MGMT gebundenen Fraktion vorliegt. Als Kontrolle wurden die Gesamtproteine der THP-1-Zellen direkt nach der Proteinisolierung (ohne vorherige Immunpräzipitation (IP) aufgetragen (Input). In der Input-Probe konnte die GFI1-Bande detektiert werden. Es wurde jedoch kein GFI1 in der von MGMT gebundenen Fraktion nachgewiesen (Abb. 52 A, oberer Blot). Anschließend wurde die Membran des Western Blots mit einem MGMT-Antikörper behandelt, um zu zeigen, dass die IP funktioniert hat. Die MGMT-Bande bei 26 kDa war deutlich zu sehen. Die andere Bande war die IgG-Bande des Antikörpers (Abb. 52 A, unterer Blot). Demnach hatte der Versuch funktioniert. Das gleiche Co-IP-Experiment wurde zusätzlich andersherum durchgeführt. Dabei wurden zunächst mittels IP GFI1 und alle an GFI1-gebundenen Proteine aus der Probe präzipitiert. Als Kontrolle diente das dazugehörige Ziegen-IgG. Beim darauffolgenden Western Blot wurde bei der Detektion von GFI1 zunächst gezeigt, dass die IP funktioniert hat. Die GFI1-Bande war deutlich in der IP-Fraktion zu sehen, nicht aber in der IgG-Kontrolle (Abb. 52 B, oberer Blot). Zur Überprüfung, ob MGMT in der von GFI1-gebundenen Fraktion zu finden ist, wurde der Blot mit einem MGMT-Antikörper behandelt. Es wurde lediglich die IgG-Bande, aber kein MGMT in der GFI1-IP-Fraktion detektiert (Abb. 52 B, unterer Blot).

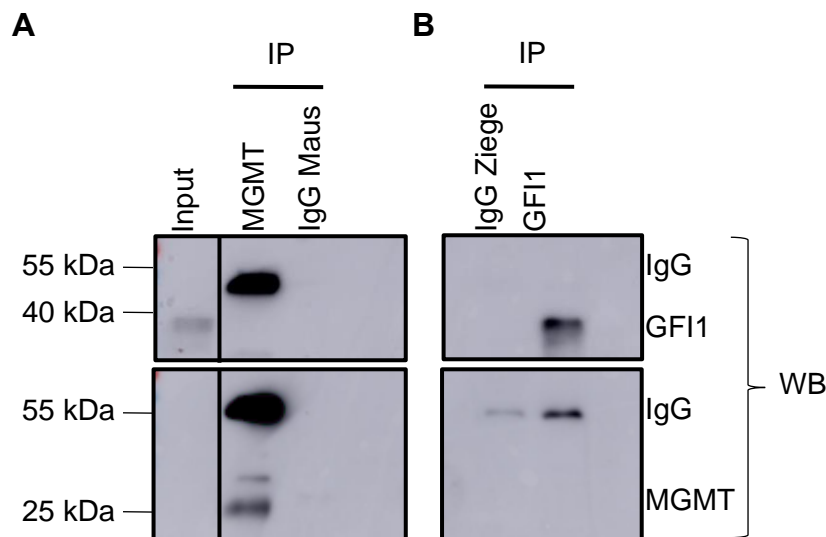


Abbildung 52: Keine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen GFI1 und MGMT mittels Co-IP detektierbar

Dargestellt sind die Ergebnisse der Co-IP von THP-1 Zellen. **A)** Die Immunpräzipitation wurde mit einem MGMT-Antikörper und als Kontrolle mit einem Maus-IgG durchgeführt. Im oberen Bild wurde der anschließende Western Blot (WB) mit einem GFI1-Antikörper gemacht und im unteren Bild mit einem MGMT-Antikörper. Als Input wurde das gesamte Proteinlysate aufgetragen. **B)** Die IP wurde mit einem GFI1-Antikörper und als Kontrolle mit einem Ziegen-IgG durchgeführt. Im oberen Bild wurde der anschließende Western Blot (WB) mit einem GFI1-Antikörper gemacht und im unteren Bild mit einem MGMT-Antikörper.

In einem weiteren Co-IP-Experiment mit MGMT wurde zusätzlich zur gebundenen Fraktion, die ungebundene Fraktion auf GF11 untersucht. Die ungebundene Fraktion enthält alle Protein, welche nicht an MGMT gebunden haben. In Abbildung 53 wurden die Ergebnisse dargestellt. Im rechten Bild wurde GF11 detektiert. In der Input-Probe (gesamtes Proteinlysate) wurde GF11 deutlich nachgewiesen. Dagegen konnte kein GF11 in der mit MGMT durchgeführten IP-Probe gefunden werden. In der ungebundenen Fraktion konnte, wie auch in der ungebundenen Fraktion der IgG-Kontrolle, eine schwache GF11-Bande detektiert werden. Im linken Bild wurde der Western Blot mit einem MGMT-Antikörper durchgeführt und MGMT konnte deutlich in der Probe der MGMT-IP detektiert werden. Somit war die Präzipitation von MGMT erfolgreich (Abb. 53). In beiden Co-IP-Versuchen wurde weder in der MGMT-gebundenen Fraktion GF11, noch in der GF11-gebundenen Fraktion MGMT detektiert. Demnach wurde mithilfe dieser Methode keine direkte Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen MGMT und GF11 festgestellt.

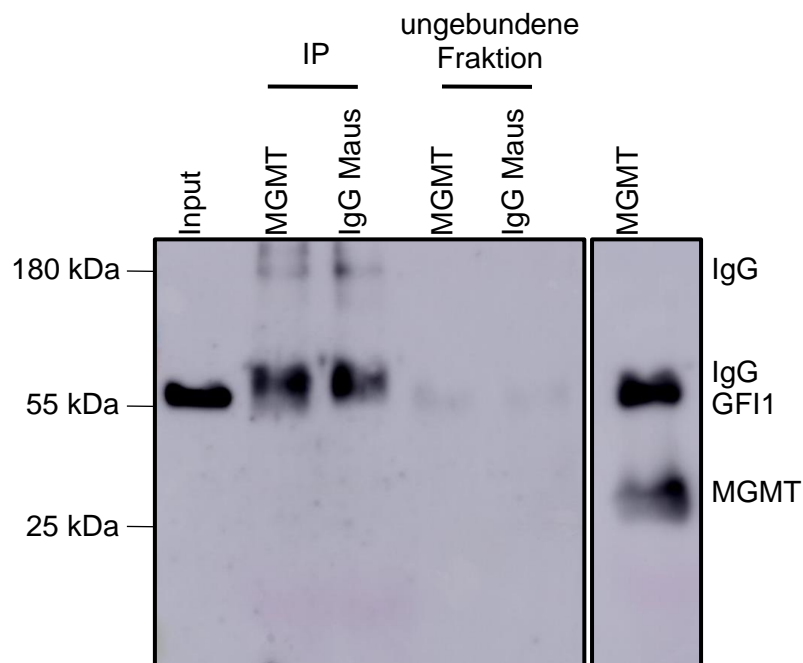


Abbildung 53: Keine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen MGMT und GF11 in humanen leukämischen Zellen mittels Co-IP detektierbar

Dargestellt sind die Ergebnisse einer Co-IP mit den Proteinen aus THP-1 Zellen, welche mittels eines MGMT-Antikörpers immunopräzipitiert wurden. Als Kontrolle wurde die IP mit einem Maus-IgG durchgeführt. Als Input wurde das gesamte Proteinlysate der THP-1 Zellen verwendet. Im linken Bild wurde der anschließende Western Blot mit einem GF11-Antikörper gemacht und im rechten Bild mit einem MGMT-Antikörper. Die ungebundene Fraktion wurde während der Co-IP gesammelt und enthält alle Proteine, welche nicht mit MGMT interagieren.

Zur Überprüfung, dass nicht nur die *Mgmt*-Expression bzw. das *Mgmt*-Level in den murinen *GFI1-36N*-leukämischen Zellen reduziert ist, sondern auch die *Mgmt*-vermittelte Reparatur in diesen Zellen vermindert war, wurde ein funktioneller MGMT-Assay mit dem Nachweis basierend auf Immunfluoreszenz durchgeführt. Dieser Assay wurde in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Jürgen Thomale am Universitätsklinikum Essen durchgeführt. Mithilfe dieses Assays wurde die Reparaturkinetik bzw. die Funktionalität von *Mgmt* in murinen *GFI1-36S*- und *GFI1-36N*-nicht leukämischen (Lin^- -Zellen) und leukämischen (*MLL-AF9*) Zellen überprüft. MGMT entfernt Methylgruppen an O6-Positionen von Guanin (Domoradzki et al., 1984; Kaina et al., 2007). Zur Überprüfung der Reparaturkinetik von *Mgmt* mussten somit zuerst einmal O6-MeG-Läsionen in den Zellen induziert werden. Hierzu wurde TMZ verwendet. TMZ ist eine alkylierende Substanz, welche die DNA u.a. an der O6-Position von Guanin methyliert (Tisdale, 1987; Denny et al., 1994; Kaina et al., 2007). Die Zellen wurden nach der Behandlung mit TMZ zu unterschiedlichen Zeitpunkten (5, 8, 20 und 24 h) mit einem Antikörper gegen O6-MeG mittels Immunfluoreszenz auf den verbleibenden Schaden in der DNA untersucht. Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, welche mit DMSO behandelt wurden, da TMZ in DMSO gelöst wurde. Die Kontrollproben wurden nach 5 h zusammen mit den behandelten Proben verarbeitet (Abb. 54).

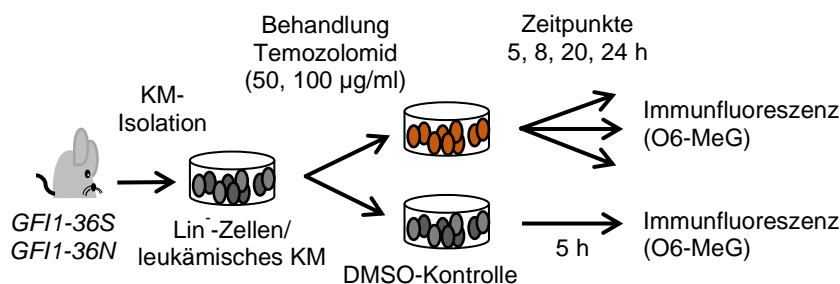


Abbildung 54: Schematischer Versuchsaufbau des funktionellen MGMT-Assays

Es wurden *GFI1-36S*- und *GFI1-36N*- Lin^- -nicht leukämische Zellen mit 100 $\mu\text{g/ml}$ TMZ behandelt und *GFI1-36S*- bzw. *GFI1-36N*-leukämische (*MLL-AF9*) Zellen mit 50 $\mu\text{g/ml}$ und 100 $\mu\text{g/ml}$ TMZ. Die Immunfluoreszenz wurde nach unterschiedlichen Zeitpunkten mit einem Antikörper zur Detektion von O6-MeG durchgeführt.

Der Schaden wurde in AFU (engl. arbitrary fluorescence units)-Werten angegeben. Zur Berechnung der AFU-Werte wurde die Intensität des O6-MeG (Schaden) relativ zur DAPI-Intensität (DNA-Gehalt) berechnet. Bei der Behandlung von *GFI1-36S*- und *GFI1-36N*- Lin^- -Zellen aus nicht leukämischen Mäusen mit 100 $\mu\text{g/ml}$ TMZ, wurde kein signifikanter Unterschied in der *Mgmt*-vermittelten Reparatur festgestellt (Abb. 55). Die DMSO-Kontrolle der *GFI1-36S*-Zellen hatte geringfügig mehr Schaden als die *GFI1*-

36N-Zellen. Dies erklärt die etwas höheren AFU-Werte in *GFI1-36S*-Zellen nach 20 und 24 h (Abb. 55 A). Nach Abzug der AFU-Werte der DMSO-Kontrollen von den mit TMZ-behandelten Proben, war der O6-MeG-Schaden in Zellen beider Genotypen 20 und 24 h nach der Behandlung nahezu der gleiche. Die nicht leukämischen Zellen beider Genotypen hatten nach 24 h nahezu keine O6-MeG-Läsionen mehr. Der Initialschaden 5 und 8 h nach TMZ-Behandlung war in den *GFI1-36N*-nicht leukämischen Zellen (5 h: $0,49 \pm 0,35$; 8 h: $0,71 \pm 0,50$) etwas höher als in *GFI1-36S*-nicht leukämischen Zellen (5 h: $0,34 \pm 0,24$; 8 h: $0,41 \pm 0,29$), wurde aber von den Zellen schnell repariert (Abb. 55 B).

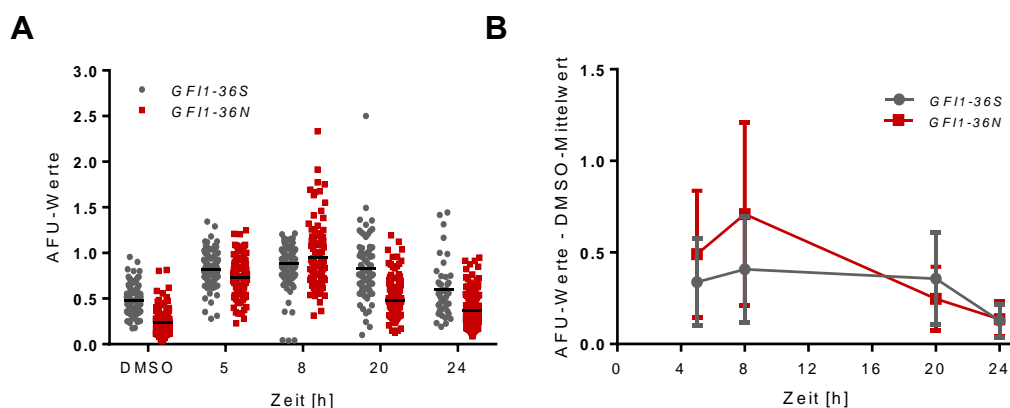


Abbildung 55: Kein Unterschied des O6-MeG-Schadens bzw. der Funktionalität von Mgmt in *GFI1-36N*- gegenüber *GFI1-36S*-nicht leukämischen Zellen

Nicht leukämische Vorläuferzellen aus dem Knochenmark (Lin-Zellen) von *GFI1-36S*- und *GFI1-36N*-Mäusen wurden *ex vivo* mit $100 \mu\text{g/ml}$ TMZ behandelt. Als Kontrolle wurde DMSO verwendet. Zur Auswertung wurde das Programm ACAS verwendet. Dargestellt sind die AFU-Werte (Cy3/DAPI). In **A** sind die gesamten Werte der einzelnen Proben dargestellt. Die schwarze Linie zeigt den Mittelwert an. Es wurden 45-206 Zellen analysiert. In **B** wurde der jeweilige DMSO-Mittelwert von den einzelnen Messwerten abgezogen. Mittelwert \pm SD

Bei der Behandlung von leukämischen Zellen mit TMZ hatten die *GFI1-36N-MLL-AF9*-Knochenmarkszellen aus transplantierten Mäusen mehr O6-MeG-Läsionen. Dies war sowohl an der Intensität der O6-MeG-Färbung (Cy3), als auch an den höheren AFU-Werten erkennbar (Abb. 56 & 57). Die Zelldichte auf den Objektträgern der *GFI1-36N*-Probe 24 h nach TMZ-Behandlung war deutlich geringer als die Zelldichte der *GFI1-36S*-Proben, sowie die der *GFI1-36N*-Probe 5 h nach Behandlung. Außerdem gab es auch Veränderungen in der Morphologie der *GFI1-36N*-leukämischen Zellen 24 h nach der TMZ-Behandlung (Abb. 56). Die DMSO-Kontrollen der *GFI1-36S*- und *GFI1-36N*-leukämischen Zellen hatten den gleichen Schaden. Deshalb wurden die DMSO-Kontrollen nicht von den mit TMZ-behandelten-Proben abgezogen. Die leukämischen Zellen wurden mit 50 und $100 \mu\text{g/ml}$ TMZ behandelt (Abb. 57). In den mit $50 \mu\text{g/ml}$

TMZ behandelten Proben hatten die *GFI1-36N*-leukämischen Zellen nach 20 h einen fast 5-fach höheren AFU-Mittelwert als die *GFI1-36S*-leukämischen Zellen. Der Unterschied zwischen den Mittelwerten der *GFI1-36N*- und *GFI1-36S*-Proben stieg 24 h nach der Behandlung auf fast das 10-fache an (*GFI1-36S*: $0,028 \pm 0,033$; *GFI1-36N*: $0,270 \pm 0,212$) (Abb. 57 A). Die AFU-Werte und somit der O6-MeG-Schaden nahm in den mit 100 $\mu\text{g/ml}$ behandelten Zellen im Vergleich zur Behandlung mit 50 $\mu\text{g/ml}$ zu. Die *GFI1-36N*-leukämischen Zellen hatten nach der Behandlung mit 100 $\mu\text{g/ml}$ signifikant mehr O6-MeG-Läsionen als die *GFI1-36S*-leukämischen Zellen ($p=0,0322$). Wie bereits in den mit 50 $\mu\text{g/ml}$ behandelten Zellen war der Unterschied zwischen *GFI1-36N*- und *GFI1-36S*-leukämischen Zellen nach 24 h am größten (*GFI1-36S*: $0,372 \pm 0,302$; *GFI1-36N*: $2,055 \pm 0,749$). Bei der Behandlung mit 100 $\mu\text{g/ml}$ TMZ ist beim 5 h Zeitpunkt ein technischer Fehler aufgetreten, weswegen dieser nicht in die Auswertung mit eingeflossen ist (Abb. 57 B).

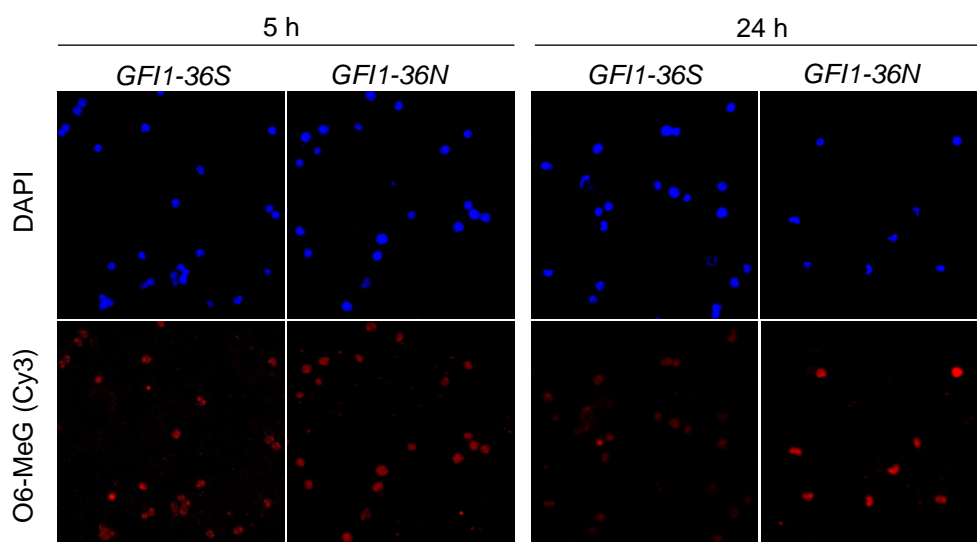


Abbildung 56: Repräsentative Bilder des funktionellen Mgmt-Assays mit murinen leukämischen Zellen

Dargestellt sind repräsentative Bilder der Messung des O6-MeG-Levels in murinen *GFI1-36S*- und *GFI1-36N*-leukämischen Knochenmarkszellen. Die Zellen wurden mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Temozolomid behandelt. Hier gezeigt sind Bilder der Zellen 5 h und 24 h nach Start der TMZ-Behandlung. Die Bilder gehören zu dem Versuch aus Abbildung 57. Blau=DAPI; rot (Cy3)=O6-MeG.

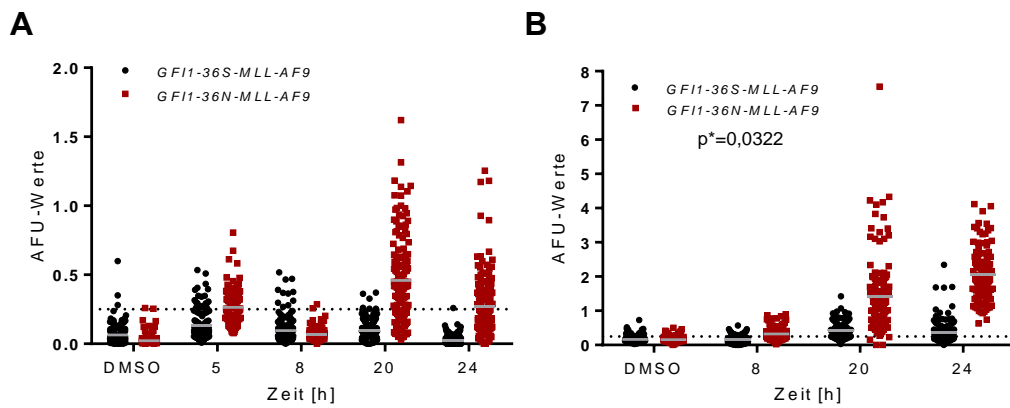


Abbildung 57: Mehr O6-MeG-Schäden nach Behandlung mit TMZ in GFI1-36N-leukämischen Zellen gegenüber GFI1-36S-leukämischen Zellen

GFI1-36S- und GFI1-36N-MLL-AF9-leukämische Knochenmarkszellen wurden *ex vivo* mit TMZ für 5, 8, 20 und 24 h behandelt. Die Zellen wurden mit DAPI und einem Antikörper zur Detektion von O6-MeG (Cy3) gefärbt. Zur Auswertung wurde das Programm ACAS verwendet. Hier gezeigt sind die AFU-Werte (Cy3/DAPI). In **A**) wurden die leukämischen Zellen mit 50 µg/ml TMZ behandelt. Dargestellt sind die gesamten AFU-Werte der Färbung. Es wurden 146-236 Zellen ausgewertet. Graue Querbalken: Mittelwert; gestrichelte Linie: AFU-Wert= 0,25. In **B**) wurden die leukämischen Zellen mit 100 µg/ml TMZ behandelt. Dargestellt sind die gesamten AFU-Werte der Färbung. Es wurden 115-223 Zellen ausgewertet. Graue Querbalken: Mittelwert; gestrichelte Linie: AFU-Wert= 0,25; $p^*=0,0322$

Mithilfe der funktionellen MGMT-Assays bzw. der Analysen des O6-MeG-Schadens konnte gezeigt werden, dass die GFI1-36N-leukämischen Zellen mehr O6-MeG-Läsionen nach TMZ-Behandlung hatten als die GFI1-36S-leukämischen Zellen. Bei den nicht leukämischen Zellen gab es dagegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen der RT-PCR Untersuchung hinsichtlich der *Mgmt*-Genexpression sowie den Western Blot- und Proteomik-Untersuchungen zur Analyse des Mgmt-Proteinlevels überein. In allen drei Untersuchungen wurde gezeigt, dass Mgmt in GFI1-36N-leukämischen Zellen im Gegensatz zu GFI1-36N-nicht leukämischen und GFI1-36S-Zellen (nicht leukämisch und leukämisch) vermindert ist.

Zur genaueren Untersuchung welche Mechanismen bzw. Genexpressionen durch die TMZ-Behandlung in GFI1-36N-leukämischen Zellen im Vergleich zu GFI1-36S-leukämischen Zellen verändert werden, wurden die Zellen mittels RNA-Sequenzierung untersucht. Die leukämischen MLL-AF9-Zellen wurden mittels retroviraler Transduktion von Lin⁻-Zellen *in vitro* generiert. Anschließend wurden die Zellen für 20 h mit 50 µg/ml TMZ behandelt, RNA isoliert und RNA-Sequenzierung durchgeführt. Nach der RNA-Sequenzierung wurden die Unterschiede in der Genexpression zwischen den beiden Genotypen mittels GSEA analysiert. In Abbildung 58 sind die signifikant

veränderten Gen-Sets der „Hallmark gene sets“ dargestellt. Lediglich zwei Gen-Sets waren in den *GFI1-36S*-leukämischen Zellen nach der Behandlung mit TMZ signifikant angereichert („Hallmark_Kras_Signaling_DN“ & „Hallmark_Myc-Targets_V2“). Dagegen waren 16 Gen-Sets in den behandelten *GFI1-36N*-leukämischen Zellen signifikant angereichert (Abb. 58). Darunter befanden sich die Gen-Sets „Hallmark_P53_Pathway“, „Hallmark_UV-Response_Dn“ und „Hallmark_Apoptosis“. Diese Gen-Sets beinhalten Gene, welche in p53-Signalwegen eine Rolle spielen, Gene, welche bei der Vermittlung der Apoptose beteiligt sind sowie Gene, die nach UV-Bestrahlung herunterreguliert werden (Abb. 58 & 59).

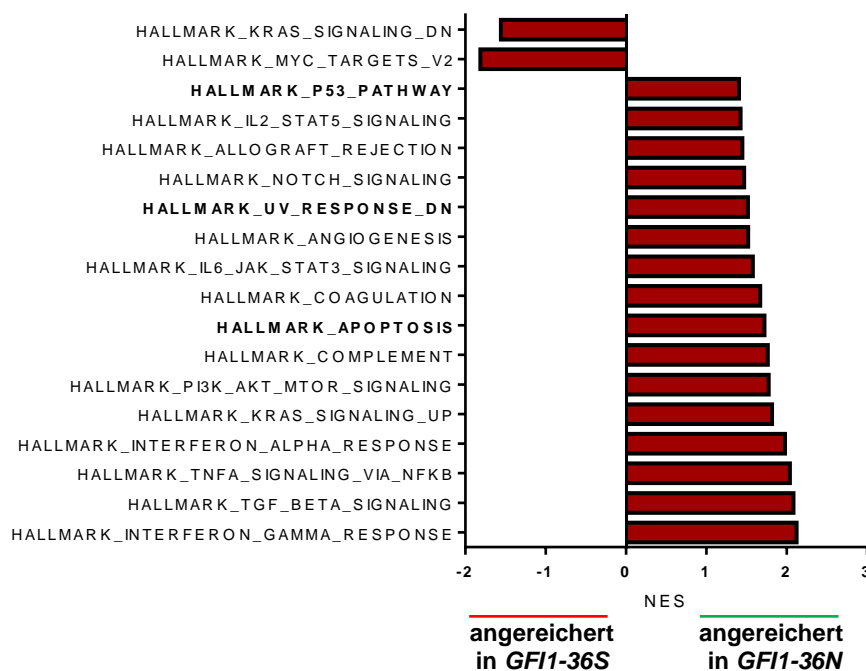


Abbildung 58: Veränderte Gen-Sets in leukämischen *GFI1-36N*-Zellen im Vergleich zu leukämischen *GFI1-36S*-Zellen nach Behandlung mit TMZ

Dargestellt sind die NES-Werte der „Hallmark gene sets“ von *GFI1-36N*- im Vergleich zu *GFI1-36S*-leukämischen Zellen (in vitro transduziert mit MLL-AF9-Plasmid) nach 20 h Behandlung mit 50 µg/ml TMZ. Die Analyse wurde mit GSEA 7.1 durchgeführt. NES: normalized enrichment score; FDR q-Wert ≤ 0,05; n=3; *GFI1-36S*-Gruppe: 2x *GFI1-36S* (+/ki) und 1x *GFI1-36S* (ki/ki); *GFI1-36N*-Gruppe: 2x *GFI1-36N* (ki/ki) und 1x *GFI1-36N* (+/ki)

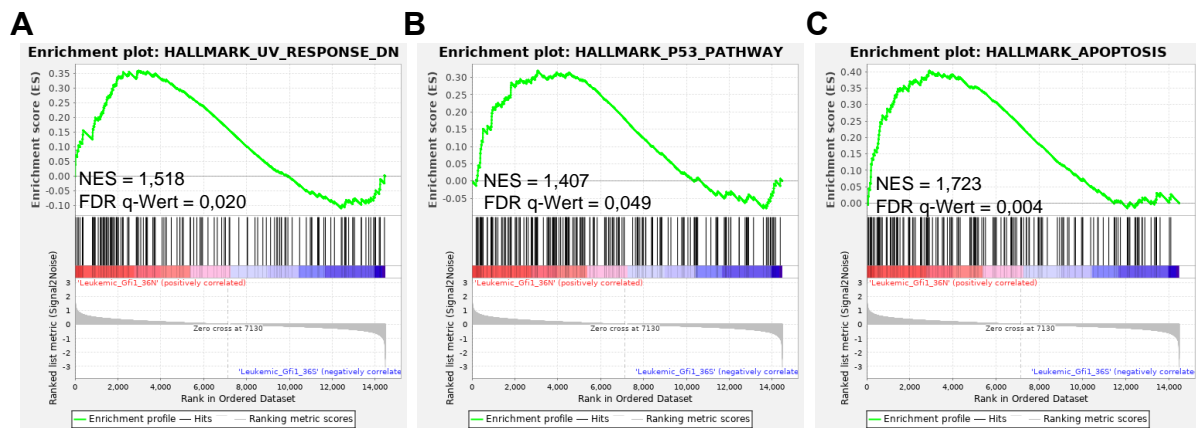


Abbildung 59: Enrichment Plots ausgewählter, angereicherter Gen-Sets in GF11-36N-leukämischen Zellen gegenüber GF11-36S-leukämischen Zellen nach Behandlung mit TMZ

Dargestellt sind die „Enrichment Plots“ der Gen-Sets, der **A)** Gene herunterreguliert infolge von UV-Bestrahlung, **B)** Gene involviert in P53-Signalwegen und **C)** Gene, deren Produkte bei der Vermittlung der Apoptose durch die Aktivierung von Caspasen beteiligt sind. Die Ergebnisse sind eine detaillierte Darstellung ausgewählter Gen-Sets, der GSEA der RNA-Sequenzierung von GF11-36S- bzw. GF11-36N-leukämischen Zellen (in vitro transduziert mit MLL-AF9-Plasmid) nach TMZ-Behandlung. Die Analyse wurde mit GSEA 7.1 durchgeführt. NES=normalized enrichment score, FDR=False discovery rate; rot=GF11-36N, blau=GF11-36S; n=3

4.3 GF11-36N-leukämische Zellen sind empfindlicher gegenüber DNA-Reparatur Medikamenten

Bei der Durchführung des funktionellen MGMT-Assays konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit TMZ in den murinen GF11-36N-leukämischen Zellen ein höherer O6-MeG-Schaden induziert wurde als in GF11-36S-leukämischen Zellen. In Lin-Zellen aus nicht leukämischen Mäusen gab es dagegen keinen Unterschied zwischen den beiden Genotypen. Des Weiteren war u.a. das Gen-Set, welches Gene, die bei der Vermittlung der Apoptose eine Rolle spielen, beinhaltet, in GF11-36N-leukämischen Zellen nach der Behandlung mit TMZ angereichert. Diese Ergebnisse lieferten erste Hinweise darauf, dass TMZ eine selektive Wirkung auf GF11-36N-Zellen hat und dies nur auf die leukämischen Zellen und nicht auf nicht maligne Zellen. Solche Eigenschaften spielen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von personalisierten Therapieansätzen. Das Alkylierungsagent TMZ induziert, wie beschrieben, O6-MeG-Läsionen. Diese werden spezifisch von MGMT repariert (Tisdale, 1987; Denny et al., 1994; Kaina et al., 2007). TMZ wird bereits in der Klinik u.a. bei der Behandlung von Glioblastomen eingesetzt (Stupp et al., 2005; Zhang et al., 2010). Es wurde gezeigt, dass die Wirkung der TMZ-Behandlung vom MGMT-Level abhängig ist. Krebszellen mit hohem MGMT-Level sind resistenter gegenüber

der TMZ-Behandlung. Dagegen reagieren Zellen mit niedrigem MGMT-Level sensitiver auf TMZ (Tisdale, 1987; Liu and Gerson, 2006; Zhang et al., 2010; Zhang et al., 2012). Auf Grund all dieser Hinweise und Eigenschaften von TMZ wurde der Effekt der Substanz auf die unterschiedlichen *GF11*-Genotypen in leukämischen und nicht leukämischen Zellen im Weiteren näher untersucht.

4.3.1 Murine *GF11-36N*-leukämische Zellen reagieren sensitiver auf die Behandlung mit Temozolomid und in Kombination mit Olaparib

Zunächst wurde überprüft, welche TMZ-Konzentrationen zur Behandlung von leukämischen Zellen am besten sind. Dazu wurden *GF11-36S*- und *GF11-36N*-leukämische Zellen mit sieben unterschiedlichen TMZ-Konzentrationen (5, 10, 25, 50, 100, 200 und 400 µg/ml) behandelt. Als Kontrolle wurden die Zellen mit DMSO behandelt. Nach 48 und 72 h wurden dann MTT-Assays sowie Apoptose-Assays durchgeführt. Der MTT-Assay gibt Aufschluss über die Zytotoxizität der Behandlung bzw. die Zellviabilität, indem die metabolische Aktivität der Zellen mittels Formazan-Absorption gemessen wird. Je höher die Absorption desto höher ist die metabolische Aktivität der Zellen, da Formazan bei der Umwandlung von MTT durch metabolisch aktive Zellen entsteht (Mosmann, 1983; Riss et al., 2004). Nach Abzug des Hintergrundsignals wurde die Zellviabilität der mit TMZ behandelten Proben zu den DMSO-Kontrollen (100%) normalisiert (Abb. 60). Die Ergebnisse nach 48 h zeigten bereits deutlich, dass die *GF11-36N-MLL-AF9*-Zellen sensitiver auf die Behandlung mit TMZ reagierten. Bereits bei einer TMZ-Konzentration von 10 µg/ml ($\log(\text{TMZ}): 1,0$) war ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Genotypen sichtbar. Dagegen hat TMZ erst ab einer Konzentration von 100 µg/ml ($\log(\text{TMZ}): 2,0$) einen Effekt auf *GF11-36S*-leukämische Zellen. Der Unterschied der beiden Genotypen konnte auch anhand der IC_{50} -Werte (mittlere inhibitorische Konzentration) deutlich gemacht werden. Die *GF11-36S*-leukämischen Zellen hatten nach 48 h einen IC_{50} -Wert von 287,2 µg/ml ($\pm 1,21$ µg/ml). Dagegen lag der IC_{50} -Wert in den leukämischen *GF11-36N-MLL-AF9*-Zellen bei 38,01 µg/ml ($\pm 1,10$ µg/ml) und somit deutlich niedriger als in den *GF11-36S*-Zellen. Nach der Behandlung mit 400 µg/ml TMZ ($\log(\text{TMZ}): 2,602$) betrug die Zellviabilität bereits nach 48 h in beiden Genotypen nahezu 0%. Nach 72 h stieg der Effekt von TMZ sowohl bei den *GF11-36S*- als auch bei den *GF11-36N*-leukämischen Zellen gegenüber 48 h deutlich an. Die *GF11-36S*-leukämischen Zellen besaßen nach 72 h bei den drei geringsten TMZ-Konzentrationen nahezu dieselbe Zellviabilität wie die *GF11-36N*-Zellen nach 48 h Behandlung. Dennoch waren die *GF11-36N*-

leukämischen Zellen auch nach 72 h deutlich sensibler gegenüber der Behandlung mit TMZ. Der IC_{50} -Wert war bei den *GF11-36S*-leukämischen Zellen weiterhin deutlich höher (IC_{50} : 81,19 $\mu\text{g/ml}$ \pm 1,21 $\mu\text{g/ml}$) als bei den *GF11-36N*-leukämischen Zellen (IC_{50} : 13,52 $\mu\text{g/ml}$ \pm 1,20 $\mu\text{g/ml}$). Wie bereits nach 48 h war nach der Behandlung mit 400 $\mu\text{g/ml}$ TMZ die Zellviabilität in beiden Genotypen nahezu 0% und demnach zu hoch für eine spezifische Behandlung von *GF11-36N*-leukämischen Zellen (Abb. 60). Bei den MTT-Assay-Ergebnissen war demnach deutlich zu sehen, dass die *GF11-36N*-Knochenmarkszellen aus leukämischen Mäusen sensibler auf Temozolomid reagierten.

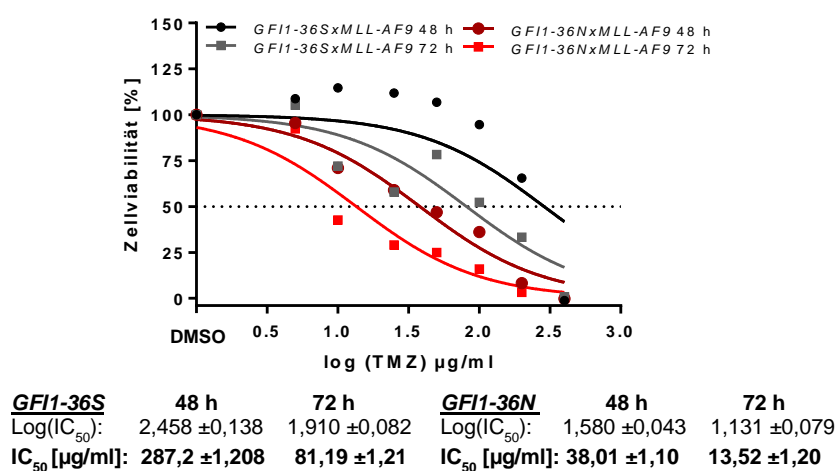


Abbildung 60: Stärkerer Effekt von TMZ auf die Zellviabilität von *GF11-36N*-leukämischen Zellen gegenüber *GF11-36S*-leukämischen Zellen

Dargestellt sind die Ergebnisse der MTT-Assays (Proliferation-Assay) mit murinen leukämischen *GF11-36S*- und *GF11-36N*-MLL-AF9-Knochenmarkszellen. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen TMZ-Konzentrationen (5, 10, 25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$) behandelt und nach 48 h bzw. 72 h wurde der MTT-Assay durchgeführt. Als Hintergrundkontrolle wurde die Absorption des Mediums ohne Zellen gemessen. Die Absorption der Hintergrundkontrolle wurde von der Absorption der Proben abgezogen. Die Zellviabilität wurde zur DMSO-Kontrolle (100%) normalisiert. Für die Berechnung der IC_{50} -Werte wurde GraphPad Prism 6 verwendet. Mittelwert \pm SD

Bei der Messung von Annexin⁺/PI⁻ (doppelt-positiven) Zellen mittels FACS (Apoptose-Assay) konnten ähnliche Ergebnisse festgestellt werden (Abb. 61). Für den Apoptose-Assay wurden *GF11-36S*- und *GF11-36N*-MLL-AF9-Knochenmarkszellen aus leukämischen Mäusen verwendet und für 48 h mit unterschiedlichen TMZ-Konzentrationen (5, 10, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$) behandelt. Als Kontrolle wurden die Zellen mit DMSO behandelt. Der Anteil an doppelt-positiven Zellen in den DMSO-Kontrollen wurde von den mit TMZ-behandelten Proben abgezogen. Nach 48 h Behandlung mit TMZ war der Anteil an doppelt-positiven Zellen in den *GF11-36N*-

leukämischen Zellen, bereits bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ höher als in den leukämischen Zellen mit *GFI1-36S*-Genotyp. Dieser Unterschied zwischen *GFI1-36S*- und *GFI1-36N*-leukämischen Zellen blieb auch mit steigender TMZ-Konzentration bestehen (Abb. 61).

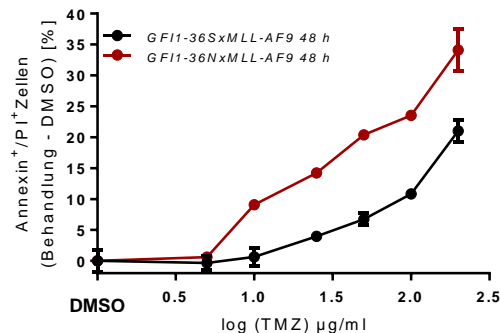


Abbildung 61: TMZ induzierte mehr Apoptose und Zelltod in *GFI1-36N*-leukämischen Zellen als in *GFI1-36S*-leukämischen Zellen

Dargestellt sind die Ergebnisse der Apoptose-Assays mit murinen leukämischen *GFI1-36S*- und *GFI1-36N*-MLL-AF9-Knochenmarkzellen. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen TMZ-Konzentrationen (5, 10, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$) behandelt und nach 48 h wurden die Zellen mit Annexin V und PI gefärbt. Mittels FACS und mithilfe der FlowJo-Software wurde der prozentuale Anteil an Annexin⁺/PI⁺-Zellen in den Proben bestimmt. Der Mittelwert der jeweiligen DMSO-Kontrolle wurde von den Annexin⁺/PI⁺-Werten, der mit TMZ behandelten, Proben abgezogen. Mittelwert \pm SD

Nach den Konzentrationsuntersuchungen wurde der Effekt von Temozolomid auf verschiedene *GFI1*-Genotypen hinsichtlich der Proliferation, Differenzierung sowie Apoptose in murinen Zellen genauer untersucht. Hierzu wurden als Erstes CFU-Assays durchgeführt. Mithilfe der CFU-Assays kann die Fähigkeit von einzelnen Zellen zu proliferieren sowie zu differenzieren anhand der Kolonieanzahl und -größe untersucht werden (Avraham et al., 2005). Für die Durchführung des CFU-Assays wurden Lin⁻-Zellen aus nicht leukämischen *GFI1-36S*- bzw. *GFI1-36N*-Mäusen sowie *GFI1-36S*- bzw. *GFI1-36N*-leukämische Knochenmarkzellen aus transplantierten oder transgenen Mäusen zusammen mit unterschiedlichen Temozolomid-Konzentrationen in Methylzellulose kultiviert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit DMSO behandelt, da TMZ in dieser Substanz gelöst wurde. Nach 14 Tagen wurden die Kolonien der unterschiedlichen Proben gezählt (Abb. 62).



Abbildung 62: Schematische Darstellung der Durchführung von CFU-Assays

Auf Grund der Ergebnisse des MTT- und Apoptose-Assays wurden die CFU-Assays zu Beginn mit einer TMZ-Konzentration von 50 µg/ml durchgeführt. Bei der Behandlung von *GFI1-36S*- und *GFI1-36N*-nicht leukämischen Zellen gab es kaum einen Effekt von TMZ auf die Koloniezahl. Die Koloniezahl war nach der Behandlung mit 50 µg/ml TMZ in beiden Genotypen nur minimal geringer als bei den jeweiligen Kontrollproben (Abb. 63 A). Ein ähnliches Ergebnis wurde mit den *GFI1-36S*-leukämischen Zellen erzielt. Nach der Behandlung mit 50 µg/ml TMZ war die Koloniezahl die gleiche wie bei den mit DMSO behandelten Proben. Dagegen betrug die Koloniezahl der *GFI1-36N*-leukämischen Zellen nach der Behandlung mit TMZ (relativ zu DMSO: 0,69 ±0,03) signifikant weniger als in den Kontrollproben und den mit TMZ behandelten *GFI1-36S*-leukämischen Zellen (relativ zu DMSO: 1,01 ±0,08) (Abb. 63 B). Des Weiteren war die Gesamtkoloniezahl in den unbehandelten *GFI1-36N*-Zellen (nicht leukämisch: 239,5 ±5,5; leukämisch: 200,0 ±7,2) höher als in den *GFI1-36S*-Proben (nicht leukämisch: 206,5 ±15,5; leukämisch: 162,1 ±14,2) (Abb. 63).

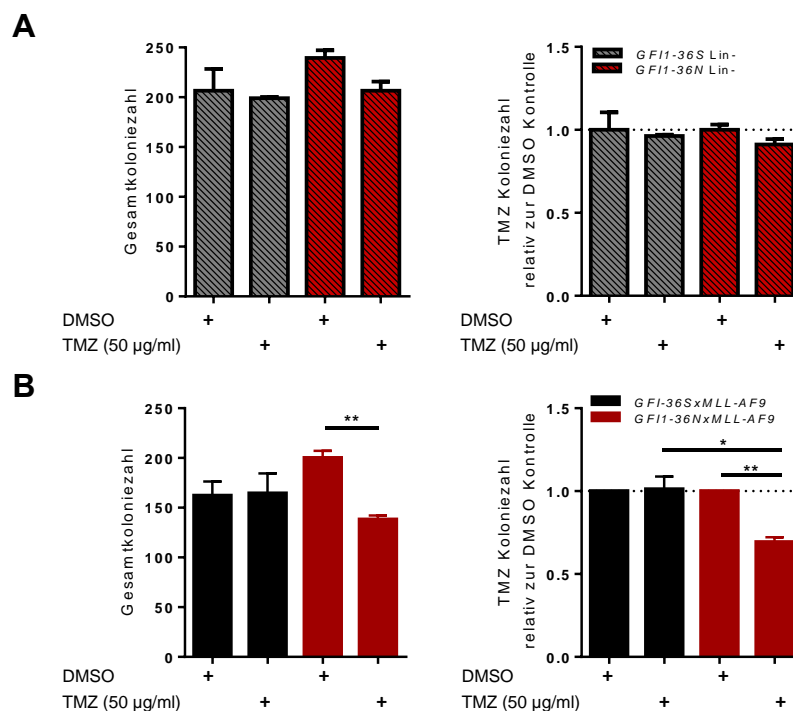


Abbildung 63: Selektiver Effekt der Behandlung mit 50 µg/ml TMZ auf murine *GFI1-36N*-leukämische Knochenmarkzellen

In **A**) wurden die CFU-Assay mit nicht leukämischen *GFI1-36S*- und *GFI1-36N*-Lin⁻-Zellen mit Zugabe von 50 µg/ml TMZ durchgeführt. Dargestellt ist eines von zwei CFU-Ergebnissen. Das andere Ergebnis ist in Abb. 67 gezeigt. Als Kontrolle wurde DMSO verwendet. Linker Graph: gesamte Kolonienanzahl; rechter Graph: TMZ-behandelte Proben relativ zum Mittelwert der DMSO-Kontrollen; Mittelwert ± SD. In **B**) wurden die CFU-Assay mit *GFI1-36S*- und *GFI1-36N*-leukämischen Zellen mit Zugabe von 50 µg/ml TMZ durchgeführt. Als Kontrolle wurde DMSO verwendet. Linker Graph: gesamte Kolonienanzahlen; rechter Graph: TMZ-behandelte Proben relativ zum Mittelwert der DMSO-Kontrollen. Die TMZ und DMSO-Werte stammen z.T. aus demselben Versuch wie in Abb. 67. n=3; p*=0,031; p**≤0,0089; Mittelwert ± SEM

Auf Grund des hohen selektiven Effektes von 50 µg/ml TMZ auf die *GFI1-36N*-leukämischen Zellen wurde als Nächstes getestet, ob mit niedrigerer TMZ-Konzentration derselbe Effekt zu erzielen ist. Deshalb wurde der gleiche Versuch mit einer um die Hälfte verringerten TMZ Konzentration (25 µg/ml) durchgeführt. Bereits bei der Untersuchung der Koloniezahl und -größe unter dem Mikroskop wurde gesehen, dass in nicht leukämischen Zellen der beiden *GFI1*-Genotypen fast keine Unterschiede zwischen den behandelten und nicht behandelten Proben vorhanden waren. Bei der Behandlung von leukämischen Zellen mit 25 µg/ml TMZ konnte in den *GFI1-36S*-Zellen ebenfalls kein Unterschied in der Koloniegröße festgestellt werden. Lediglich in den *GFI1-36N*-leukämischen Zellen gab es deutliche Unterschiede in der Koloniegröße zwischen den DMSO-behandelten Kontrollproben und den mit 25 µg/ml TMZ behandelten Proben. Die Kolonien waren in den TMZ-behandelten *GFI1-36N*-leukämischen Zellen deutlich kleiner und weniger (Abb. 64).

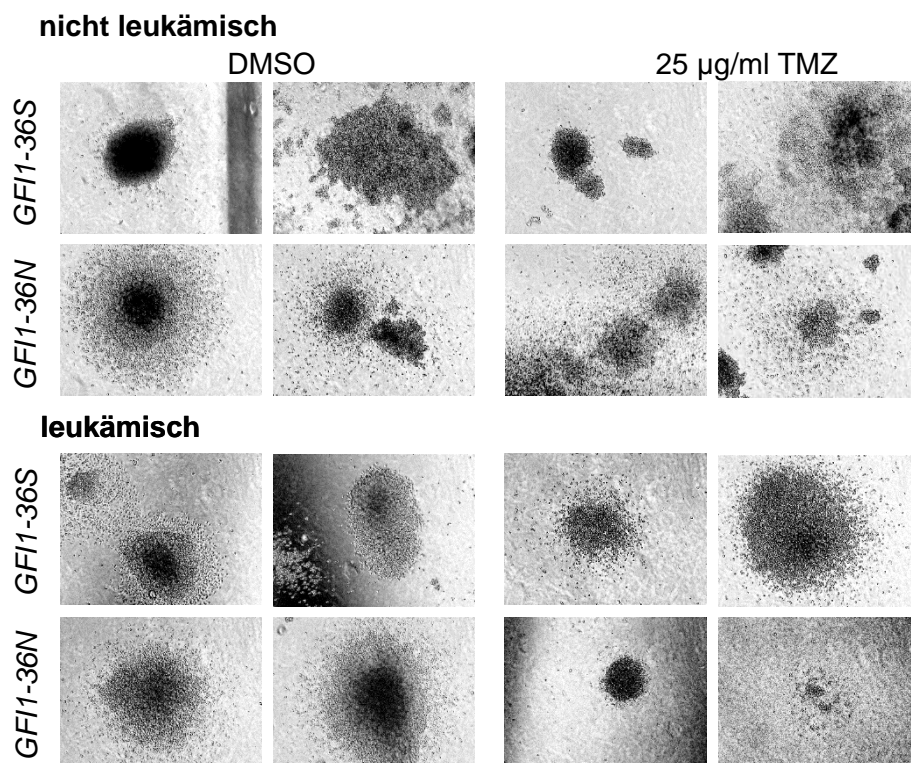


Abbildung 64: Bilder der Kolonien von nicht leukämischen und leukämischen *GFI1-36S*- und *GFI1-36N*-Zellen nach Behandlung mit 25 µg/ml TMZ

Hier dargestellt sind repräsentative Bilder der Kolonien des CFU-Assays aus Abb. 65 nach 14 Tagen. Murine nicht leukämische *Lin⁻*- bzw. leukämische-Knochenmarkzellen (MLL-AF9) wurden mit 25 µg/ml TMZ behandelt und als Kontrolle wurde DMSO verwendet. Die Bilder wurden mit einem Axio Vert.A1 von Zeiss und einem 10x Objektiv aufgenommen.

Bei den Bestimmungen der Koloniezahlen wurden ähnliche Ergebnisse detektiert, wie bereits bei der Koloniegröße. Sowohl die *GFI1-36S*- als auch die *GFI1-36N*-nicht leukämischen Zellen zeigten nahezu keinen Effekt gegenüber der Behandlung mit 25 µg/ml TMZ (Abb. 65 A). Bei der Behandlung von *GFI1-36S*-leukämischen Zellen war ein nur sehr geringer Unterschied zwischen den mit DMSO und den mit TMZ behandelten Zellen (relativ zu DMSO: $0,84 \pm 0,06$) zu sehen. Dagegen war der Unterschied zwischen den DMSO-Kontrollen und den mit 25 µg/ml TMZ behandelten Zellen der *GFI1-36N*-leukämischen Proben groß. Die Koloniezahlen der behandelten Proben ($94,0 \pm 7,9$ Kolonien) waren um mehr als die Hälfte geringer als in den DMSO-Kontrollen ($223,0 \pm 11,9$ Kolonien). (Abb. 65 B). Die Koloniezahlen der in Abb. 65 dargestellten Ergebnisse sind höher als in den mit 50 µg/ml TMZ behandelten Zellen (Abb. 63). Dies liegt an einer höheren ausplattierten Zellzahl.

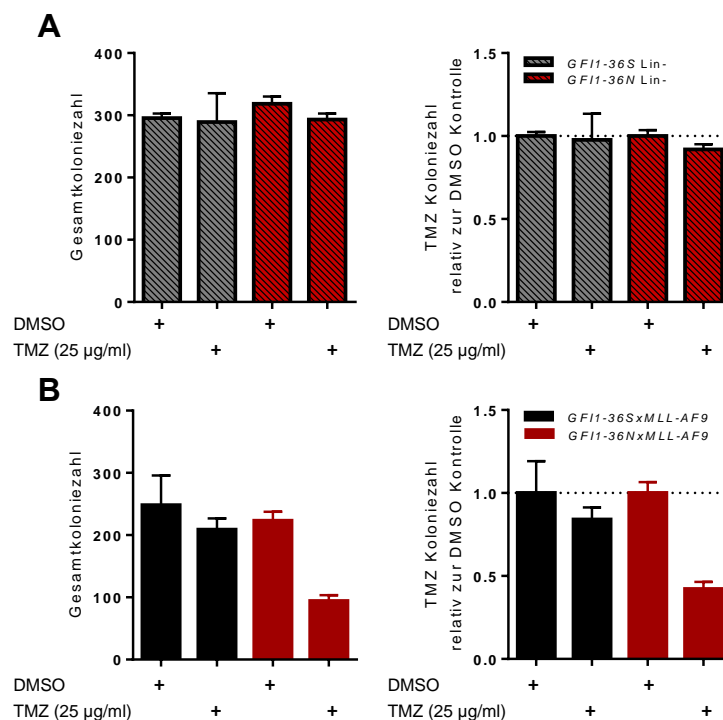


Abbildung 65: Selektiver Effekt der Behandlung mit 25 µg/ml TMZ auf murine *GFI1-36N*-leukämische Knochenmarkzellen

In **A**) wurden die CFU-Assay mit *GFI1-36S*- und *GFI1-36N*-Lin⁻-nicht leukämischen Zellen mit Zugabe von 25 µg/ml TMZ durchgeführt. Als Kontrolle wurde DMSO verwendet. Linker Graph: gesamte Koloniezahlen; rechter Graph: TMZ-behandelte Proben relativ zum Mittelwert der DMSO-Kontrollen; Mittelwert \pm SD. In **B**) wurden die CFU-Assay mit *GFI1-36S*- und *GFI1-36N*-MLL-AF9-leukämischen Zellen mit Zugabe von 25 µg/ml TMZ durchgeführt. Als Kontrolle wurde DMSO verwendet. Dargestellt sind die Ergebnisse eines von 2 Versuchen. Der zweite Versuch ist in Abb. 68 gezeigt. Linker Graph: gesamte Koloniezahlen; rechter Graph: TMZ-behandelte Proben relativ zum Mittelwert der DMSO-Kontrollen; Mittelwert \pm SD

Alle bisher durchgeführten CFU-Assays wurden mit Knochenmarkzellen aus mit *MLL-AF9* transplantierten Mäusen durchgeführt. Zur Überprüfung, ob der Effekt von TMZ nur auf *GFI1-36N-MLL-AF9*-leukämische Zellen oder auch auf andere AML-Modelle mit *GFI1-36N*-Genotyp zutrifft, wurden Knochenmarkzellen aus leukämischen Mäusen des transgene *NUP98-HOXD13*-Mausstammes mit 25 µg/ml TMZ behandelt. Da die RT-PCR- sowie Western Blot-Analysen auch in *GFI1-KD*-leukämischen Zellen geringere Mgmt-Level als in *GFI1-36S*-leukämischen Zellen zeigten, wurden neben *GFI1-36S*- und *GFI1-36N-NUP98-HOXD13*-Zellen auch Knochenmarkzellen aus den transgenen Mäusen mit niedrigem *GFI1*-Level für die Versuche verwendet. Zunächst war deutlich zu sehen, dass sowohl in den nicht leukämischen als auch leukämischen Proben mit niedrigem *GFI1*-Level die Kolonieanzahl deutlich höher war als in den *GFI1-36S*- und *GFI1-36N*-Proben. Des Weiteren waren auch die Koloniezahlen der *GFI1-36N-NUP98-HOXD13*-Proben höher als die der *GFI1-36S*-leukämischen Proben (Abb. 66). Nach der Behandlung von nicht transgenen (*NUP98-HOXD13 wt*) *GFI1-36S*-, *GFI1-36N*- und *GFI1-KD*-Zellen mit 25 µg/ml TMZ konnte gezeigt werden, dass in Zellen aller drei Genotypen ein nur geringer Effekt der Behandlung auf die Koloniezahl vorhanden war. Im Schnitt waren die Koloniezahlen mit der Behandlung um relativ 0,23 geringer als in den DMSO-Kontrollen (Abb. 66 A). Bei den transgenen leukämischen *GFI1-36S-NUP98-HOXD13*-Zellen blieb der Effekt der TMZ-Behandlung der gleiche (relativ zu DMSO: $0,82 \pm 0,06$), wie in den *GFI1-36S*-nicht leukämischen Zellen (relativ zu DMSO: $0,85 \pm 0,06$). Dagegen nahm die Koloniezahl in den *GFI1-36N*- und *GFI1-KD*-leukämischen Zellen deutlich ab und somit war der Effekt der TMZ-Behandlung in diesen beiden Genotypen höher als in den dazugehörigen nicht leukämischen Proben und in den *GFI1-36S*-leukämischen und -nicht leukämischen Zellen. In den *GFI1-36N*-leukämischen Zellen lag die Gesamtkoloniezahl ohne TMZ bei ca. 45 Kolonien und mit TMZ-Behandlung bei ca. 12 Kolonien. In den *GFI1-KD*-transgenen Proben betrug die Differenz der DMSO-Kontrollen und der mit TMZ-behandelten Proben $67,3 \pm 8,7$ Kolonien (Abb. 66 B).

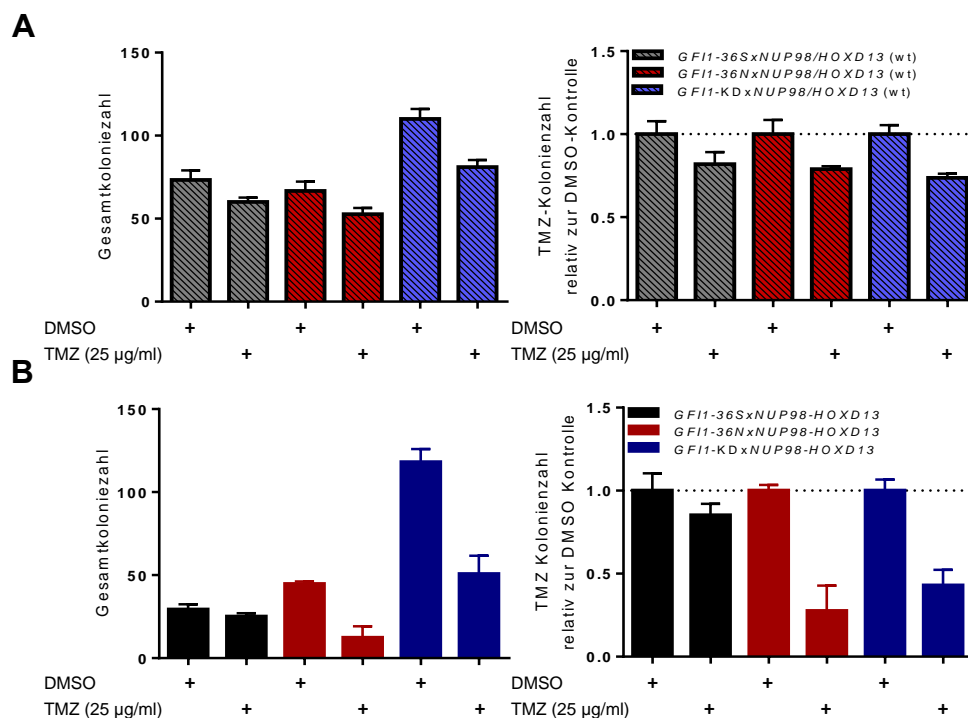


Abbildung 66: 25 µg/ml TMZ hatte einen selektiven Effekt auf GFI1-36N- sowie GFI1-KD-NUP98-HOXD13-leukämische Zellen

Dargestellt sind die Ergebnisse eines von zwei CFU-Assays nach 14 Tagen. Am Tag des Ausplattierens wurden 25 µg/ml TMZ zu der Methylzellulose hinzugefügt. Als Kontrolle wurde DMSO verwendet. In **A**) wurden die CFU-Assays mit murinen nicht leukämischen GFI1-36S-, GFI1-36N- sowie GFI1-KD-Lin⁻-Zellen durchgeführt. Linker Graph: gesamte Koloniezahlen; rechter Graph: TMZ-behandelte Proben relativ zum Mittelwert der DMSO-Kontrollen; Mittelwert ± SD, Triplikate. In **B**) wurden die CFU-Assays mit murinen leukämischen GFI1-36S-, GFI1-36N- sowie GFI1-KD-NUP98-HOXD13-Zellen durchgeführt. Linker Graph: gesamte Koloniezahlen; rechter Graph: TMZ-behandelte Proben relativ zum Mittelwert der DMSO-Kontrollen; Mittelwert ± SD, Triplikate

TMZ induziert neben O6-MeG-Läsionen auch N7-MeG- und N3-MeA-Läsionen, welche durch die BER repariert werden (Denny et al., 1994; Tentori and Graziani, 2002; Horton et al., 2003; Drabløs et al., 2004). Bei der BER spielt u.a. PARP1 eine Rolle (Parsons et al., 2005; Woodhouse et al., 2008). In vielen Studien wurde deshalb die Kombinationsbehandlung von TMZ und PARPi untersucht (Plummer et al., 2008; Gojo et al., 2017; Singh et al., 2019; Farago et al., 2019). Es konnte gezeigt werden, dass durch die Kombination der beiden Medikamente ein besserer Effekt bei der Therapie von fortgeschrittenen soliden Tumoren erzielt werden kann und die Kombinationstherapie eine vielversprechende Therapie-Alternative bei myeloiden Leukämien darstellt (Plummer et al., 2008; Gojo et al., 2017; Singh et al., 2019). Mit Hilfe von PARPi kann möglichen Resistenzmechanismen gegen TMZ, welche durch eine funktionierende BER entstehen, entgegengesteuert werden und somit die Antitumoraktivität von TMZ erhöht werden (Tentori and Graziani, 2009; Zhang et al.,

2010). In der vorliegenden Arbeit zeigte die Behandlung mit TMZ in unterschiedlichen murinen AML-Modellen bereits einen guten und selektiven Effekt auf *GFI1-36N*-leukämische Knochenmarkzellen. Die Behandlung hatte keine oder eine nur schwache Wirkung auf nicht maligne Lin⁻-Zellen. Um die Wirkung von TMZ noch zu verstärken, wurden auf Grund der oben genannten Studien die Kombination aus TMZ und Olaparib (PARPi) auf leukämische und nicht leukämische Zellen getestet. Es wurden verschiedene Konzentrationen der zwei Medikamente kombiniert, um die geringste Konzentration zu finden, welche dennoch einen guten, selektiven Effekt bei der Behandlung von *GFI1-36N*-leukämischen Zellen zeigt, jedoch nicht auf nicht leukämischen Zellen. Hierfür wurden erneut CFU-Assays mit Lin⁻-Zellen aus nicht leukämischen Mäusen sowie leukämischen Knochenmarkzellen aus mit *MLL-AF9* transplantierten Mäusen durchgeführt. Zunächst wurde die Einzel- sowie Kombinationsbehandlung aus 50 µg/ml TMZ und 1 µM Olaparib getestet. Wie schon bei vorangegangenen Versuchen konnte die selektive Wirkung von TMZ auf leukämische *GFI1-36N*-Zellen bestätigt werden (Abb. 67). Die nicht leukämischen *GFI1-36S*- und *GFI1-36N*-Proben, welche mit 1 µM Olaparib behandelt wurden, hatten eine nur minimal geringere Koloniezahl als die DMSO-Kontrollen (Abb. 67 A). Dagegen zeigten die mit Olaparib behandelten leukämischen Proben eine deutlich geringere Koloniezahl als die Kontrollen. Dabei zeigten die leukämischen *GFI1-36N*-Zellen einen geringfügig höheren Effekt (relativ zu DMSO: 0,11 ±0,03) als die *GFI1-36S*-Zellen (relativ zu DMSO: 0,34 ±0,11) (Abb. 67 B). Die Kombination aus 50 µg/ml TMZ und 1 µM Olaparib reduzierte sowohl die Koloniezahl in den nicht leukämischen als auch in den leukämischen Zellen deutlich. In den leukämischen Proben waren nach der Behandlung mit beiden Medikamenten kaum Kolonien übrig (Abb. 67).

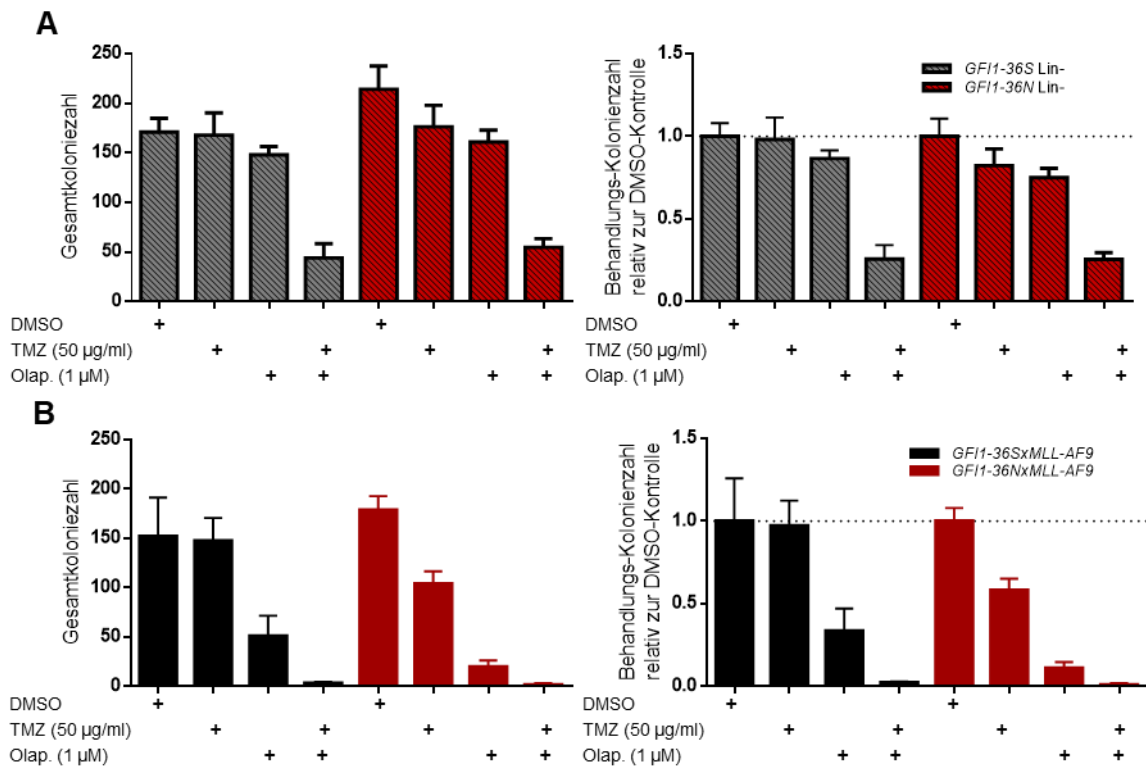


Abbildung 67: Die Kombinationsbehandlung mit 50 µg/ml TMZ und 1 µM Olaparib hatte einen starken Effekt auf nicht leukämische und leukämische Zellen

Dargestellt sind die CFU-Koloniezahlen nach 14 Tagen in Methylcellulose. Am Tag des Ausplattierens wurde zu der Methylzellulose 50 µg/ml TMZ, 1 µM Olaparib oder die Kombination aus beiden Medikamenten hinzugefügt. Als Kontrolle wurde DMSO verwendet. In **A**) wurden die CFU-Assay mit murinen GFI1-36S- und GFI1-36N-Lin-nicht leukämischen Zellen durchgeführt. Linker Graph: gesamte Koloniezahlen; rechter Graph: TMZ-behandelte Proben relativ zum Mittelwert der DMSO-Kontrollen; Mittelwert \pm SD, Triplikate. In **B**) wurden die CFU-Assay mit murinen GFI1-36S- und GFI1-36N-MLL-AF9-leukämischen Zellen durchgeführt. Linker Graph: gesamte Koloniezahlen; rechter Graph: TMZ-behandelte Proben relativ zum Mittelwert der DMSO-Kontrollen; Mittelwert \pm SD, Triplikate

Da die Kombination aus den hier gewählten Konzentrationen einen zu starken Effekt auf nicht leukämische sowie leukämische Zellen, unabhängig des Genotyps hatte, wurden die Versuche mit um die Hälfte verringerten Konzentrationen wiederholt. Die CFU-Assays mit den Einzel- sowie der Kombinationstherapie von 25 µg/ml TMZ und 0,5 µM Olaparib ergaben dieselben Ergebnisse wie die mit den doppelt so hohen Konzentrationen. TMZ hatte erneut einen selektiven Effekt auf die GFI1-36N-leukämischen Zellen im Gegensatz zu GFI1-36S-leukämischen und nicht leukämischen Zellen (Abb. 68). Dagegen hatten die nicht leukämischen Zellen sowohl nach der Behandlung mit 0,5 µM Olaparib als auch nach der Behandlung mit der Kombination eine geringere Koloniezahl als die Kontrollen (Abb. 68 A). Der Effekt der Kombinationstherapie auf die nicht leukämischen Zellen war dennoch etwas geringer

als auf die leukämischen Zellen. Bei den leukämischen Zellen waren nach der Behandlung mit 25 µg/ml TMZ und 0,5 µM Olaparib nahezu keine Kolonien gewachsen (*GFI1-36S*:16-24 Kolonien; *GFI1-36N*: 3-9 Kolonien). Außerdem war, wie bereits bei den höheren Konzentrationen, ein nur geringer selektiver Effekt der Kombinationstherapie auf die *GFI1-36N*-leukämischen Zellen zu sehen (Abb. 68 B).

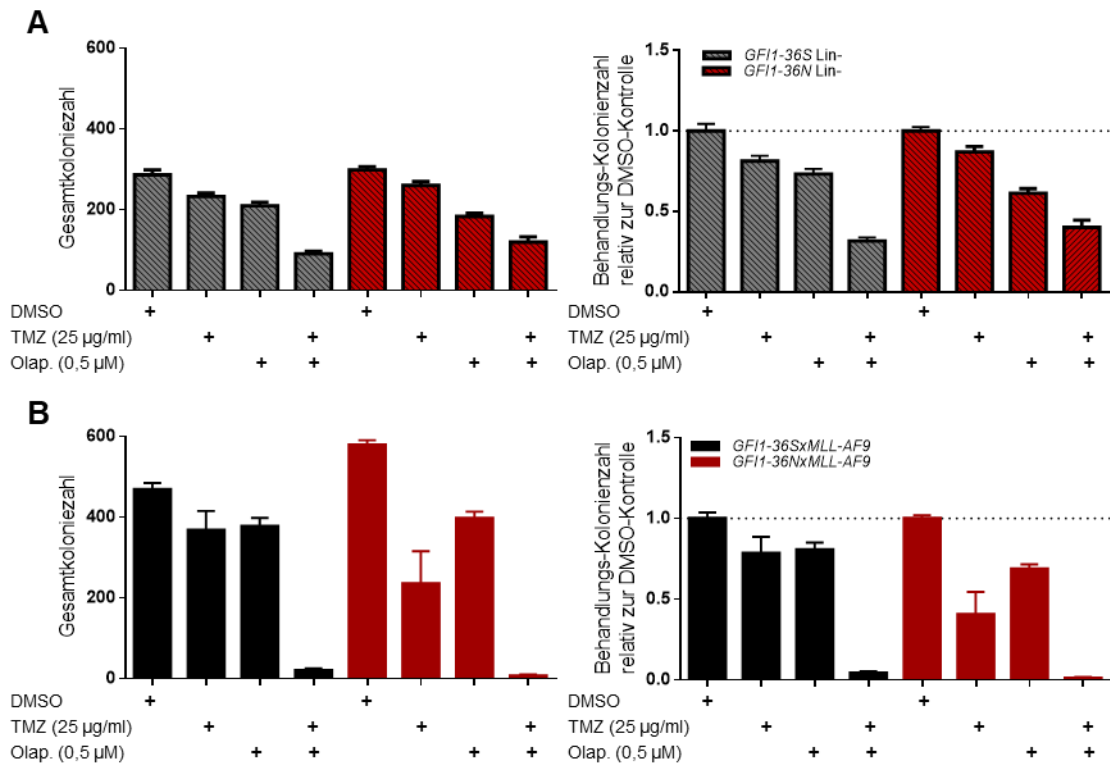


Abbildung 68: Die Kombinationsbehandlung mit 25 µg/ml TMZ und 0,5 µM Olaparib hatte einen starken Effekt auf nicht leukämische und leukämische Zellen

Dargestellt sind die CFU-Koloniezahlen nach 14 Tagen Kultur in Methylcellulose. Am Tag des Ausplattierens wurde zu der Methylzellulose 25 µg/ml TMZ, 0,5 µM Olaparib oder die Kombination aus beiden Medikamenten zugegeben. Als Kontrolle wurde DMSO hinzugefügt. In **A**) wurden die CFU-Assays mit murinen *GFI1-36S*- und *GFI1-36N*-Lin-nicht leukämischen Zellen durchgeführt. Linker Graph: gesamte Koloniezahlen; rechter Graph: TMZ-behandelte Proben relativ zum Mittelwert der DMSO-Kontrollen; Mittelwert ± SD. In **B**) wurden die CFU-Assays mit murinen *GFI1-36S*- und *GFI1-36N*-MLL-AF9-leukämischen Zellen durchgeführt. Linker Graph: gesamte Koloniezahlen; rechter Graph: TMZ-behandelte Proben relativ zum Mittelwert der DMSO-Kontrollen; Mittelwert ± SD

Demnach waren die gewählten Konzentrationen weiterhin zu hoch und für den nächsten CFU-Assay wurden die Konzentrationen auf 10 µg/ml bei TMZ und 0,2 µM bei Olaparib erniedrigt. Die Kombination aus 10 µg/ml TMZ und 0,2 µM Olaparib hatte nahezu keinen Effekt auf die Koloniezahl der nicht leukämischen Zellen. Sowohl die relative Anzahl in *GFI1-36S*-Lin⁻-Zellen (0,92 ±0,02) als auch in *GFI1-36N*-Lin⁻-Zellen (0,89 ±0,01) nach Behandlung mit TMZ und Olaparib waren nahezu die gleichen wie in den dazugehörigen DMSO-Kontrollen (Abb. 69 A). Bei der Behandlung von leukämischen Zellen war die Koloniezahl sowohl in *GFI1-36S*- als auch in *GFI1-36N*- Zellen signifikant reduziert im Gegensatz zu den dazugehörigen DMSO-Kontrollen. Jedoch war der Unterschied in der Koloniezahl zwischen den mit DMSO behandelten Proben und denen der Kombinationstherapie (10 µg/ml TMZ und 0,2 µM Olaparib) in den *GFI1-36N*-leukämischen Zellen (relativ zu DMSO: 0,23 ±0,10) signifikant ($p=0,0057$) höher als in den *GFI1-36S*-leukämischen Zellen (relativ zu DMSO: 0,75 ±0,08) (Abb. 69 B). Außerdem konnte gezeigt werden, dass selbst mit einer geringen TMZ-Konzentration der selektive Effekt auf *GFI1-36N*-leukämische Zellen vorhanden ist, wenn auch nicht ganz so stark wie bei höheren TMZ Konzentrationen. Die *GFI1-36S*-leukämischen Zellen hatten mit der Behandlung von TMZ nahezu die gleiche Koloniezahl als die DMSO-Kontrollen (relativ zu DMSO: 0,95 ±0,04), wohingegen die mit TMZ behandelten *GFI1-36N*-leukämischen Zellen weniger Kolonien hatten als die Kontrollen (relativ zu DMSO: 0,75 ±0,01). Des Weiteren waren die Koloniezahlen der DMSO-Kontrollen in den leukämischen *GFI1-36N*-Proben (Mittelwert: 48,6 Kolonien) deutlich höher als in den leukämischen *GFI1-36S*-Proben (Mittelwert: 27,0 Kolonien) (Abb. 69 B).

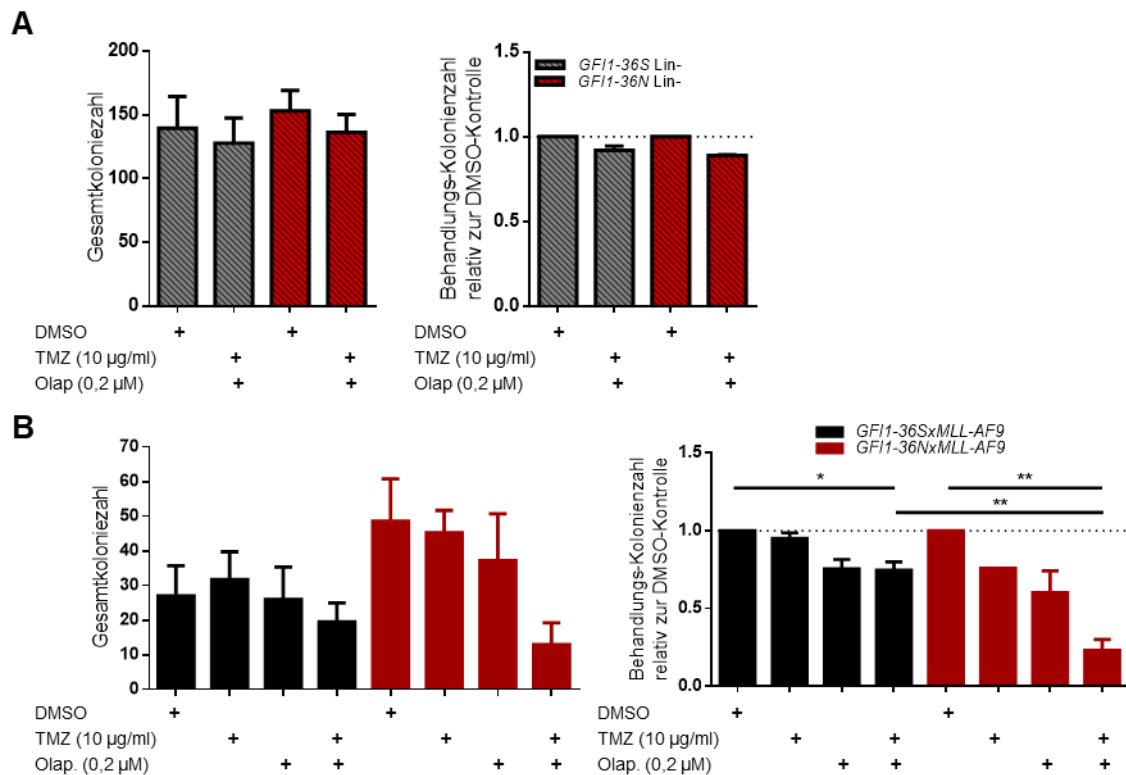


Abbildung 69: Höherer Effekt der Kombination aus 10 µg/ml TMZ und 0,2 µM Olaparib auf GF11-36N-leukämische Zellen im Vergleich zu GF11-36S- leukämische und nicht leukämische Zellen

Dargestellt sind die CFU-Koloniezahlen nach 14 Tagen in Kultur. Am Tag des Ausplattierens wurde zu der Methylzellulose 10 µg/ml TMZ, 0,2 µM Olaparib oder die Kombination aus beiden Medikamenten zugegeben. Als Kontrolle wurde DMSO hinzugefügt. In **A**) wurden die CFU-Assays mit murinen GF11-36S- und GF11-36N-Lin⁻-nicht leukämischen Zellen durchgeführt. Linker Graph: gesamte Koloniezahlen; rechter Graph: TMZ-behandelte Proben relativ zum Mittelwert der DMSO-Kontrollen; Mittelwert ± SEM; n=3 In **B**) wurden die CFU-Assay mit murinen GF11-36S- und GF11-36N-MLL-AF9-leukämischen Zellen durchgeführt. Linker Graph: gesamte Koloniezahlen; rechter Graph: TMZ-behandelte Proben relativ zum Mittelwert der DMSO-Kontrollen; n=2 (Einzelbehandlung), je Triplikate; n=3 (DMSO, Kombinationsbehandlung), je Triplikate; p*=0,0418, p**≤0,0086; Mittelwert ± SEM.

Zur weiteren Untersuchung des Effekts von Temozolomid und Olaparib wurde die Anzahl an apoptotischen und toten Zellen mittels Apoptose-Assays bestimmt. Hierzu wurden murine Lin⁻-nicht leukämische Zellen und leukämische-MLL-AF9 Zellen mit der niedrigsten TMZ (10 µg/ml)- und Olaparib (0,2 µM)-Konzentration, welche in den CFU-Assays einen selektiven Effekt auf GF11-36N-leukämische Knochenmarkzellen zeigten, behandelt. Nach 48 h in Kultur wurden die Zellen mit Annexin V und PI gefärbt und die doppelt-positiven Zellen mittels FACS analysiert. In Abbildung 70 sind die Annexin⁺/PI⁻ (doppelt-positiven) Zellen der Lin⁻-Zellen aus nicht leukämischen GF11-36S- und GF11-36N-Mäusen dargestellt. Ohne Behandlung war die prozentuale Anzahl an doppelt-positiven Zellen in den GF11-36S- und den GF11-36N-nicht leukämischen Zellen nahezu gleich groß und lag bei ca. 10% (Abb. 70 A). Die Anzahl

an apoptotischen/toten Zellen war in den mit 10 µg/ml TMZ (ca. 13 %) und in den mit der Kombinationstherapie behandelten Proben (ca. 15%) minimal höher als in den DMSO-Kontrollen. In den Proben, welche mit 0,2 µM Olaparib behandelt wurden, betrug die Anzahl an Annexin⁺/PI⁺-Zellen nahezu die gleiche wie in den Kontrollen. In den *GFI1-36N*-nicht leukämischen Zellen war die prozentuale Anzahl an doppelt-positiven Zellen sogar etwas geringer (Abb. 70). Alle prozentualen Werte der unterschiedlichen Behandlungen nach Abzug der DMSO-Kontrollwerte lagen im Schnitt unter 5,5% (Abb. 70 B).

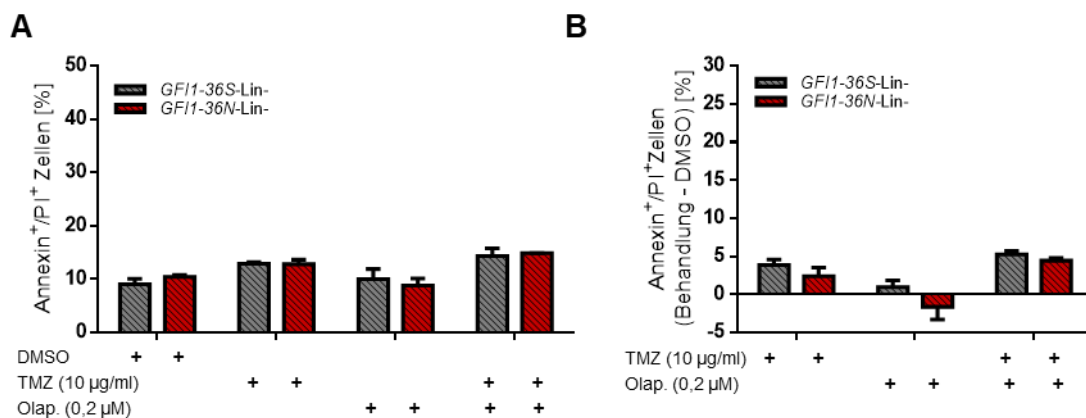


Abbildung 70: Geringer Effekt der Kombinationsbehandlung aus 10 µg/ml TMZ und 0,2 µM Olaparib auf die Anzahl an apoptotischen und toten Zellen in nicht leukämischen Lin-Zellen

Dargestellt sind die Annexin⁺/PI⁺-Zellen 48 h nach der Behandlung mit 10 µg/ml TMZ, 0,2 µM Olaparib oder der Kombination aus beiden Medikamenten. Als Kontrolle wurde DMSO verwendet. Verwendet wurden Lin⁻-Zellen aus *GFI1-36S*- bzw. *GFI1-36N*-Mäusen. Die Zellen wurden mit Annexin V und PI gefärbt und mittels FACS detektiert und mithilfe der FlowJo-Software analysiert. In **A**) sind die absoluten Werte, der Annexin⁺/PI⁺-Zellen, in Prozent dargestellt. $n=2$, jeweils in Triplikaten; Mittelwert \pm SEM. In **B**) wurden die jeweiligen Mittelwerte der DMSO-Kontrolle von den Einzelwerten der unterschiedlichen Behandlungen abgezogen. $n=2$, jeweils in Triplikaten; Mittelwert \pm SEM

Die Ergebnisse des Apoptose-Assays von den *GFI1-36S*- und *GFI1-36N*-leukämischen Zellen nach der Behandlung mit 10 µg/ml TMZ, 0,2 µM Olaparib oder der Kombination zeigten denselben Trend wie die Ergebnisse der CFU-Assays. Die Anzahl an doppelt-positiven Zellen betrug in den *GFI1-36S*-leukämischen Zellen bei allen drei Behandlungsmethoden fast dieselbe. Die prozentuale Anzahl an Annexin⁺/PI⁺-Zellen lag bei ca. 10% und betrug somit ähnliche Werte wie bei den nicht leukämischen Zellen (Abb. 71 A). Dagegen stieg die prozentuale Anzahl an doppelt-positiven Zellen nach der Behandlung mit 10 µg/ml TMZ sowie der Kombination aus TMZ und Olaparib in den *GFI1-36N*-leukämischen Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle an (Abb. 71 A). Nach Abzug der Werte der doppelt-positiven Zellen der

DMSO-Kontrolle von denen der unterschiedlichen Behandlungen, betrug die Werte der *GFI1-36S*-leukämischen Zellen im Schnitt $0,34\% \pm 1,69\%$. Die *GFI1-36N*-leukämischen Proben, welche mit $10 \mu\text{g/ml}$ TMZ behandelt wurden, hatten nach Abzug der DMSO-Kontrolle noch $7,86\% \pm 1,2\%$ Annexin⁺/PI⁺-Zellen und die Anzahl der doppelt-positiven Zellen war signifikant höher als bei den dazugehörigen *GFI1-36S*-Proben. Bei den *GFI1-36N*-Proben, welche mit der Kombination aus beiden Substanzen behandelt wurden, betrug der prozentuale Anteil nach Abzug der DMSO-Kontrolle $12,48\% \pm 2,39\%$. Die *GFI1-36N*-leukämischen Proben hatten damit signifikant mehr Annexin⁺/PI⁺-Zellen als die *GFI1-36S*-leukämischen Proben nach der Kombinationsbehandlung ($0,96\% \pm 1,52\%$) (Abb. 71 B). Die Kombinationsbehandlung sowie die Behandlung mit TMZ hatten somit einen höheren Einfluss auf die prozentuale Anzahl an Annexin⁺/PI⁺-Zellen in *GFI1-36N*-leukämischen Zellen gegenüber den *GFI1-36S*-leukämischen Zellen. Außerdem war die Anzahl an Annexin⁺/PI⁺-Zellen in den *GFI1-36N*-leukämischen-Proben nach der Kombinationsbehandlung signifikant höher als nach den Einzelbehandlungen mit TMZ und Olaparib. (Abb. 71).

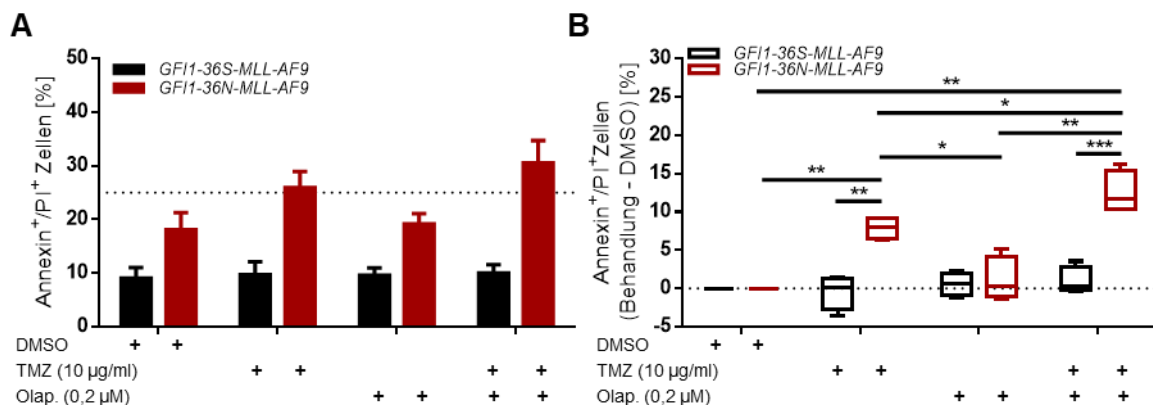


Abbildung 71: Mehr apoptotische und tote Zellen in *GFI1-36N*-leukämischen Zellen nach der Kombinationsbehandlung mit $10 \mu\text{g/ml}$ TMZ und $0,2 \mu\text{M}$ Olaparib

Dargestellt sind die Annexin⁺/PI⁺-Zellen 48 h nach Behandlung mit $10 \mu\text{g/ml}$ TMZ, $0,2 \mu\text{M}$ Olaparib oder der Kombination aus beiden Medikamenten. Verwendet wurden Knochenmarkszellen aus leukämischen *GFI1-36S*- bzw. *GFI1-36N*-MLL-AF9-Mäusen. Als Kontrolle wurde DMSO verwendet. Die Zellen wurden mit Annexin V und PI gefärbt und mittels FACS detektiert und mithilfe der FlowJo-Software analysiert. In **A**) sind die absoluten Werte, der Annexin⁺/PI⁺-Zellen in Prozent dargestellt. $n=4$; Mittelwert \pm SEM. In **B**) wurden die jeweiligen Mittelwerte der DMSO-Kontrolle von den Einzelwerten der unterschiedlichen Behandlungen abgezogen. Die Ergebnisse sind als Boxplot (Linie=Median) mit „Whiskers“ vom Min. zum Max. dargestellt. $n=4$; $p^* \leq 0,0354$; $p^{**} \leq 0,0029$; $p^{***} = 0,0008$

Die Ergebnisse zeigten, dass TMZ einen selektiven Einfluss auf die Koloniezahl sowie die Anzahl an Annexin⁺/PI⁺-Zellen in *GF11-36N*-leukämischen Zellen hat, wohingegen bei den niedrigen Konzentrationen kein Effekt von TMZ auf die nicht leukämischen Zellen sowie die *GF11-36S*-leukämischen Zellen detektiert werden konnte. Außerdem konnte der selektive Effekt auf die Koloniezahl und die Anzahl an Annexin⁺/PI⁺-Zellen in den *GF11-36N*-leukämischen Zellen durch die Kombinationstherapie aus TMZ und Olaparib (bei den richtigen Konzentrationen) noch erhöht werden.

4.3.2 Humane *GF11-36N*-leukämische Zellen zeigen *in vitro* einen höheren Effekt gegenüber Temozolomid und in Kombination mit Olaparib

Die Behandlungen von murinen Zellen mit TMZ und Olaparib lieferten vielversprechende Ergebnisse, dass mit der Kombinationsbehandlung gezielt eine Wirkung auf die *GF11-36N*-leukämischen Zellen erreicht werden kann. Sowohl TMZ allein als auch in Kombination mit Olaparib hatte einen selektiven Effekt auf *GF11-36N*-leukämische Zellen und keinen bzw. einen signifikant geringeren Effekt auf *GF11-36S*-leukämische und nicht maligne Zellen. Zur Überprüfung, ob die unterschiedlichen Medikamente auch selektiv und sensitiv auf humane leukämische Zellen mit *GF11-36N*-Genotyp wirken, wurden primäre PB-, Milz (SPL)- und KM-Zellen von MDS-/AML-Patienten mit den beiden Substanzen behandelt. Die primären Zellen stammten z.T. aus der Hannover-Kohorte (von Herrn Prof. Dr. Michael Heuser zur Verfügung gestellt), welche hinsichtlich der chromosomalen Aberrationen untersucht wurden und teilweise wurden die Proben von Frau Prof. Dr. Irmela Jeremias (Helmholtz Zentrum München) bereitgestellt. Wie bereits bei der Behandlung der murinen Zellen wurde der Einfluss der Medikamente mittels CFU-Assay sowie Apoptose-Assay gemessen. Die humanen Zellen waren eingefroren und nach dem Auftauen betrug die Lebendzellzahl zwischen 10% und 30%. Für die Versuche wurden die Zellen mit ausreichender Lebendzellzahl verwendet. Bei den Apoptose-Assays konnten keine Unterschiede zwischen den *GF11-36N*- und *GF11-36S*-leukämischen Zellen detektiert werden, da die primären humanen Zellen nach 48 h in Kultur bereits bei der DMSO-Kontrolle eine hohe Anzahl an Annexin⁺- sowie PI⁺-Zellen hatten. Für die CFU-Assays wurden vier homozygote *GF11-36S*-Proben (2x KM und 2x PB) verwendet und für die *GF11-36N*-Gruppe wurden zwei *GF11-36S/N* (1x KM und 1x SPL) und zwei *GF11-36N/N* (2x PB) verwendet. Die aufgetauten humanen Zellen wurden in Methylzellulose-Medium unter Zugabe von 10 µg/ml Temozolomid, 0,2 µM Olaparib oder der Kombination aus beiden

Substanzen für 14 Tage kultiviert. In allen Proben waren nach 14 Tagen keine Kolonien sichtbar. Deshalb wurde anstelle der Koloniezahl die Zellzahl der humanen Zellen nach Behandlung bestimmt. Es wurde sowohl die Lebendzellzahl als auch die Anzahl an toten Zellen sowie die daraus einhergehende Gesamtzellzahl bestimmt. Die Gesamtzellzahl war in den humanen *GF11-36N*-leukämischen- und *GF11-36S*-leukämischen-Zellen ohne Behandlung nahezu die gleiche und auch mit den unterschiedlichen Behandlungen gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen (Abb. 72 A). Bei der Berechnung des prozentualen Anteils an lebenden Zellen wurde gezeigt, dass lediglich die Kombinationstherapie im Vergleich zur DMSO-Kontrolle einen geringen Effekt auf die humanen *GF11-36S*-leukämischen Zellen hatte (DMSO: 52,14% \pm 3,29%, Kombinationstherapie: 41,12% \pm 2,32%). Der Effekt der Kombinationstherapie auf die *GF11-36N*-leukämischen-Zellen war gegenüber der DMSO-Kontrolle signifikant höher (Differenz zur Kontrolle: ca. 35%, $p=0,0008$) und auch höher als bei den behandelten *GF11-36S*-leukämischen Zellen (Differenz zur Kontrolle: ca. 11%). Außerdem wurde die Anzahl an lebenden Zellen durch die Einzelbehandlung mit TMZ (35,42% \pm 4,52%) und Olaparib (44,93% \pm 3,49%) in *GF11-36N*-leukämischen Zellen signifikant reduziert gegenüber der DMSO-Kontrolle (62,66% \pm 3,51%) wohingegen kein großer Unterschied in den *GF11-36S*-Proben detektiert wurde (Abb. 72 B).

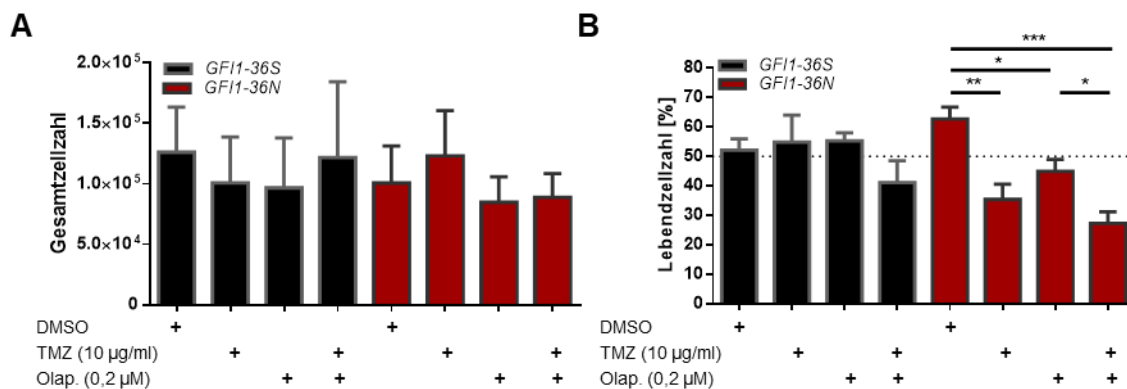


Abbildung 72: Die Kombinationsbehandlung mit 10 µg/ml Temozolomid und 0,2 µM Olaparib hatte einen höheren Effekt auf primäre humane leukämische Zellen mit GF11-36N-Genotyp

Dargestellt sind die Zellzahlen von primären humanen leukämischen Zellen nach 14 Tagen in Methylcellulose. Am Tag des Ausplattierens wurde zu der Methylcellulose 10 µg/ml TMZ, 0,2 µM Olaparib oder die Kombination aus beiden Medikamenten zugegeben. Als Kontrolle wurde DMSO hinzugefügt. In **A**) ist die Gesamtzellzahl (lebend + tote Zellen) der Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau dargestellt. Mittelwert \pm SEM $n=4$. In **B**) wurde die Lebendzellzahl in Prozent von der Gesamtzellzahl kalkuliert. Die Differenz zu 100% ist der prozentuale Anteil an toten Zellen. $n=4$; $p \leq 0,0211$; $p^{**}=0,0070$, $p^{***}=0,0008$; Mittelwert \pm SEM

5 Diskussion

In vorhergegangenen Studien wurde gezeigt, dass Patienten mit *GFI1-36N*-Genotyp ein erhöhtes Risiko haben, an einer AML oder MDS zu erkranken (Khandanpour et al., 2010; Khandanpour et al., 2012; Botezatu et al., 2016b; Botezatu et al., 2016a). Sowohl das Vorhandensein der *GFI1-36N*-Variante als auch niedrige GFI1-Level haben einen negativen Einfluss auf die AML-Prognose (Hönes et al., 2016; Botezatu et al., 2016b). In leukämischen Mausmodellen konnte bestätigt werden, dass *GFI1-36N* die Entwicklung einer AML fördert und AML-Mausmodelle mit dem *GFI1-36N*-Genotyp schneller an einer Leukämie erkranken (Botezatu et al., 2016b). Eine publizierte Erklärung für die AML-prädisponierende Funktion ist, dass es durch die Präsenz von GFI1-36N vermehrt zu H3K9-Acetylierungen der Zielgene kommt, da GFI1-36N zwar die histonmodifizierenden Enzyme bindet, aber sie nicht in gleicher Weise an die genregulierenden Elemente führt. Dadurch kann u.a. die Deacetylierung von H3K9 nicht induziert werden. Die vermehrte H3K9-Acetylierung der GFI1-Zielgene führt dann insbesondere zur Expression von Onkogenen (Botezatu et al., 2016b).

Die vorliegende Arbeit zeigt weitere wichtige Funktionen von GFI1 in hämatopoetischen Zellen und liefert dadurch weitere Hinweise auf die AML prädisponierende Funktion der *GFI1*-Variante *GFI1-36N*. Es konnte gezeigt werden, dass die Präsenz von *GFI1-36N* in leukämischen Zellen einen Einfluss auf die Genomstabilität hat. *GFI1-36N* beeinflusst die DNA-Reparatur in malignen Zellen und geht mit einer erhöhten Anzahl an genetischen Veränderungen einher. Die hier vorliegende Arbeit liefert zudem erste Hinweise darauf, dass nicht nur durch die *GFI1-36N*-Variante mehr DNA-Schäden und Veränderungen der DNA-Reparatur in leukämischen Zellen entstehen, sondern auch in leukämischen Zellen mit geringem GFI1-Level. Die Rolle von GFI1 bei der Aufrechterhaltung der DNA-Reparatur eröffnet vielseitige Möglichkeiten für neue Therapieansätze bei der AML-Behandlung.

5.1 Vermehrte genetische Veränderungen durch hohen DNA-Schaden und verringerte DNA-Reparatur in *GFI1-36N*-leukämischen Zellen

Ein Schlüsselfaktor bei der Entstehung von Krebs ist, neben anderen Faktoren, die genomische Instabilität. Eine genomische Instabilität wurde in den letzten Jahren immer mehr zum Merkmal von Krebserkrankungen (Negrini et al., 2010). Auch bei der Entstehung von AML spielt genomische Instabilität eine Rolle (Bret et al., 2016).

Deshalb wurde zunächst untersucht, ob eine erhöhte genomische Instabilität eine Erklärung für die AML-prädisponierende Funktion der *GFI1*-Variante *GFI1-36N* sein könnte. Hierfür wurden als Erstes die Karyotypen von MDS/AML-Patienten mit *GFI1-36S*- und *GFI1-36N*-Genotyp verglichen. Dabei zeigte sich, dass die *GFI1-36N*-Variante mit einer erhöhten Anzahl an chromosomalen Aberrationen einhergeht, was möglicherweise wiederum auf eine erhöhte genomische Instabilität zurückzuführen ist. Um diese Ergebnisse in murinen Zellen zu bestätigen, wurden *GFI1-36S*- und *GFI1-36N*-leukämische Zellen mittels RNA-Sequenzierung untersucht und die Anzahl an Variationen (wie Deletionen, Insertionen) analysiert. Die RNA-Sequenzierungsergebnisse zeigten, dass mehr genetische Veränderungen in den *GFI1-36N-MLL-AF9*- als auch in *GFI1-KD-MLL-AF9*-Knochenmarkszellen gegenüber den *GFI1-36S*-leukämischen Knochenmarkszellen vorhanden waren. Außerdem fand in den *GFI1-36N*- und *GFI1-KD*-leukämischen Zellen eine Anhäufung an Missense-Mutationen statt. Somit gab es bei *GFI1-36N*-Patienten mehr chromosomale Veränderungen und bei *GFI1-36N*-leukämischen Mäusen mehr genetische Veränderungen. In der Summe sind die *GFI1-36N*-Zellen prädisponiert gegenüber der Anreicherung von genetischen Veränderungen und die Ergebnisse deuten auf eine höhere genomische Instabilität in *GFI1-36N*-leukämischen Zellen hin. Die mFISH-Untersuchungen und Array-CGH-Ergebnisse zur Untersuchung von Aberrationen ergaben jedoch keine signifikanten Ergebnisse, dass murine *GFI1-36N*- oder *GFI1-KD*-leukämische Zellen mehr Veränderungen bzw. chromosomale Aberrationen haben. Diese Abweichung gegenüber den humanen Daten könnte daher kommen, dass das verwendete *MLL-AF9*-Fusionsgen ein eher „starkes“ Onkogen ist (Stavropoulou et al., 2016). Durch die Transplantation von *in vivo* generierten leukämischen Zellen, welche das *MLL-AF9*-Onkofusionsprotein exprimieren schreitet die AML-Entwicklung schneller voran als bei AML-Patienten. Die Mäuse erkrankten bereits nach ca. 3-4 Wochen an AML und waren nicht abhängig von weiteren Veränderungen. Diese schnelle AML-Entwicklung hängt somit nicht von der Präsenz weiterer Translokationen ab.

Außerdem wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass in *GFI1-36N*-Thymozyten die DNA-Schäden, gemessen als Zahl der γ H2AX-Foci oder mithilfe des Comet-Assay, nach Bestrahlung signifikant höher waren als in *GFI1-36S*-Thymozyten. Das könnte auf eine offenere Chromatinstruktur (Euchromatin) zurückzuführen sein. Offenere Chromatinstrukturen sind zugänglicher und dadurch anfälliger für exogene und endogene DNA-Schäden (Takata et al., 2013; Nair et al., 2017; Tubbs and

Nussenzweig, 2017). Es wurde bereits publiziert, dass *GFI1-36N*-Zellen genomweite epigenetische Veränderungen aufweisen. Die *GFI1-36N*-Zellen besitzen auf Grund der verminderten Bindung von GFI1-36N an die regulatorischen Strukturen der Zielgene, mehr H3K9-Acetylierung und H3K4-Dimethylierungen (Khandanpour et al., 2012; Botezatu et al., 2016b). Beides sind Marker für eine aktive Transkription und machen die DNA somit zugänglicher bzw. resultieren in offenen Chromatinstrukturen (Barski et al., 2007; Khandanpour et al., 2012; Botezatu et al., 2016b; Nair et al., 2017). Die offenere Chromatinstruktur in den *GFI1-36N*-Zellen gegenüber den *GFI1-36S*-Zellen könnte eine Erklärung für den höheren DNA-Schaden nach Behandlung mit dem gleichen Agens sein.

Somit geht aus den oben beschriebenen Versuchen hervor, dass die *GFI1-36N*-leukämischen Zellen anfälliger gegenüber DNA-Schäden sind, und in diesen Zellen vermehrt genetische Veränderungen auftreten.

Es wurde weiterhin beschrieben, dass eine erhöhte genomische Instabilität bzw. eine erhöhte Anzahl an genetischen Veränderungen oft durch Veränderungen von DNA-Reparaturgenen und die dadurch resultierende veränderte Schadensreparatur entsteht (Negrini et al., 2010; Bret et al., 2016; Tubbs and Nussenzweig, 2017). Außerdem wurde bereits publiziert, dass der GFI1-KD oder -KO die DNA-Reparatur vermindert (Vadnais et al., 2018). GFI1 ermöglicht die Bindung und Methylierung von MRE11 und 53BP1 durch PRMT1. Durch niedrigere GFI1-Level kommt es, vermutlich auf Grund der verringerten Bildung dieser Komplex, zu einer verminderten HR (Vadnais et al., 2018). GFI1 spielt demnach eine Rolle bei der DSB-Reparatur und die höhere Anzahl an genetischen Veränderungen in *GFI1-KD*- und vor allem in *GFI1-36N*-leukämischen Zellen könnte, neben der offeneren Chromatinstruktur, durch eine verringerte DNA-Reparatur entstehen. Die offenen Strukturen sind, wie oben erwähnt, anfälliger gegenüber DNA-Schadensereignissen (Takata et al., 2013; Nair et al., 2017; Tubbs and Nussenzweig, 2017). Die *GFI1-36N*-Thymozyten waren dennoch in der Lage, den hohen DNA-Schaden nach der Bestrahlung zu reparieren. Die *GFI1-36N*-nicht leukämischen Zellen zeigten eine höhere HR-Rate sowie eine Anreicherung der Gen-Sets „Hallmark_UV_Response_DN“ und „Hallmark_G2M_Checkpoints“ gegenüber den *GFI1-36S*-nicht leukämischen Zellen, welche mittels GSEA gefunden wurden. Dagegen zeigten leukämische Knochenmarkzellen mit *GFI1-36N*-Genotyp auf molekularer Ebene eine „Herunterregulierung“ von DNA-Reparatur-Gen-Sets („Hallmark_DNA_Repair“ „Hallmark_UV_Response_UP“), Veränderungen in der

Expression von DNA-Reparaturgenen sowie auf Proteinebene Veränderungen von DNA-Reparaturproteinen. Auf funktioneller Ebene konnte gezeigt werden, dass die *GFI1-36N*-leukämischen Zellen eine verminderte HR-Rate haben. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die *GFI1-36N*-leukämischen Zellen eine veränderte DNA-Reparatur gegenüber *GFI1-36S*-leukämischen Zellen und nicht leukämischen Zellen besitzen. Da die *GFI1-36N*-nicht leukämischen Zellen durch die vermehrte H3K9-Acetylierung und die damit einhergehende, offenere Chromatinstruktur einen höheren DNA-Schaden nach der Bestrahlung aufwiesen, wird vermutet, dass der DNA-Schaden in den *GFI1-36N*-leukämischen Zellen auch höher ist als in den *GFI1-36S*-leukämischen Zellen. Der mögliche höhere DNA-Schaden in den *GFI1-36N*-leukämischen Zellen wird somit auf Grund der offeneren Chromatinstruktur und die dadurch entstehende Anfälligkeit gegen DNA-Schadensereignissen vermutet (Botezatu et al., 2016b; Nair et al., 2017). Hierzu müssen aber weitere Versuche durchgeführt werden. Sollte dies in weiteren Untersuchungen bestätigt werden, würde es bedeuten, dass die *GFI1-36N*-leukämischen Zellen anfälliger gegenüber DNA-Schäden sind und zusätzlich eine verminderte DNA-Reparatur aufweisen. Die verminderte DNA-Reparatur auf der einen Seite im Zusammenspiel mit dem höheren DNA-Schaden auf der anderen Seite, könnte die Ursache für die detektierte erhöhte Anzahl an genetischen Veränderungen der *GFI1-36N*-leukämischen Zellen sein (Abb. 73).

Ein weiterer Grund für die Anhäufung von DNA-Schäden könnte die erhöhte Proliferation mit einer geringeren DNA-Schadenskontrolle während der Zellzyklus-Kontrollpunkten in *GFI1-36N*-leukämischen Zellen sein. Der Zellzyklus und die damit verbundene DNA-Reparatur werden durch das Zusammenspiel von vielen unterschiedlichen Faktoren und Enzymen kontrolliert. Kommt es zu einem Ungleichgewicht dieser Zellzyklusregulatoren oder Mutationen eines der regulatorischen Mechanismen, kann dies schwerwiegende Folgen haben (Kastan and Bartek, 2004; Wenzel and Singh, 2018). Die vorliegende Arbeit liefert erste Hinweise, dass es in *GFI1-36N*-leukämischen Zellen zu Veränderungen der Zellzykluskontrolle kommt. Jedoch müssen weitere Untersuchungen, wie Western Blot-Analysen, durchgeführt werden, um dies zu bestätigen. Es konnte gezeigt werden, dass in nicht malignen *GFI1-36N*-Zellen die Gen-Sets „Hallmark_G2M_Checkpoint“ sowie „Hallmark_E2F-Targets“ angereichert waren. Der G2M-Kontrollpunkt wird auch Schadenskontrollpunkt genannt, da der Zellzyklus bei vorhandenem Schaden an dieser Stelle pausiert wird, bis der DNA-Schaden behoben ist (Dasika et al., 1999;

Kastan and Bartek, 2004; Willis and Rhind, 2009). Die E2F-Transkriptionsfaktoren spielen beim Übergang der G1- in die S-Phase eine Rolle (Bertoli et al., 2013). Auch an dieser Stelle wird die DNA auf mögliche Schäden überprüft (Dasika et al., 1999; Kastan and Bartek, 2004; Bertoli et al., 2013). Dass die zwei Gen-Sets, welche eine Rolle bei der Zellzyklusprogression spielen in *GFI1-36N*-nicht leukämischen Zellen angereichert waren, könnte aus dem höheren DNA-Schaden, welcher vermutlich durch die offene Chromatinstruktur in den *GFI1-36N*-Zellen kommt, resultieren. Durch die Anfälligkeit gegenüber DNA-Schadensereignissen muss der Zellzyklus öfter pausiert werden, um die vorhandenen DNA-Schäden zu reparieren. Eine Hypothese für die detektierten Unterschiede zwischen den *GFI1-36N*-malignen und -nicht malignen Zellen wäre demnach, dass die *GFI1-36N*-nicht malignen Zellen im Gegensatz zu den *GFI1-36N*-malignen Zellen in der Lage sind, den DNA-Schaden zu erkennen und das Fortschreiten des Zellzyklus unterbinden, solange bis die DNA repariert ist. Denn im Gegensatz zu den *GFI1-36N*-nicht leukämischen Zellen wurde bei der GSEA der *GFI1-36N*-leukämischen Zellen eine Herunterregulierung der Gene, des Gen-Set „Hallmark_E2F_Targets“ detektiert. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass in den *GFI1-36N*-leukämischen Zellen das Voranschreiten der G1- zur S-Phase bei möglichen DNA-Schäden nicht gestoppt wird. Dadurch werden die vorhandenen DNA-Schäden an dieser Stelle des Zellzyklus nicht repariert. In der S-Phase des Zellzyklus findet die DNA-Replikation statt (Takeda and Dutta, 2005; Willis and Rhind, 2009; Wenzel and Singh, 2018). Wenn der DNA-Schaden vor der S-Phase nicht repariert wird, kann es bei der Replikation der DNA zu Fehler kommen (Takeda and Dutta, 2005; Bertoli et al., 2013). Die möglichen verringerten „E2F-Targets“ in den *GFI1-36N*-leukämischen Zellen könnten somit ein Grund für die Akkumulation von Veränderungen sein (Abb. 73). Zur Überprüfung dieser Theorie sollten in weiteren Versuchen die E2F-Targets sowie die E2F-Proteine untersucht werden. Die mögliche verminderte Zellzyklus-Kontrolle an den Kontrollpunkten könnte auch die höhere Proliferation der *GFI1-36N*-leukämischen Zellen erklären, welche bei der Kultivierung der Zellen und bei den CFU-Assays teilweise festgestellt wurde. Außerdem zeigten auch die *GFI1*-KD-Zellen eine höhere Proliferation gegenüber Zellen mit normalem *GFI1*-Level. Es wurde bereits gezeigt, dass sich unter den *Gfi1*-Zielgenen Zellzyklusregulatoren wie z.B., E2F-Proteine und c-Myc befinden. *Gfi1* reprimiert die Expression dieser Zellzyklusregulatoren (Duan and Horwitz, 2003a, 2003b). Durch die verringerten *GFI1*-Level bzw. Präsenz der *GFI1-36N*-Variante könnte es auf Grund von verringerten Bindungen bzw. weniger stabilen Bindungen an den regulatorischen

Strukturen der *GFI1*-Zielgene zu einer geringeren Regulation derer Expression kommen. Der dadurch entstehende Überschuss an Proteinen der Zellzykluskontrolle bzw. das entstehende Ungleichgewicht von Zellzyklusregulatoren könnte die Zellen zur Proliferation bzw. Zellzyklusprogression, unabhängig von vorhandenen DNA-Schäden, antreiben (Abb. 73). Um diese Theorie zu überprüfen, sollten weitere Versuche durchgeführt werden. Auf der einen Seite könnten die in der Arbeit gemessenen veränderten E2F-Targets, wie Cdk1, Cdk4 oder Cdkn2c (p18) sowie die E2F-Protein oder andere Zellzyklusproteine, welche in den *GFI1-36N*-leukämischen Zellen verändert waren wie *Ndr1* oder *Dna2* mittels RT-PCR und Western Blot näher untersucht werden.

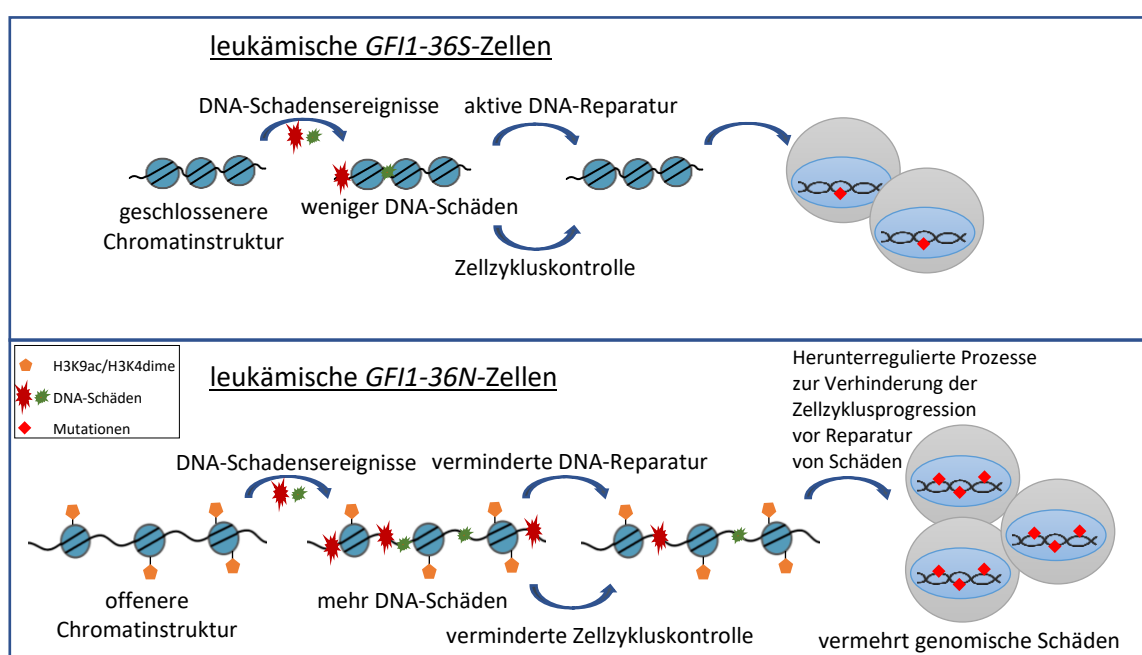


Abbildung 73: Überblick zur Entstehung der genomischen Schäden in den *GFI1-36N*-leukämischen Zellen

Die *GFI1-36N*-leukämischen Zellen haben eine offenere Chromatinstruktur, und dadurch ist die DNA anfälliger gegenüber Schadensereignissen. Durch eine verminderte DNA-Reparatur werden die DNA-Schäden nicht oder nur kaum repariert. Eine verminderte Zellzykluskontrolle könnte außerdem dazu führen, dass keine Zellzykluspause zur Reparatur von Schäden stattfindet und *GFI1-36N*-leukämische Zellen mit DNA-Schäden weiter proliferieren. Dadurch kommt es zur Anhäufung von Veränderungen/Mutationen bzw. zu vermehrten genomischen Schäden in den *GFI1-36N*-leukämischen Zellen.

5.2 Veränderte DNA-Reparatur in *GFI1-36N*- und *GFI1-KD*-leukämischen Zellen

Es konnte gezeigt werden, dass die *GFI1-36N*-leukämischen Zellen mehr genetische Veränderungen aufweisen als die *GFI1-36S*-leukämischen und nicht leukämischen Zellen. Wie bereits erwähnt, kommt in vielen malignen Erkrankungen die genomische Instabilität durch Mutationen in DNA-Reparaturgenen oder durch eine veränderte Expression dieser Proteine, wodurch die DNA-Reparatur beeinträchtigt wird (Richardson et al., 2004; Negrini et al., 2010; Pitroda et al., 2014; Bret et al., 2016; Tubbs and Nussenzweig, 2017). Durch die Beeinträchtigung der DNA-Reparatur kommt es zu Anhäufungen von Mutationen, welche zur malignen Transformation der Zellen führen können (Kastan and Bartek, 2004; Tubbs and Nussenzweig, 2017). Untersuchungen der DNA-Reparatur wurden zunächst modelhaft mittels RNA-Sequenzierungen mit murinen *GFI1-36S*-, *GFI1-36N*- und *GFI1-KD*-leukämischen Zellen durchgeführt. Die daraus resultierenden GSEA-Ergebnisse zeigten, dass in *GFI1-36N*- und *GFI1-KD*-leukämischen Zellen Gen-Sets der DNA-Reparatur, im Vergleich zu den *GFI1-36S*-leukämischen Zellen, herunterreguliert waren. Bei der genaueren Untersuchung der veränderten DNA-Reparatur wurde gezeigt, dass die Expression und das Level vieler DNA-Reparaturproteine in *GFI1-36N*- gegenüber *GFI1-36S*-leukämischen Zellen verändert war. Bei der Untersuchung der DEG wurden einige Überschneidungen zwischen den *GFI1-KD*-leukämischen- und *GFI1-36N*-leukämischen Zellen gefunden. Diese Überschneidungen deuten auf einen gemeinsamen Grund für die veränderte DNA-Reparatur in den malignen *GFI1-36N*- und *GFI1-KD*-Zellen hin. Eine Erklärung könnte sein, dass die murinen *GFI1-36N*-leukämischen Zellen eine verminderte Bindung von Prmt1 mit den DNA-Reparaturproteinen Mre11 und 53bp1 haben. Es wurde bereits publiziert, dass GFI1 in humanen Zellen bei der Bindung von PRMT1 mit MRE11 und 53BP1 eine Rolle spielt (Vadnais et al., 2018). Naheliegend wäre somit, dass GFI1-36N die Bindung zwischen PRMT1 mit MRE11 und 53BP1 nicht erfolgreich stabilisieren bzw. gewährleisten kann. Jedoch wurde auf der anderen Seite publiziert, dass bereits die nicht leukämischen *GFI1-KD*- bzw. KO-Zellen eine verminderte DNA-Reparatur haben (Vadnais et al., 2018). Die *GFI1-36N*-nicht leukämischen Zellen hatten dagegen eine hohe HR-Rate und konnten den DNA-Schaden nach Bestrahlung reparieren. Das deutet darauf hin, dass die Bindungen von Prmt1 mit den beiden DNA-Reparaturproteinen Mre11 und 53bp1 in den murinen *GFI1-36N*-nicht leukämischen Zellen möglich ist. Ob die verminderte HR in den *GFI1-36N*-leukämischen Zellen auf

Grund, der nicht mehr vorhandenen Bindung von Prmt1 mit den anderen beiden Reparaturproteinen kommt, müsste verifiziert werden.

Bei den Ergebnissen der Arbeit kommt eine weitere Frage auf: Woher kommt der Unterschied zwischen den *GFI1-36N*-nicht leukämischen und den *GFI1-36N*-leukämischen Zellen im Hinblick auf die DNA-Reparatur. In den nicht leukämischen Zellen scheint die DNA-Reparatur trotz des hohen DNA-Schadens zu funktionieren; jedoch verändert sich dies in den leukämischen Zellen. Ein Grund hierfür könnte die oben beschriebene, veränderte Zellzykluskontrolle in den *GFI1-36N*-leukämischen Zellen sein. Das jedoch nur die *GFI1-36N*-leukämischen Zellen so einen großen Unterschied gegenüber den *GFI1-36N*-nicht leukämischen Zellen aufwiesen und nicht die *GFI1-36S*-Zellen, könnte daran liegen, dass bestimmte Signalkaskaden in *GFI1-36N*-malignen Zellen verändert sind, welche dann die DNA-Reparatur oder die Zellzykluskontrolle beeinflussen. Es wäre möglich, dass es in den *GFI1-36N*- und auch in den *GFI1-KD*-leukämischen Zellen zu einer veränderten Protein-Regulation kommt, welche in malignen Zellen durch niedrige GFI1-Level bzw. durch die Präsenz von GFI1-36N entstehen könnte. Erste Hinweise, dass es möglicherweise zu Veränderungen des p53-Signalweges kommt, lieferten die in dieser Arbeit durchgeführten GSEA. Die GSEA zeigte, dass Gene, deren Produkte bei den p53-Signalwegen eine Rolle spielen, signifikant in den *GFI1-36N*- und *GFI1-KD*-leukämischen Zellen herunterreguliert waren. In der Arbeit von Vadnais und Kollegen wurde beschrieben, dass GFI1 p53 durch die Rekrutierung von LSD1 und die dadurch entstehende Demethylierung reguliert (Vadnais et al., 2019). Es wäre denkbar, dass durch die Präsenz von GFI1-36N oder durch den KD von GFI1 p53 nicht mehr von GFI1 reguliert werden kann. Durch die verminderte Regulierung von p53 in den *GFI1-36N*- und *GFI1-KD*-leukämischen Zellen könnte es dadurch zu Veränderungen der p53-Signalwege kommen. Mutationen von *TP53* werden vor allem mit der Entstehung von soliden Tumoren in Zusammenhang gebracht. Verschiedene Dysfunktionen von p53 und dessen Signalwegen spielen aber auch bei der AML eine Rolle (Prokocimer et al., 2017; Dutta et al., 2020). Zudem ist p53 ein zentraler Faktor bei der DNA-Schadensantwort (Williams and Schumacher, 2016; Kasthuber and Lowe, 2017) und die Veränderung der p53-Aktivität und die daraus resultierenden Veränderungen der p53-Signalwege in *GFI1-36N*- und *GFI1-KD*-leukämischen Zellen gegenüber *GFI1-36S*-leukämischen Zellen, könnte die breitgefächerten Auswirkungen von vor allem *GFI1-36N* auf die DNA-Reparatur/-Schadensantwort erklären. Die vorliegende Arbeit lieferte erste Hinweise für diese Theorie, jedoch müssen noch weitere

Untersuchungen zur p53-Aktivität und den p53-Signalwegen in den unterschiedlichen *GFI1*-Genotypen durchgeführt werden.

Eine weitere Möglichkeit für die veränderte DNA-Reparatur in den *GFI1-36N*- und *GFI1-KD*-leukämischen Zellen sind metabolische Veränderungen in diesen Zellen. Unsere Arbeitsgruppe hat unveröffentlichte Daten, dass GFI1 beim Metabolismus eine Rolle spielt. Niedrige GFI1-Level zeigten Auswirkungen auf den Metabolismus der Zellen. In den letzten Jahren wurde immer deutlicher, dass Veränderungen in der DNA-Reparatur auch Auswirkungen auf den Metabolismus haben und andersherum (Turgeon et al., 2018). Es wurde zum Beispiel publiziert, dass ein erhöhtes Level der Onkometabolite Fumarat, Succinat sowie 2-Hydroxyglutarat die DNA-Reparatur, genauer die HR, durch abnormale H3K9-Trimethylierung unterdrückt. Das erhöhte Level der Onkometabolite kommt z.B. durch Mutationen der Isocitrat-Dehydrogenasen (IDH1, IDH2) oder anderen Enzymen, welche eine Rolle beim Metabolismus spielen (Sulkowski et al., 2020). Somit könnten veränderte metabolische Prozesse in den Zellen eine weitere Erklärung für die verminderte DNA-Reparatur liefern. Hierzu sollten jedoch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

5.3 Niedrigeres Mgmt-Level und damit einhergehende verminderte Mgmt-vermittelte Reparatur in *GFI1-36N*-leukämischen Zellen

Unter den DNA-Reparaturproteinen, welche in murinen *GFI1-36N*-leukämischen Zellen signifikant niedrigere Level hatten, wurde Mgmt gefunden. MGMT ist ein Reparaturprotein, welches O6-MeG-Läsionen repariert. Diese mutagene und krebserregende Läsion hat schwerwiegende Folgen für die Zellen (Kaina et al., 2007; Zhang et al., 2012). Deshalb ist eine intakte Mgmt-vermittelte DNA-Reparatur für die Zellen wichtig. Auf funktioneller Ebene konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, dass Mgmt in den murinen *GFI1-36N*-leukämischen Zellen weniger vorhanden bzw. weniger aktiv war als in den *GFI1-36S*-leukämischen Zellen. Das detektierte geringere Mgmt-Proteinlevel in *GFI1-36N*-leukämischen Zellen liefert eine Erklärung für die detektierte niedrigere Mgmt-vermittelte Reparatur in den *GFI1-36N*-leukämischen Zellen. Außerdem war in den *GFI1-36N*-leukämischen Zellen das ubiquitinierte und somit inaktive Mgmt-Level höher als in den *GFI1-36S*-leukämischen Zellen. Eine wichtige Eigenschaft von MGMT ist, dass jedes Molekül nur eine O6-MeG-Läsion reparieren kann. Danach wird es ubiquitiniert und von der Zelle mittels Proteasom abgebaut. Nachdem das MGMT-Protein die Läsion repariert hat und ubiquitiniert wurde, kann MGMT nicht mehr aktiviert werden. Die Anzahl an Läsionen,

welche von MGMT repariert werden kann, hängt somit von der Anzahl an MGMT-Molekülen in der Zelle ab (Srivenugopal et al., 1996; Xu-Welliver and Pegg, 2002; Liu and Gerson, 2006; Silber et al., 2012; Hsu et al., 2018). Es wäre somit denkbar, dass das detektierte, höhere inaktive Mgmt-Level in den murinen *GF11-36N*-leukämischen Zellen auf Grund einer erhöhten Anzahl an O6-MeG-Läsionen entsteht. Das könnte bedeuten, dass die *GF11-36N*-leukämischen Zellen mehr O6-MeG-Läsionen besitzen bzw. anfälliger für O6-MeG-Läsionen sind als die *GF11-36S*-leukämischen Zellen und somit mehr Mgmt von den Zellen benötigt wird.

Im Gegensatz zu den leukämischen Zellen konnte in den *GF11-36N*-nicht leukämischen Zellen kein Unterschied in der Funktionalität von Mgmt sowie dem Mgmt-Level gegenüber den *GF11-36S*-nicht leukämischen Zellen festgestellt werden. Somit war, wie auch bei der HR, bei der Mgmt-vermittelten Reparatur der Unterschied zwischen den *GF11*-Genotypen nur in den leukämischen, nicht aber in den nicht leukämischen Zellen zu sehen.

In vielen Veröffentlichungen wurde gezeigt, dass das MGMT-Level in Zellen vom Methylierungsstatus des *MGMT*-Promotors abhängt. Methylierungen des *MGMT*-Promotors führen zu niedrigeren MGMT-Proteinlevel und *vice versa* (Watts et al., 1997; Esteller et al., 1999; Hegi et al., 2008). Deshalb wurde der Methylierungsstatus des *Mgmt*-Promotors in verschiedenen murinen *GF11-36N*- und *GF11-36S*-Zellen überprüft. Hier gab es keinen Hinweis auf eine unterschiedliche Methylierung in den *GF11-36N*- gegenüber den *GF11-36S*-Zellen. Auf Grund dessen kann ausgeschlossen werden, dass die unterschiedlichen Mgmt-Level in den murinen *GF11-36S*- und *GF11-36N*-leukämischen Zellen mit dem Methylierungsstatus des *Mgmt*-Promotors zusammenhängen. Vadnais und Kollegen zeigten, dass GF11 nicht nur an regulatorische DNA-Sequenzen der Zielgene bindet, sondern auch direkt über Protein-Protein-Interaktion die Aktivität und Bindung von Proteinen reguliert (Vadnais et al., 2018; Vadnais et al., 2019; Möröy and Khandanpour, 2019). Deshalb wurde mittels Co-IP untersucht, ob es in humanen leukämischen Zellen (THP-1-Zellen) eine direkte Protein-Protein-Bindung zwischen GF11 und MGMT gibt. Eine direkte Interaktion der beiden Proteine konnte ausgeschlossen werden. Auf Grund der fehlenden Unterschiede in der *Mgmt*-Promotor-Methylierung und der nicht vorhandenen Protein-Protein-Bindung zwischen GF11 und MGMT kann davon ausgegangen werden, dass GF11 das MGMT-Level indirekt über andere Proteine beeinflusst. Für die indirekte

Mgmt-Regulierung in murinen Zellen gibt es auf Grund von kontroversen *Mgmt*-Expressionsdaten zwei Theorien.

Eine Hypothese wäre, dass GF11 direkt oder indirekt auch die *Mgmt*-Expression beeinflusst. Die verminderte *Mgmt*-Expression kann trotz fehlender Unterschiede in der *Mgmt*-Promotor-Methylierung ein Grund für veränderte *Mgmt*-Expressionslevel sein. Es gibt erste Studien, die zeigen, dass es neben der Promotor-Methylierung noch weitere Methylierungen bzw. Mechanismen zur Regulation der *Mgmt*-Expression geben muss (Bhakat and Mitra, 2003; Brell et al., 2005). Ein möglicher Mechanismus, wie GF11 indirekt die *Mgmt*-Expression beeinflusst könnte sein, dass GF11 die *Mgmt*-Expression indirekt über die Regulation des p53-Proteins steuert. Neueste Untersuchungen deuten darauf hin, dass GF11 eine Rolle bei der posttranslationalen Modifikation von p53 in T-Zellen spielt (Vadnais et al., 2019). GF11 rekrutiert LSD1 zu p53 und dadurch wird die C-terminale Domäne von p53 demethyliert und dies führt zu verringerter Acetylierung von Lysin 117. Durch die Rekrutierung von LSD1 zu p53 und der dadurch verringerten Lysin-Methylierungen ist p53 weniger aktiv. Die Bindung zwischen GF11 und p53 wird durch die intermediäre Domäne von GF11 gewährleistet (Möröy and Khandanpour, 2019; Vadnais et al., 2019). Bei GF11-36N ist die intermediäre Domäne durch den Austausch von Serin zu Asparagin an Position 36 verändert (Khandanpour et al., 2010; Möröy and Khandanpour, 2019). Die Veränderung in GF11 könnte zu einer verringerten oder instabilen Bindung des GF11-36N-Proteins an p53 führen. Dies hätte zur Folge, dass GF11-36N die p53-Aktivität nicht regulieren kann und dadurch mehr aktives p53 in den Zellen vorhanden ist. Das p53-Level korreliert mit der *MGMT*-Expression. Dabei unterdrückt p53 die basale *MGMT*-Expression und eine Überexpression von p53 führt zu niedrigen *MGMT*-Level (Hengstler et al., 1999; Bocangel et al., 2009). Demzufolge wäre es denkbar, dass durch die geringe p53 Bindungskapazität von GF11-36N p53 nicht reguliert werden kann, was wiederum die niedrigeren *Mgmt*-Level in den *GF11-36N*-leukämischen Zellen erklären würde.

Ein zweiter Erklärungsansatz wäre, dass GF11 indirekt das *Mgmt*-Proteinlevel beeinflusst. Für diese Theorie liefert die vorliegende Arbeit Hinweise auf einen möglichen Mechanismus, bei welchem GF11 das *Mgmt*-Proteinlevel über eine direkte Regulation von *Ndr1* beeinflusst (Abb. 74). Mithilfe der Proteomik-Analysen und RNA-Sequenzierungen wurde gezeigt, dass *Ndr1* in *GF11-36N*-leukämischen Zellen sowohl auf Protein- als auch auf Genexpressionslevel, gegenüber den *GF11-36S*-

leukämischen Zellen, herunterreguliert war. Außerdem konnte *NdrG1* bei den Reanalysen von verfügbaren Gfi1-ChIP-Sequenzierungs-Ergebnissen als mögliches Gfi1-Zielgen identifiziert werden. In drei von vier publizierten Gfi1-ChIP-Sequenzierungs-Ergebnissen wurden mögliche Gfi1-Bindestellen in der Promotor und/oder Enhancer Region von *NdrG1* gefunden. NDRG1 ist ein Protein, das bei einer Vielzahl von physiologischen Prozessen, wie dem Zellzyklus, der zellulären Differenzierung sowie bei der Schadensantwort, eine Rolle spielt (Tschan et al., 2010; Bae et al., 2013; Chang et al., 2014). Gezeigt wurde, dass die *NDRG1*-Expression in einer Vielzahl von malignen Erkrankungen, wie Brustkrebs, Magenkrebs und auch in AML-Zellen herunterreguliert ist (Bandyopadhyay et al., 2004; Tschan et al., 2010; Bae et al., 2013; Chang et al., 2014). Außerdem wurde beschrieben, dass die Überexpression von *NDRG1* das Tumorwachstum und die Metastasierung unterdrückt (Akiba et al., 2011; Chang et al., 2014). Im Jahr 2014 wurde publiziert, dass NDRG1 einen Einfluss auf die MGMT-vermittelte Reparatur hat. NDRG1 spielt durch direkte Protein-Protein-Wechselwirkung vermutlich eine Rolle bei der Stabilisierung/Aktivierung von MGMT. Dadurch nimmt NDRG1 auch einen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber TMZ (Weiler et al., 2014). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Proteomik-Versuche sowie RNA-Sequenzierungen lieferten mehrere Hinweise, dass *NdrG1* eine Rolle bei der Sensitivität der *GFI1-36N*-leukämischen Zellen gegenüber TMZ spielt. In den mit TMZ behandelten *GFI1-36S*-leukämischen Zellen war die *NdrG1*-Expression gegenüber *GFI1-36S*-leukämischen Zellen ohne TMZ-Behandlung erhöht. Die erhöhte *NdrG1*-Expression nach der Behandlung mit TMZ könnte daher kommen, dass Mgmt durch die Induktion von O6-MeG-Läsionen durch TMZ vermehrt gebraucht wird. Da Mgmt durch *NdrG1* stabilisiert/aktiviert wird, wäre es denkbar, dass bei hohem O6-MeG-Schaden auch *NdrG1* höher exprimiert wird. Der Unterschied in der *NdrG1*-Expression vor und nach der Behandlung mit TMZ konnte dagegen in den *GFI1-36N*-leukämischen Zellen nicht detektiert werden. Dies könnte bedeuten, dass durch die Induktion von O6-MeG-Läsionen die *NdrG1*-Expression in den *GFI1-36N*-leukämischen nicht ansteigt und dadurch Mgmt, trotz der erhöhten O6-MeG-Läsionen nicht vermehrt stabilisiert/aktiviert werden kann. Somit liefern diese Ergebnisse einen Hinweis, dass das niedrigere *NdrG1*-Level in den *GFI1-36N*-leukämischen Zellen für das niedrigere Mgmt-Level verantwortlich sein könnte. Des Weiteren gab es, wie auch bei der *Mgmt*-Expression und dem Mgmt-Proteinlevel, keinen Unterschied der *NdrG1*-Expression zwischen *GFI1-36N*- und *GFI1-36S*-nicht leukämischen Zellen. Somit war der Unterschied in der *NdrG1*-

Expression, wie auch bei Mgmt, nur in den *GF11-36N*-leukämischen Zellen und nicht in den *GF11-36N*-nicht leukämischen Zellen detektierbar. Dies deutet erneut darauf hin, dass *NdrG1* das Mgmt-Level beeinflusst. Die Proteomik-Daten lieferten einen weiteren Hinweis darauf, dass *NdrG1* für das niedrigere Mgmt-Level in den *GF11-36N*-leukämischen Zellen verantwortlich sein könnte. Neben MGMT bindet NDRG1 auch an zwei weitere DNA-Reparaturproteine: APEX1 und PNKP (Weiler et al., 2014). APEX1 spielt eine zentrale Rolle bei der BER (Doetsch and Cunningham, 1990; Chatterjee and Walker, 2017) und PNKP spielt sowohl eine Rolle bei der BER und der Reparatur von SSB als auch bei dem NHEJ (Shimada et al., 2015; Chatterjee and Walker, 2017). Veränderungen von *PNKP* gehen deshalb mit einer defekten DNA-Reparatur einher (Shen et al., 2010; Shimada et al., 2015). Beide *Apex1* und *Pnkp* waren bei den Proteomik-Analysen in murinen *GF11-36N*-leukämischen Zellen (wie auch Mgmt) gegenüber *GF11-36S*-leukämischen Zellen erniedrigt. Dass *NdrG1* auch *Apex1* und *Pnkp* bindet und dadurch möglicherweise auch diese beiden Proteine stabilisiert/aktiviert (Weiler et al., 2014), könnte eine weitere Erklärung für die Veränderungen der DNA-Reparatur in den *GF11-36N*-leukämischen Zellen sein. Es wäre denkbar, dass diese beiden DNA-Reparaturproteine (*Apex1* und *Pnkp*) eine geringe Stabilität bzw. Aktivierung auf Grund des niedrigeren *NdrG1*-Level in *GF11-36N*-leukämischen Zellen haben und es dadurch zu Veränderungen der DNA-Reparatur kommt. *Apex1* spielt eine Rolle bei der BER und es wurde gezeigt, dass geringe *Apex1*-Level u.a. zur Erhöhung von 8-OxoG-Läsionen und zum Verlust von *Ogg1* bzw. zu dessen verringerter Expression führen (Pei et al., 2019). Eine verringerte Expression von *Ogg1* konnte auch in *GF11-36N*-leukämischen Zellen detektiert werden. Dies konnte jedoch auf Proteinebene nicht bestätigt werden.

Auf Grund dessen, dass mehrere ChIP-Sequenzierungs-Datensätze eine mögliche Bindung von *Gfi1* an den *NdrG1*-Promotor und/oder Enhancer zeigten, kommt *NdrG1* als mögliches *Gfi1*-Zielgen in Frage. Dadurch ist folgender Mechanismus, bei welchem *GF11* das Mgmt-Proteinlevel indirekt über die *NdrG1*-Expression beeinflusst, denkbar: Exprimieren Zellen das normale *GF11-36S*-Protein, ist durch die Bindung von *GF11-36S* an die Promotor- und/oder Enhancer-Struktur die Genexpression von *NdrG1* aktiv und somit liegt ein hohes bzw. normales *NdrG1*-Proteinlevel in den Zellen vor. Das führt wiederum zur Stabilisation von Mgmt, *Apex1* und *Pnkp*, wodurch die Reparatur von z.B. O6-MeG-Läsionen durch Mgmt durchgeführt werden kann (Abb. 74). Im Gegensatz hierzu kann *GF11-36N* durch den Austausch von Serin zu Asparagin weniger stabil oder gar nicht an die Promotor-/Enhancer-Sequenz von

Ndrg1 binden. Dadurch kommt es zu einer niedrigeren Genexpression von *Ndrg1* und in Folge zu niedrigerem *Ndrg1*-Proteinlevel. Durch das niedrige *Ndrg1* kann *Mgmt* und die zwei anderen DNA-Reparaturproteine nicht stabilisiert/aktiviert werden. Wodurch es wiederum z.B. zu der detektierten niedrigeren Reparatur der O6-MeG-Läsion durch *Mgmt* kommt (Abb. 74). *GFI1* würde in diesem vorgeschlagenen Modell die *Ndrg1*-Expression aktivieren. In der Literatur wird *GFI1* in den meisten Fällen als Transkriptionsrepressor beschrieben (Möröy et al., 2015; Möröy and Khandanpour, 2019). Jedoch wurde im Jahr 2000 von Rödel und Kollegen gezeigt, dass *Gfi1* die IL-6/STAT3-vermittelte Transkription aktiviert. Dies legt nahe, dass die Repressor- bzw. Aktivator-Funktion von *GFI1* vom zellulären Kontext abhängig ist (Rödel et al., 2000; Duan et al., 2005). Demnach wäre es denkbar, dass *GFI1* die Expression von *Ndrg1* aktiviert.

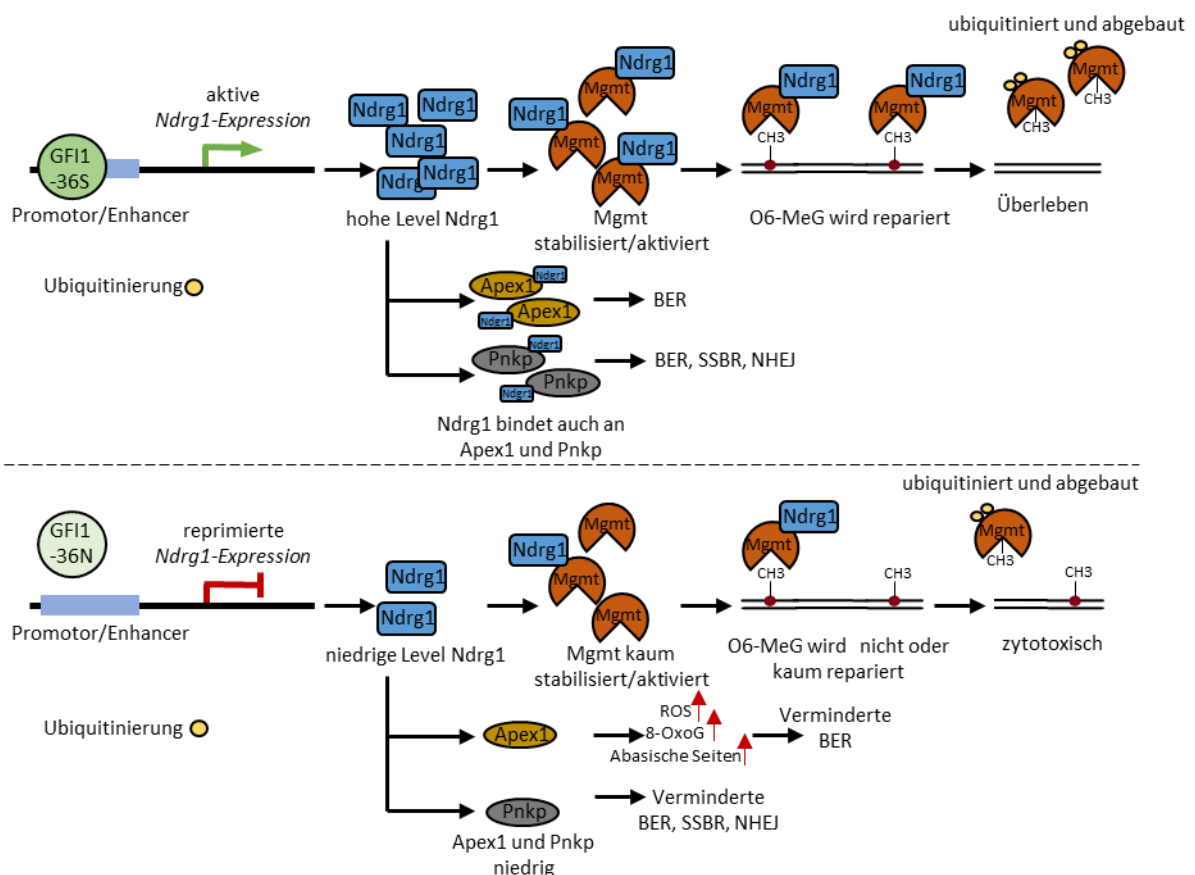


Abbildung 74: Schematische Darstellung der möglichen Rolle von *GFI1* bei der Regulation des *Mgmt*-Levels und dessen Einfluss auf die DNA-Reparatur

Der Mechanismus basiert auf der Annahme, dass *GFI1* die Expression von *Ndrg1* aktiviert. *Ndrg1* wiederum ist für die Stabilisierung/Aktivierung von *Mgmt* verantwortlich. Durch die Stabilisierung/Aktivierung kann *Mgmt* die O6-MeG-Läsionen reparieren und die Zellen überleben. Die *GFI1*-36N-Variante kann dagegen nicht oder weniger stabil an die regulatorischen Zielstrukturen von *Ndrg1* binden und die *Ndrg1*-Expression wird verringert. Durch die niedrigeren *Ndrg1*-Level wird *Mgmt* weniger stabilisiert/aktiviert und die O6-MeG-Läsionen weniger repariert.

Bisher wurde beschrieben, dass u.a. N-Myc, c-Myc, HIF1, p53 und PTEN die Expression von *NdrG1* regulieren (Zhang et al., 2008; Li et al., 2008; Bae et al., 2013; Chang et al., 2014). Durch die hier erzielten Ergebnisse kommt auch GF11 als möglicher Transkriptionsfaktor zur positiven Regulation der *NdrG1*-Expression in Frage. NDRG1 spielt neben weiteren wichtigen physiologischen Prozessen eine Rolle bei der myeloiden Differenzierung, genauer bei der Reifung von Neutrophilen (Chen et al., 2009; Tschan et al., 2010). Somit hätte GF11 ein weiteres Zielgen, neben beispielsweise *Hoxa9*, *Pbx1*, *Meis1*, welches bei der myeloiden Differenzierung eine Rolle spielt (Horman et al., 2009; Phelan et al., 2010; Möröy and Khandanpour, 2019).

In den *GF11*-KD-leukämischen Zellen wurde ebenfalls weniger aktives Mgmt gefunden als in den *GF11-36S*-Zellen. Außerdem reagierten *GF11*-KD-*NUP98-HOXD13*-Zellen sensitiver gegenüber der Behandlung mit TMZ. Dies weist ebenfalls auf eine geringe Aktivität oder ein geringes Mgmt-Level hin. Jedoch gab es bei der *Mgmt*-Expression keinen deutlichen Unterschied zwischen *GF11*-KD- und *GF11-36S*-leukämischen Zellen. Außerdem wurde in den *GF11*-KD-leukämischen Zellen im Unterschied zu den *GF11-36N*-leukämischen Zellen keine von *GF11-36S*-leukämischen Zellen abweichende *NdrG1*-Expression festgestellt. Das deutet darauf hin, dass das vorhandene GF11 genügt, um ausreichend *NdrG1* zu exprimieren. Dennoch muss es einen Grund für das niedrigere aktive Mgmt sowie die höhere Sensitivität der *GF11*-KD-leukämischen Zellen gegen die TMZ-Behandlung geben. Hierzu müssen weitere Versuche durchgeführt werden.

5.4 Die veränderte DNA-Reparatur in den *GF11-36N*-leukämischen Zellen erhöht die Sensitivität gegenüber Temozolomid und Olaparib

In vielen Studien wurde gezeigt, dass die Behandlungseffizienz von TMZ hauptsächlich von der *MGMT*-Expression bzw. vom *MGMT*-Level in den malignen Zellen (darunter auch in AML-Zellen) abhängt. Zellen mit niedrigem *MGMT*-Level haben eine hohe Sensibilität gegenüber TMZ, wohingegen höhere *MGMT*-Level zu einer Resistenz gegenüber TMZ führen (Alvino et al., 2006; Brandwein et al., 2007; Zhang et al., 2010; Zhang et al., 2012). TMZ induziert neben anderen Methylierungsläsionen O6-MeG-Läsionen, welche durch *MGMT* repariert werden (Pegg et al., 1983; Denny et al., 1994; Kaina et al., 2007; Zhang et al., 2012). In der

hier vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass murine *GF11-36N*-leukämische Zellen signifikant niedrigere Mgmt-Proteinlevel sowie eine reduzierte Reparatur von O6-MeG-Läsionen aufweisen gegenüber *GF11-36S*-leukämischen Zellen. Auf Grund von nicht reparierten O6-MeG-Läsionen wird an der Alkylierungsseite anstelle des normalen Cytosin ein Thymin eingebaut (Fehlpaarung: O6-MeG mit Thymin). Das hat wiederum zur Folge, dass die Zellen versuchen, die Fehlpaarung mittels MMR zu reparieren, was aber erfolglos ist, da die Zelle immer wieder Thymin einbaut. Die vergeblichen MMR-Zyklen führen dann zu DNA-Brüchen, welche schlussendlich zum Zelltod führen (Kaina et al., 1997; Pepponi et al., 2003; Liu and Gerson, 2006; Zhang et al., 2012). Der hohe Effekt von TMZ auf die leukämischen *GF11-36N*-murinen und humanen Zellen bedeutet demnach auch, dass diese Zellen eine funktionierende MMR haben. Ansonsten würden die Zellen die Basen-Fehlpaarungen der nicht reparierten O6-MeG-Läsionen tolerieren (Pepponi et al., 2003; Zhang et al., 2012; Stritzelberger et al., 2018) (Abb. 75).

Einen weiteren wesentlichen Beitrag zur Resistenz gegen TMZ spielt neben der MMR eine funktionierende BER; denn neben O6-MeG-Läsionen induziert TMZ auch N7-MeG- und N3-MeA-Läsionen. Diese Läsionen werden durch die BER repariert (Denny et al., 1994; Horton et al., 2003; Zhang et al., 2012; Montaldi et al., 2015) (Abb. 75). Neben vielen anderen Enzymen spielen PARP1 und PARP2 u.a. eine Rolle bei der BER (Lavrik et al., 2001; Parsons et al., 2005; Horton et al., 2014; Ronson et al., 2018). In einigen Studien mit unterschiedlichen malignen Erkrankungen, darunter auch AML, konnte bereits gezeigt werden, dass der Effekt von TMZ durch die zusätzliche Inhibierung der BER durch die Gabe eines PARPi erhöht werden kann (Plummer et al., 2008; Murai et al., 2014; Gojo et al., 2017; Lesueur et al., 2019; van Erp et al., 2020). Durch die Inhibierung von PARP1 tragen dann neben den O6-MeG-Läsionen auch die N7-MeG- sowie N3-MeA-Läsionen zur TMZ-Toxizität bei (Curtin et al., 2004; Zhang et al., 2012). In den *GF11-36N*-leukämischen Zellen konnte genau diesen Effekt detektiert werden. Bereits durch die Kombination von niedrigen TMZ-Konzentrationen (10 µg/ml) mit dem PARPi Olaparib (0,2 µM), wurde der Effekt von TMZ verstärkt. Die *GF11-36S*-leukämischen sowie nicht leukämischen Zellen zeigten bei der Kombination von niedrigen TMZ- und Olaparib-Konzentrationen nahezu keinen Effekt. Dass die *GF11-36N*-leukämischen Zellen sensitiver auf die Kombinationsbehandlung reagierten, kann u.a. dadurch erklärt werden, dass die *GF11-36N*-leukämischen Zellen vermutlich bereits ohne die Gabe von PARPi eine verringerte BER haben. Durch die zusätzliche Gabe von Olaparib wurde dann die

bereits verringerte BER noch weiter beeinträchtigt. Bereits publizierte Daten zeigen, dass PARPi sensitiver auf Zellen mit BER-Defizienz wirken (Horton et al., 2003; Horton et al., 2014). In der Arbeit wurde gezeigt, dass die Level einiger BER-Proteine, wie Apex1, in den murinen *GF11-36N*-leukämischen Zellen niedriger waren (Abb. 75). Es gibt bereits erste Studien, die zeigen, dass niedrige APEX1- (auch APE1-) Level zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber der Behandlung mit TMZ führen (Montaldi et al., 2015). Das niedrige Apex1-Proteinlevel bzw. die vermutlich verminderte BER in den murinen *GF11-36N*-leukämischen Zellen wäre, neben dem geringeren Mgmt-Level, eine weitere Erklärung für die Sensitivität der *GF11-36N*-leukämischen Zellen gegenüber der TMZ-Behandlung.

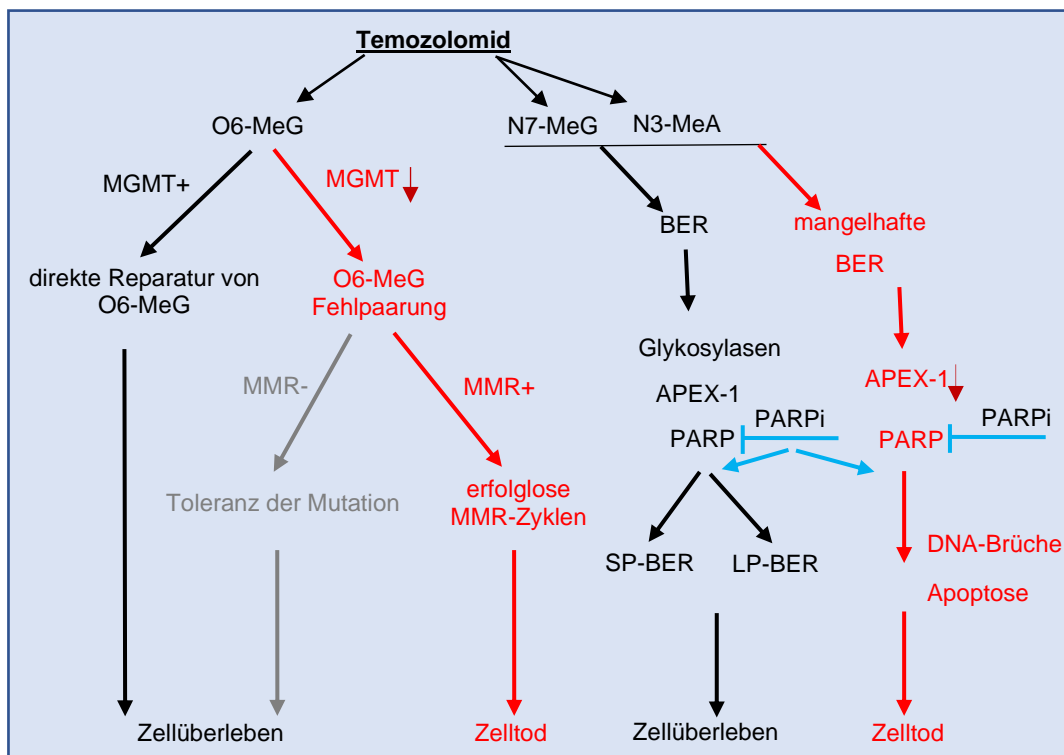


Abbildung 75: Schematische Darstellung des Wirkmechanismus von TMZ und in Kombination mit PARP-Inhibitoren

In rot ist der Wirkmechanismus von TMZ in *GF11-36N*-leukämischen Zellen dargestellt. In Schwarz ist der normale Weg (wie in *GF11-36S*-leukämischen und nicht leukämischen Zellen) zur Reparatur von TMZ-induzierten Schäden dargestellt. Basierend auf: (Liu and Gerson, 2006; Zhang et al., 2012).

Ein Aspekt, der bei späteren *in vivo*-Versuchen beachtet werden sollte, ist die Reaktion von nicht leukämischen Zellen auf hohe Dosierungen von TMZ in Kombination mit Olaparib. Demnach sollten für spätere *in vivo*-Studien niedrige Dosierungen von TMZ und Olaparib verwendet werden, welche aber dennoch einen Effekt auf die *GF11-36N*-leukämischen Zellen zeigten. Es gibt bereits eine Phase I-Studie zur Behandlung von AML-Patienten mit der Kombination aus TMZ und Veliparib (ein weiterer PARPi). Diese Studie wurde mit AML-Patienten, welche eine rezidierte, refraktäre oder durch aggressive myeloide Erkrankungen hervorgerufene AML haben, durchgeführt und lieferte erste Hinweise auf die maximal tolerierte Dosis der Kombinationstherapie (150 mg Veliparib 2x täglich + 200 mg/m² TMZ täglich). Die vollständige Ansprechrate (engl.: *complete response rate*) lag bei 17% (8/48 Patienten) (Gojo et al., 2017). In der vorliegenden Arbeit wurde TMZ anstelle von Veliparib mit Olaparib kombiniert, weil in vorherigen *in vitro*-Versuchen mit malignen Zelllinien bessere Ergebnisse mit der Kombination aus Olaparib und TMZ erzielt werden konnte (Murai et al., 2014). Dadurch könnte auch die Ansprechrate der späteren Therapie höher liegen als in der Studie von Gojo und Kollegen. Die Kombination aus TMZ und Veliparib wurde gut vertragen (Gojo et al., 2017; Singh et al., 2019). Durch die gezielte Behandlung von AML-Patienten mit einem *GF11-36N*-Genotyp könnten noch niedrigere Konzentrationen von Olaparib und TMZ eingesetzt werden und somit das Nebenwirkungsspektrum nochmals verringert werden.

Neben der Kombination mit TMZ zeigte auch Olaparib bei ausreichend hohen Konzentrationen einen höheren Effekt auf das Wachstum der *GF11-36N*-leukämischen Zellen, im Gegensatz zu den *GF11-36S*-leukämischen und den nicht leukämischen Zellen. Eine Erklärung könnte, wie bereits erwähnt, eine Defizienz der BER in den leukämischen *GF11-36N*-Zellen sein, welche durch niedrige BER-assoziierte Proteinlevel wie z.B. Apex1 in den *GF11-36N*-leukämischen Zellen hervorgerufen werden könnte (Doetsch and Cunningham, 1990; Ranalli et al., 2002; Chatterjee and Walker, 2017; Pei et al., 2019). Außerdem wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass *GF11-36N*-leukämische Zellen eine verringerte HR-Rate besitzen. Die verringerte HR-Rate in den *GF11-36N*-leukämischen Zellen kann, neben der verringerten BER, eine weitere Erklärung für die höhere Sensitivität gegenüber Olaparib sein. PARPi wie Olaparib zeigen eine synthetische Letalität und wirken besonders sensitiv auf Zellen, welche bereits Mutationen/Veränderungen bei der DNA-DSB-Reparatur, hervorgerufen durch Veränderungen in ATM oder BRCA1/2, besitzen (Ashworth, 2008; Tutt et al., 2010; Schmitt et al., 2017; Knittel et al., 2017; Ronson et al., 2018;

Guo et al., 2018). Das besterforschte Beispiel sind Brustkrebszellen mit BRCA1/2 Mutationen. PARPi wirken auf Brustkrebszellen mit BRCA1/2 Mutationen deutlich sensitiver (Farmer et al., 2005; Bryant et al., 2005; Tutt et al., 2010). PARPi spielen, wie bereits erwähnt, eine Rolle bei der BER und SSB-Reparatur (Lavrik et al., 2001; Parsons et al., 2005; Chatterjee and Walker, 2017; Ronson et al., 2018). Durch die Inhibierung von PARP werden SSB nicht repariert und führen zu DSB, welche normalerweise durch die HR oder das NHEJ repariert werden. Auf Grund der zusätzlichen BRCA1/2-Mutation kommt es zu Problemen bei der HR, wodurch die entstandenen DSB nur noch durch das NHEJ repariert werden können. Das NHEJ kann die verminderte HR nur zu einem geringen Teil ausgleichen, weswegen es auf Grund der nur bedingten Reparatur der DSB und der PARP-Inhibierung, welche zu zusätzlichen DSB führt, zu einer Akkumulation von DSB kommt. Dies führt dann wiederum zum Zellzyklusstillstand und/oder Zelltod (Farmer et al., 2005; Ashworth, 2008; Jackson and Bartek, 2009; Guo et al., 2018). Das ist eine mögliche Erklärung, aus welchem Grund PARPi sensitiver auf Zellen mit HR-Defizienz wirken. Es gibt weitere Erklärungen, warum PARPi sensitiver auf Zellen mit z.B. BRCA-Mutationen oder ATM-Defiziten reagieren (Lorenzo et al., 2013; Schmitt et al., 2017; Knittel et al., 2017). Eine wichtige Rolle dabei spielt das „Fangen von PARP“ (engl.: *PARP-Trapping*). Die PARPi führen zum „*Trapping*“ von PARP1/2 an DNA-Schäden (Murai et al., 2012; Pommier et al., 2016). Dabei entsteht ein PARP-DNA-Komplex. Der PARP-DNA-Komplex führt dann u.a. zu Störungen der Replikation durch Schäden der Replikationsgabel. Deshalb ist es für die Zellen wichtig, PARP-DNA-Komplexe zu reparieren. Für die Reparatur spielen u.a. der Fanconi-Anämie-Weg und die HR eine Rolle, für welches Enzyme wie z.B. BRCA benötigt werden (Murai et al., 2012; Pommier et al., 2016). Können die Komplexe, auf Grund von Defiziten in der HR oder anderen Wegen nicht repariert werden, führen sie zur Zellzytotoxizität. Es wurde gezeigt, dass persistierende PARP-DNA-Komplexe für die Zellen schädlicher sind als nicht reparierte SSB, welche zu DSB führen (Murai et al., 2012; Pommier et al., 2016). Die in der vorliegenden Arbeit detektierte verminderte HR sowie die mögliche BER-Defizienz der *GFI1-36N*-leukämischen Zellen könnten somit die Sensitivität gegenüber Olaparib erklären.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden hauptsächlich *MLL-AF9*-Mauszellen für die Untersuchung der TMZ und/oder Olaparib Behandlung verwendet. Demnach könnte die Hypothese aufgestellt werden, dass der Effekt der Behandlung nur bei Zellen bzw. Patienten mit zusätzlicher *MLL-AF9*-Translokation stattfinden kann. Gegen diese

Theorie spricht, dass in der hier vorliegenden Arbeit bereits erste Versuche mit murinen *NUP98-HOXD13*-Zellen durchgeführt wurden. Bei diesen Versuchen konnte ebenfalls ein selektiver Effekt auf die *GFI1-36N*-leukämischen Zellen festgestellt werden. Des Weiteren wurden neben den murinen Zellen auch primäre humane AML Zellen, welche unterschiedliche Translokationen besaßen, mit TMZ und/oder Olaparib behandelt. Wie bereits bei den murinen *GFI1-36N*-leukämischen Zellen zeigten alle verwendeten humanen *GFI1-36N*-leukämischen Zellen unabhängig von der vorhandenen Translokation eine höhere Reaktion auf die Einzeltherapien und vor allem auf die Kombination der beiden Medikamente. Auf Grund dessen kann davon ausgegangen werden, dass die Sensitivität der *GFI1-36N*-leukämischen Zellen nicht für Zellen mit der *MLL-AF9*-Translokation spezifisch ist.

Erste TMZ-Behandlungen von *GFI1-KD*-leukämischen Zellen lieferten ähnliche Ergebnisse wie bei den *GFI1-36N*-leukämischen Zellen. Die Behandlung mit TMZ zeigte eine höhere Wirkung auf Zellen mit niedrigem GFI1-Level als auf *GFI1-36S*-leukämische Zellen und nicht leukämische Zellen. Es wäre demnach denkbar, dass auch die *GFI1-KD*-leukämischen Zellen einen hohen Effekt auf die Kombinationstherapie aus TMZ und Olaparib zeigen. Es ist jedoch vorstellbar, dass die *GFI1-KD*-nicht leukämischen Zellen ebenfalls stark auf die Gabe von Olaparib reagieren, da gezeigt wurde, dass *GFI1-KD*-Zellen (auch nicht leukämische) Probleme bei der HR haben (Vadnais et al., 2018). Wie beschrieben, tragen HR-Defizite stark zur Sensitivität gegenüber PARPi bei (Ashworth, 2008; Jackson and Bartek, 2009). Zur Untersuchung der Selektivität der Kombinationsbehandlung auf die *GFI1-KD*-leukämischen Zellen, sollten weitere Versuche durchgeführt werden.

5.5 Ausblick

Im Rahmen der Arbeit wurde u.a. der Einfluss der *GFI1-36N*-Variante auf die Entstehung und Reparatur von DNA-Schäden untersucht. Die Anwesenheit von *GFI1-36N* bei gleichen Schadensereignissen führte zu mehr DNA-Schäden und im Falle von malignen Zellen zu einer verminderten DNA-Reparatur. Im Rahmen der verschiedenen Analysen der DEG- und Proteom-Daten sowie funktionellen Assays konnten wir nachweisen, dass die HR und die Mgmt-vermittelte Reparatur in *GFI1-36N*-leukämischen Zellen beeinträchtigt waren. Die generierten Daten wiesen jedoch daraufhin, dass weitere Signalkaskaden wie die BER vermindert sind. Deshalb sollte die BER auf funktioneller Ebene in den unterschiedlichen Zelltypen und *GFI1*-Genotypen, z.B. mittels Comet-Assay und Induktion von 8-OxoG-Läsionen (Azqueta

et al., 2014) oder mittels Plasmid-basiertem Assay (Frosina et al., 2006) untersucht werden. Außerdem sollte die Fähigkeit der *GFI1-36N*-leukämischen Zellen, DNA-DSB mittels NHEJ zu reparieren, im Vergleich zu den *GFI1-36S*-leukämischen Zellen und nicht malignen Zellen, untersucht werden. Diese Untersuchungen sind wichtig, um herauszufinden, ob die Zellen die verminderte HR mittels NHEJ ausgleichen können. Das könnte mit einem Plasmid-basierten Assay, welcher von Certo und Kollegen im Jahr 2011 entwickelt wurde, getestet werden. Der Assay hat den Vorteil, dass die HR und das NHEJ parallel untersucht werden können (Certo et al., 2011). Die HR und das NHEJ sind die beiden Hauptwege zur Reparatur von DSB (Ciccica and Elledge, 2010; Chapman et al., 2012). Durch die vielen detektierten Veränderungen bei der DNA-Reparatur in *GFI1-36N*-Zellen wäre es denkbar, dass ein übergeordneter Signalweg bzw. ein initialer Schritt der DNA-Schadensantwort durch die Präsenz des GFI1-36N-Proteins in den leukämischen Zellen beeinträchtigt ist. Aus diesem Grund sollten initiale Schritte der DNA-Schadensantwort in weiteren Versuchen genauer untersucht werden. Naheliegend sind Untersuchungen zur Aktivität von Atm, Atr sowie Chk1, Chk2 und vor allem p53. Diese fünf Proteine gehören zu den zentralen und initialen DNA-Reparaturproteinen bzw. der DNA-Schadensantwort (Jackson and Bartek, 2009; Smith et al., 2010; Ciccica and Elledge, 2010).

Des Weiteren liefert die Arbeit erste Hinweise darauf, dass es in *GFI1-36N*-leukämischen Zellen zu einer verminderten Zellzykluskontrolle kommen kann. Die verminderte Zellzykluskontrolle könnte Auswirkungen auf die Reparatur von DNA-Schäden haben und somit auf die Proliferation von Zellen mit DNA-Schäden. Zur Bestätigung dieser Hinweise, sollten weitere Versuche zur Untersuchung der Zellproliferation sowie Zellzykluskontrolle durchgeführt werden. Zusätzlich könnten Versuche durchgeführt werden, um zu analysieren welche Zellzyklusproteine in den *GFI1-36N*-leukämischen Zellen verändert sind.

Verschiedene Publikationen zeigten, dass GFI1 nicht nur die Expression der Zielgene durch die Rekrutierung von Histon-modifizierenden Enzymen reguliert, sondern auch über Protein-Protein-Bindungen Einfluss auf die Aktivität von Proteinen nimmt, um deren Aktivität zu regulieren (Vadnais et al., 2018; Vadnais et al., 2019; Möröy and Khandanpour, 2019). Deshalb wäre es möglich, dass durch den Austausch von Serin zu Asparagin (*GFI1-36N*) in der GFI1-intermediären Domäne, welche für Protein-Protein-Bindungen wichtig ist, eigentliche Protein-Protein-Bindungen nicht stattfinden bzw. die Wechselwirkungen weniger stabil sind (Khandanpour et al., 2010; Möröy and

Khandanpour, 2019). Darum sollten die direkten Interaktionspartner von *GFI1-36S* und *GFI1-36N* mittels Interaktom-Analysen untersucht werden.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass es nicht nur zwischen murinen *GFI1-36N*-leukämischen Zellen und *GFI1-36S*-leukämischen Zellen Unterschiede bei der DNA-Reparatur gibt, sondern auch zwischen *GFI1-36N*-leukämischen und nicht leukämischen Zellen. Auf Grund des Unterschiedes zwischen *GFI1-36N*-malignen und nicht malignen Zellen sollten die oben genannten weiterführenden Versuche nicht nur mit den leukämischen Zellen durchgeführt werden, sondern parallel dazu auch mit nicht leukämischen Zellen. Außerdem sollten die Proteom-Analysen, welche bereits mit leukämischen Zellen durchgeführt wurden, auch mit nicht leukämischen (*Lin*⁻-Zellen) wiederholt werden. Um noch genauere Aussagen zwischen dem *GFI1-36N*- und *GFI1-36S*-Genotyp treffen zu können, müssten vor der Proteom-Analyse *in vitro* DNA-Schäden z.B. mittels Bestrahlung induziert werden. Dadurch könnte untersucht werden, welche Proteine in *GFI1-36S*-Zellen bzw. *GFI1-36N*-nicht leukämischen Zellen nach Schadensinduktion hoch- bzw. herunterreguliert werden und im Vergleich könnten die Unterschiede der *GFI1-36N*-leukämischen Zellen detektiert werden.

Zudem wurde gezeigt, dass *GFI1-36N*-leukämische Zellen *in vitro* sensitiver auf die Behandlung mit TMZ und in Kombination mit Olaparib wirken als *GFI1-36S*-leukämische Zellen. Außerdem wurde gezeigt, dass niedrige Konzentrationen von TMZ und Olaparib, welche dennoch einen signifikanten Effekt auf *GFI1-36N*-leukämische Zellen zeigten, keinen oder nur einen geringen Effekt auf nicht leukämische Zellen hatten. Diese Eigenschaften machen die *GFI1-36N*-Variante zu einem interessanten neuen Ziel in der AML-Therapie und die Kombinationstherapie aus TMZ und Olaparib zu potenziellen Medikamenten bei einer AML-Behandlung von Trägern der *GFI1-36N*-Variante. Jedoch wurden in der vorliegenden Arbeit bisher nur *in vitro*- und *ex vivo*-Versuche mit murinen und humanen primären Zellen durchgeführt. Im nächsten Schritt sollten die Medikamente in AML-Mausmodellen mit *GFI1-36S*- bzw. *GFI1-36N*-Genotyp getestet werden. Auf der einen Seite könnten murine *GFI1-36S*- und *GFI1-36N*-AML-Zellen in Mäuse transplantiert werden und die Mäuse anschließend behandelt werden. Auf der anderen Seite könnten humane AML-Zellen mit *GFI1-36S*- oder *GFI1-36N*-Genotyp in NSG-Mäuse transplantiert und die Mäuse behandelt werden (*Patient derived xenografts* (PDX)-Modelle). Dadurch könnte der Erfolg der Therapie in murinen Modellen der humanen AML und auch auf humane

Zellen in Mäusen untersucht werden. Als Kontrolle könnten die transplantierten Mäuse einerseits mit der Trägersubstanz behandelt werden und andererseits mit einer konventionellen AML-Therapie. Dann könnte sowohl das Überleben als auch die Nebenwirkungen der Therapien verglichen werden. Sollten die *in vivo*-Versuche die Ergebnisse der *in vitro*-/*ex vivo*-Versuche bestätigen, wären klinische Studien notwendig, um die Wirkung der Behandlung in AML-Patienten zu untersuchen. Wären diese Studien wiederum erfolgreich, könnte *GFI1-36N* als neues Ziel bei der AML-Therapie durch die Gabe von TMZ und Olaparib in Frage kommen. Im optimalen Fall könnten die Patienten bei Erstdiagnose genotypisiert werden, ob sie Träger des *GFI1-36S* oder *GFI1-36N* sind. Die Patienten mit *GFI1-36N*-Genotyp kämen dann für die neuartige Therapie in Frage.

Ein Teil der in der Arbeit durchgeführten Versuche oder der beschriebenen weiterführenden Versuche sollten zusätzlich mit anderen AML-Mausmodellen/-Zellen wiederholt werden. In der Arbeit wurden nahezu alle Untersuchungen mit dem *MLL-AF9*-Modell durchgeführt. Damit jedoch vollständig ausgeschlossen werden kann, dass die dargestellten Veränderungen der DNA-Reparatur nur in *GFI1-36N*-Zellen mit *MLL-AF9*-Expression vorkommen, sollten zusätzlich Zellen mit z.B. *MN1*, *AML-ETO9a* oder anderen AML-Fusionsgenen analysiert werden. Außerdem sollten die Versuche mit *GFI1-KD*-Zellen wiederholt werden. Erste Untersuchungen mit den *GFI1-KD*-leukämischen Zellen lieferten überschneidende Eigenschaften mit den *GFI1-36N*-leukämischen Zellen. Vor allem die Versuche hinsichtlich des Mgmt-Status und der Behandlung mit TMZ lieferten ebenfalls vielversprechende Ergebnisse. Falls die leukämischen Zellen mit geringem *GFI1*-Level tatsächlich sensitiver und selektiv auf TMZ und Olaparib reagieren, könnten nicht nur Patienten mit *GFI1-36N*-Genotyp von der möglichen neuen Therapie profitieren, sondern auch Patienten mit niedrigerem *GFI1*-Level.

6 Zusammenfassung

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne Erkrankung des hämatopoetischen Systems. Ein repressiver Transkriptionsfaktor, dessen Veränderung bei der Entstehung der AML eine Rolle spielt, ist der Growth Factor Independence 1 (GFI1). Träger einer Einzelnukleotid-Polymorphismus-Variante von *GFI1*, genannt *GFI1-36N* (Austausch von Serin zu Asparagin), haben ein erhöhtes Risiko an einer AML zu erkranken. Wenn die Träger an einer AML erkranken, weist die AML eine schlechtere Prognose auf, als bei Trägern der *GFI1-36S* (WT)-Variante. Ein bereits publizierter Erklärungsansatz war, dass *GFI1-36N* die epigenetischen Veränderungen an den Zielgenen nicht induzieren kann und durch die vermehrte Acetylierung der Zielgene insbesondere Onkogene exprimiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch ein weiteren Aspekt beleuchtet werden. Es wurde nachgewiesen, dass sowohl murine als auch humane *GFI1-36N*-leukämische Zellen eine höhere Anzahl an genetischen Veränderungen besitzen als *GFI1-36S*-leukämische Zellen. Wir zeigten, dass *GFI1-36N*-leukämische Zellen Defizite bei der DNA-Reparatur aufweisen, welche zu einer erhöhten Anzahl an genetischen Veränderungen beitragen können. Zwei Reparaturwege waren insbesondere bei leukämischen *GFI1-36N*-Zellen nachweisbar vermindert, aber nicht bei nicht-malignen *GFI1-36N*-hämatopoetischen Zellen: die homologe Rekombination und die Mgmt-vermittelte Reparatur. Die deutlich verminderte Mgmt-vermittelte Reparatur in den *GFI1-36N*-leukämischen Zellen gegenüber *GFI1-36S*-leukämischen Zellen eröffnet die Möglichkeit einer zielgerichteten Therapie gegen die malignen *GFI1-36N*-Zellen durch das alkylierende Zytostatikum Temozolomid (TMZ). TMZ wirkte bereits bei niedrigen Konzentrationen selektiv auf die *GFI1-36N*-leukämischen Zellen und hatte keinen nachteiligen Effekt auf das Wachstum nicht maligner Zellen. Der Effekt der TMZ-Behandlung konnte durch die Kombination mit Olaparib (PARP-Inhibitor) weiter verstärkt werden. Auch die Kombination aus TMZ und Olaparib hatte einen selektiven Effekt auf maligne *GFI1-36N*-Zellen, jedoch nicht auf die nicht malignen Zellen. Sowohl TMZ als auch Olaparib werden bereits in der Klinik bei malignen Erkrankungen eingesetzt. Vor allem ältere Patienten, bei denen eine Behandlung mit den AML-Standardtherapien schwierig ist, könnten von der neuartigen Therapie profitieren.

Zusammenfassend liefert die vorliegende Arbeit neue Erkenntnisse über die Funktion von GFI1 bei der Genomstabilität und vor allem bei der DNA-Reparatur und eröffnet dadurch die Möglichkeit einer zielgerichteten AML-Therapie.

7 Summary

Acute myeloid leukemia (AML) is a malignant disease of the hematopoietic system. A transcriptional repressor which plays a role in the initiation and progression of AML is the transcriptional repressor Growth Factor Independence 1 (GFI1). Carriers of a single nucleotide polymorphism variant of GFI1, called *GFI1-36N* (serine exchanged to asparagine), have an increased risk of AML development combined with an inferior prognosis than carriers of the more common *GFI1-36S* (WT) variant. Previous studies have shown that GFI1-36N is less able to induce epigenetic silencing of GFI1 target genes. This leads especially to higher expression of oncogenes.

As a novel finding we could show that *GFI1-36N* AML patients display more chromosomal and genetic aberrations in the leukemic cells compared to patients with the *GFI1-36S* variant. Interestingly, these observations could be recapitulated in a murine model of human AML, where *GFI1-36N* leukemic cells show significantly more genetic alterations than *GFI1-36S* leukemic cells. The study further showed that *GFI1-36N* leukemic cells have defects in several DNA repair pathways, which potentially contribute to the detected increased number of genetic alterations. Of note, two repair pathways were impeded in *GFI1-36N* leukemic cells, but not in non-malignant *GFI1-36N* hematopoietic cells: the homologous recombination and the Mgmt-mediated repair. For both impaired DNA repair pathways, specific drugs are already available. The significantly reduced Mgmt-mediated repair pathway in *GFI1-36N* leukemic cells could be specifically targeted by the alkylating agent Temozolomide (TMZ). TMZ selectively targets *GFI1-36N* leukemic cells even at low concentrations without affecting the cell growth of non-malignant cells. The effect of TMZ treatment was further increased by the combination treatment with Olaparib (PARP inhibitor). Again, the effect of this combination was selective for malignant *GFI1-36N* cells but not on non-malignant cells. Both TMZ and Olaparib are currently used in the clinic for malignant disease. We, therefore, propose that using a combination of TMZ and Olaparib might in particular benefit elderly *GFI1-36N* AML patients.

In summary, this work unveils new insights into the function of GFI1 in genome stability, DNA damage response and repair pathways and thus opens the possibility of targeted therapeutic strategy in AML patients.

8 Literaturverzeichnis

- Adams MM, Wang B, Xia Z, Morales JC, Lu X, Donehower LA, Bochar DA, Elledge SJ, Carpenter PB (2005) 53BP1 oligomerization is independent of its methylation by PRMT1. *Cell Cycle* 4:1854–1861.
- Adolfsson J, Månsson R, Buza-Vidas N, Hultquist A, Liuba K, Jensen CT, Bryder D, Yang L, Borge O-J, Thoren LAM, Anderson K, Sitnicka E, Sasaki Y, Sigvardsson M, Jacobsen SEW (2005) Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* 121:295–306.
- Aebersold R, Mann M (2016) Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature* 537:347–355.
- Ahnesorg P, Smith P, Jackson SP (2006) XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* 124:301–313.
- Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL (2000) A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404:193–197.
- Akbari M, Otterlei M, Peña-Diaz J, Aas PA, Kavli B, Liabakk NB, Hagen L, Imai K, Durandy A, Slupphaug G, Krokan HE (2004) Repair of U/G and U/A in DNA by UNG2-associated repair complexes takes place predominantly by short-patch repair both in proliferating and growth-arrested cells. *Nucleic Acids Res* 32:5486–5498.
- Akbari M, Peña-Diaz J, Andersen S, Liabakk N-B, Otterlei M, Krokan HE (2009) Extracts of proliferating and non-proliferating human cells display different base excision pathways and repair fidelity. *DNA Repair (Amst)* 8:834–843.
- Akiba J, Murakami Y, Noda M, Watari K, Ogasawara S, Yoshida T, Kawahara A, Sanada S, Yasumoto M, Yamaguchi R, Kage M, Kuwano M, Ono M, Yano H (2011) N-myc downstream regulated gene1/Cap43 overexpression suppresses tumor growth by hepatic cancer cells through cell cycle arrest at the G0/G1 phase. *Cancer Lett* 310:25–34.
- Alvino E, Castiglia D, Caporali S, Peponi R, Caporaso P, Lacal PM, Marra G, Fischer F, Zambruno G, Bonmassar E, Jiricny J, D'Atri S (2006) A single cycle of treatment with temozolomide, alone or combined with O(6)-benzylguanine, induces strong chemoresistance in melanoma cell clones in vitro: role of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase and the mismatch repair system. *Int J Oncol* 29:785–797.
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW (2016) The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 127:2391–2405.
- Ashworth A (2008) A synthetic lethal therapeutic approach: poly(ADP) ribose polymerase inhibitors for the treatment of cancers deficient in DNA double-strand break repair. *J Clin Oncol* 26:3785–3790.
- Avraham HK, Lee B-C, Avraham S (2005) Colony-Forming Unit Assay: Methods and Implications. In: *Encyclopedic Reference of Immunotoxicology* (Vohr H-W, ed), pp 144–147. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag.
- Azqueta A, Slyskova J, Langie SAS, O'Neill Gaivão I, Collins A (2014) Comet assay to measure DNA repair: approach and applications. *Front Genet* 5:288.
- Bae D-H, Jansson PJ, Huang ML, Kovacevic Z, Kalinowski D, Lee CS, Sahni S, Des Richardson R (2013) The role of NDRG1 in the pathology and potential treatment of human cancers. *J Clin Pathol* 66:911–917.
- Ballesta A, Zhou Q, Zhang X, Lv H, Gallo JM (2014) Multiscale design of cell-type-specific pharmacokinetic/pharmacodynamic models for personalized medicine: application to temozolomide in brain tumors. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* 3:e112.

- Bandyopadhyay S, Pai SK, Hirota S, Hosobe S, Takano Y, Saito K, Piquemal D, Commes T, Watabe M, Gross SC, Wang Y, Ran S, Watabe K (2004) Role of the putative tumor metastasis suppressor gene Drg-1 in breast cancer progression. *Oncogene* 23:5675–5681.
- Barber LJ, Youds JL, Ward JD, McIlwraith MJ, O'Neil NJ, Petalcorin MIR, Martin JS, Collis SJ, Cantor SB, Auclair M, Tissenbaum H, West SC, Rose AM, Boulton SJ (2008) RTEL1 maintains genomic stability by suppressing homologous recombination. *Cell* 135:261–271.
- Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh T-Y, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K (2007) High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129:823–837.
- Barvaux VA, Ranson M, Brown R, McElhinney RS, McMurry TBH, Margison GP (2004) Dual repair modulation reverses Temozolomide resistance in vitro. *Mol Cancer Ther* 3:123–127.
- Benjamin RC, Gill DM (1980) Poly(ADP-ribose) synthesis in vitro programmed by damaged DNA. A comparison of DNA molecules containing different types of strand breaks. *J Biol Chem* 255:10502–10508.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C (1976) Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 33:451–458.
- Bertoli C, Skotheim JM, Bruin RAM de (2013) Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature reviews. Molecular cell biology* 14:518–528.
- Bhakat KK, Mitra S (2003) CpG methylation-dependent repression of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene linked to chromatin structure alteration. *Carcinogenesis* 24:1337–1345.
- Bigbold LP, Coghlan BLD, Jersmann HPA (2006) Cancer morphology, carcinogenesis and genetic instability: a background. *EXS*:1–24.
- Bindea G, Galon J, Mlecnik B (2013) CluePedia Cytoscape plugin: pathway insights using integrated experimental and in silico data. *Bioinformatics (Oxford, England)* 29:661–663.
- Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, Charoentong P, Tosolini M, Kirilovsky A, Fridman W-H, Pagès F, Trajanoski Z, Galon J (2009) ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics (Oxford, England)* 25:1091–1093.
- Bocangel D, Sengupta S, Mitra S, Bhakat KK (2009) p53-Mediated down-regulation of the human DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) via interaction with Sp1 transcription factor. *Anticancer Res* 29:3741–3750.
- Boisvert F-M, Déry U, Masson J-Y, Richard S (2005) Arginine methylation of MRE11 by PRMT1 is required for DNA damage checkpoint control. *Genes Dev* 19:671–676.
- Bonnet D, Dick JE (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3:730–737.
- Botezatu L et al. (2016a) GFI1(36N) as a therapeutic and prognostic marker for myelodysplastic syndrome. *Exp Hematol* 44:590-595.e1.
- Botezatu L, Michel LC, Helness A, Vadnais C, Makishima H, Hönes JM, Robert F, Vassen L, Thivakaran A, Al-Matary Y, Lams RF, Schütte J, Giebel B, Görgens A, Heuser M, Medyouf H, Maciejewski J, Dührsen U, Möröy T, Khandanpour C (2016b) Epigenetic therapy as a novel approach for GFI136N-associated murine/human AML. *Exp Hematol* 44:713-726.e14.
- Brandwein JM, Kassis J, Leber B, Hogge D, Howson-Jan K, Minden MD, Galarneau A, Pouliot J-F (2014) Phase II study of targeted therapy with temozolomide in acute myeloid leukaemia and high-risk myelodysplastic syndrome patients pre-screened for low O(6) -methylguanine DNA methyltransferase expression. *Br J Haematol* 167:664–670.
- Brandwein JM, Yang L, Schimmer AD, Schuh AC, Gupta V, Wells RA, Alibhai SMH, Xu W, Minden MD (2007) A phase II study of temozolomide therapy for poor-risk patients aged

- or=60 years with acute myeloid leukemia: low levels of MGMT predict for response. *Leukemia* 21:821–824.
- Brell M, Tortosa A, Verger E, Gil JM, Viñolas N, Villá S, Acebes JJ, Caral L, Pujol T, Ferrer I, Ribalta T, Graus F (2005) Prognostic significance of O6-methylguanine-DNA methyltransferase determined by promoter hypermethylation and immunohistochemical expression in anaplastic gliomas. *Clin Cancer Res* 11:5167–5174.
- Bret C, Viziteu E, Kassambara A, Moreaux J (2016) Identifying high-risk adult AML patients: epigenetic and genetic risk factors and their implications for therapy. Expert review of hematology 9:351–360.
- Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, Kyle S, Meuth M, Curtin NJ, Helleday T (2005) Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 434:913–917.
- Bueren AO von, Bacolod MD, Hagel C, Heinemann K, Fedier A, Kordes U, Pietsch T, Koster J, Grotzer MA, Friedman HS, Marra G, Kool M, Rutkowski S (2012) Mismatch repair deficiency: a temozolomide resistance factor in medulloblastoma cell lines that is uncommon in primary medulloblastoma tumours. *Br J Cancer* 107:1399–1408.
- Bunting SF, Callén E, Wong N, Chen H-T, Polato F, Gunn A, Bothmer A, Feldhahn N, Fernandez-Capetillo O, Cao L, Xu X, Deng C-X, Finkel T, Nussenzweig M, Stark JM, Nussenzweig A (2010) 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell* 141:243–254.
- Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ (2001) ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 276:42462–42467.
- Cadet J, Berger M, Douki T, Ravanat JL (1997) Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 131:1–87.
- Cahill DP, Levine KK, Betensky RA, Codd PJ, Romany CA, Reavie LB, Batchelor TT, Futreal PA, Stratton MR, Curry WT, Iafrate AJ, Louis DN (2007) Loss of the mismatch repair protein MSH6 in human glioblastomas is associated with tumor progression during temozolomide treatment. *Clin Cancer Res* 13:2038–2045.
- Calvanese V, Nguyen AT, Bolan TJ, Vavilina A, Su T, Lee LK, Wang Y, Lay FD, Magnusson M, Crooks GM, Kurdistani SK, Mikkola HKA (2019) MLLT3 governs human haematopoietic stem-cell self-renewal and engraftment. *Nature* 576:281–286.
- Casorelli I, Russo MT, Bignami M (2008) Role of mismatch repair and MGMT in response to anticancer therapies. *Anticancer Agents Med Chem* 8:368–380.
- Certo MT, Ryu BY, Annis JE, Garibov M, Jarjour J, Rawlings DJ, Scharenberg AM (2011) Tracking genome engineering outcome at individual DNA breakpoints. *Nature methods* 8:671–676.
- Chan DW, Lees-Miller SP (1996) The DNA-dependent protein kinase is inactivated by autophosphorylation of the catalytic subunit. *J Biol Chem* 271:8936–8941.
- Chang X, Xu X, Ma J, Xue X, Li Z, Deng P, Zhang S, Zhi Y, Chen J, Dai D (2014) NDRG1 expression is related to the progression and prognosis of gastric cancer patients through modulating proliferation, invasion and cell cycle of gastric cancer cells. *Mol Biol Rep* 41:6215–6223.
- Chapman JR, Taylor MRG, Boulton SJ (2012) Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell* 47:497–510.
- Chatterjee N, Walker GC (2017) Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen* 58:235–263.
- Chaudhry MA (2007) Base excision repair of ionizing radiation-induced DNA damage in G1 and G2 cell cycle phases. *Cancer Cell Int* 7:15.

- Chen S, Han Y-H, Zheng Y, Zhao M, Yan H, Zhao Q, Chen G-Q, Li D (2009) NDRG1 contributes to retinoic acid-induced differentiation of leukemic cells. *Leuk Res* 33:1108–1113.
- Cheung SW, Bi W (2018) Novel applications of array comparative genomic hybridization in molecular diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 18:531–542.
- Chung YJ, Choi CW, Slape C, Fry T, Aplan PD (2008) Transplantation of a myelodysplastic syndrome by a long-term repopulating hematopoietic cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:14088–14093.
- Ciccia A, Elledge SJ (2010) The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* 40:179–204.
- Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M (1994) High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* 22:2990–2997.
- Cohen MH, Johnson JR, Pazdur R (2005) Food and Drug Administration Drug approval summary: temozolomide plus radiation therapy for the treatment of newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res* 11:6767–6771.
- Corthay A (2009) How do regulatory T cells work? *Scandinavian journal of immunology* 70:326–336.
- Coscia F, Lengyel E, Duraiswamy J, Ashcroft B, Bassani-Sternberg M, Wierer M, Johnson A, Wroblewski K, Montag A, Yamada SD, López-Méndez B, Nilsson J, Mund A, Mann M, Curtis M (2018) Multi-level Proteomics Identifies CT45 as a Chemosensitivity Mediator and Immunotherapy Target in Ovarian Cancer. *Cell* 175:159-170.e16.
- Cruse JM, Lewis RE, Wang H (2004) *Immunology guidebook*. Amsterdam, Boston: Elsevier Academic Press.
- Curtin NJ, Wang L-Z, Yiakouvakaki A, Kyle S, Arris CA, Canan-Koch S, Webber SE, Durkacz BW, Calvert HA, Hostomsky Z, Newell DR (2004) Novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, AG14361, restores sensitivity to temozolomide in mismatch repair-deficient cells. *Clin Cancer Res* 10:881–889.
- Dasika GK, Lin SC, Zhao S, Sung P, Tomkinson A, Lee EY (1999) DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis. *Oncogene* 18:7883–7899.
- Denny BJ, Wheelhouse RT, Stevens MF, Tsang LL, Slack JA (1994) NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. *Biochemistry* 33:9045–9051.
- Dexheimer TS (2013) DNA Repair Pathways and Mechanisms. In: *DNA Repair of Cancer Stem Cells* (Mathews LA, Cabarcas SM, Hurt EM, eds), pp 19–32. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Dianova II, Bohr VA, Dianov GL (2001) Interaction of human AP endonuclease 1 with flap endonuclease 1 and proliferating cell nuclear antigen involved in long-patch base excision repair. *Biochemistry* 40:12639–12644.
- Dietlein F, Thelen L, Reinhardt HC (2014) Cancer-specific defects in DNA repair pathways as targets for personalized therapeutic approaches. *Trends Genet* 30:326–339.
- Dimitrova N, Chen Y-CM, Spector DL, Lange T de (2008) 53BP1 promotes non-homologous end joining of telomeres by increasing chromatin mobility. *Nature* 456:524–528.
- Dobson CL, Warren AJ, Pannell R, Forster A, Lavenir I, Corral J, Smith AJ, Rabbitts TH (1999) The mll-AF9 gene fusion in mice controls myeloproliferation and specifies acute myeloid leukaemogenesis. *EMBO J* 18:3564–3574.
- Doetsch PW, Cunningham RP (1990) The enzymology of apurinic/apyrimidinic endonucleases. *Mutat Res* 236:173–201.
- Dolan ME, Moschel RC, Pegg AE (1990) Depletion of mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity by O6-benzylguanine provides a means to evaluate the role of this

- protein in protection against carcinogenic and therapeutic alkylating agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:5368–5372.
- Dolan ME, Scicchitano D, Singer B, Pegg AE (1984) Comparison of repair of methylated pyrimidines in poly(dT) by extracts from rat liver and *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 123:324–330.
- Domoradzki J, Pegg AE, Dolan ME, Maher VM, McCormick JJ (1984) Correlation between O6-methylguanine-DNA-methyltransferase activity and resistance of human cells to the cytotoxic and mutagenic effect of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Carcinogenesis* 5:1641–1647.
- Drabløs F, Feyzi E, Aas PA, Vaagbø CB, Kavli B, Bratlie MS, Peña-Diaz J, Otterlei M, Slupphaug G, Krokan HE (2004) Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst)* 3:1389–1407.
- Drouet J, Delteil C, Lefrançois J, Concannon P, Salles B, Calsou P (2005) DNA-dependent protein kinase and XRCC4-DNA ligase IV mobilization in the cell in response to DNA double strand breaks. *J Biol Chem* 280:7060–7069.
- Duan Z, Horwitz M (2003a) Gfi-1 oncoproteins in hematopoiesis. *Hematology* 8:339–344.
- Duan Z, Horwitz M (2003b) Targets of the transcriptional repressor oncoprotein Gfi-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5932–5937.
- Duan Z, Zarebski A, Montoya-Durango D, Grimes HL, Horwitz M (2005) Gfi1 coordinates epigenetic repression of p21Cip/WAF1 by recruitment of histone lysine methyltransferase G9a and histone deacetylase 1. *Mol Cell Biol* 25:10338–10351.
- Dutta S, Pregartner G, Rücker FG, Heitzer E, Zebisch A, Bullinger L, Berghold A, Döhner K, Sill H (2020) Functional Classification of TP53 Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *Cancers (Basel)* 12.
- Ehninger G, Aul C (2008) Akute myeloische Leukämie. Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie, Prognose ; mit 29 Tabellen. Köln: Dt. Ärzte-Verl.
- El-Khamisy SF, Masutani M, Suzuki H, Caldecott KW (2003) A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res* 31:5526–5533.
- Esposito MT, So CWE (2014) DNA damage accumulation and repair defects in acute myeloid leukemia: implications for pathogenesis, disease progression, and chemotherapy resistance. *Chromosoma* 123:545–561.
- Esposito MT, Zhao L, Fung TK, Rane JK, Wilson A, Martin N, Gil J, Leung AY, Ashworth A, So CWE (2015) Synthetic lethal targeting of oncogenic transcription factors in acute leukemia by PARP inhibitors. *Nat Med* 21:1481–1490.
- Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG (2000) Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 343:1350–1354.
- Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG (1999) Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res* 59:793–797.
- Estey E, Döhner H (2006) Acute myeloid leukaemia. *Lancet* 368:1894–1907.
- Fabregat A et al. (2016) The Reactome pathway Knowledgebase. *Nucleic Acids Res* 44:D481-7.
- Farago AF et al. (2019) Combination Olaparib and Temozolomide in Relapsed Small-Cell Lung Cancer. *Cancer Discov* 9:1372–1387.
- Faraoni I, Compagnone M, Lavorgna S, Angelini DF, Cencioni MT, Piras E, Panetta P, Ottone T, Dolci S, Venditti A, Graziani G, Lo-Coco F (2015) BRCA1, PARP1 and γ H2AX in acute myeloid leukemia: Role as biomarkers of response to the PARP inhibitor olaparib. *Biochim Biophys Acta* 1852:462–472.

- Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt ANJ, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, Martin NMB, Jackson SP, Smith GCM, Ashworth A (2005) Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 434:917–921.
- Farrell RE (2005) RNA methodologies. A laboratory guide for isolation and characterization. Amsterdam, Boston: Elsevier/Academic Press.
- Feldmann E, Schmiemann V, Goedecke W, Reichenberger S, Pfeiffer P (2000) DNA double-strand break repair in cell-free extracts from Ku80-deficient cells: implications for Ku serving as an alignment factor in non-homologous DNA end joining. *Nucleic Acids Res* 28:2585–2596.
- Fisher AEO, Hochegger H, Takeda S, Caldecott KW (2007) Poly(ADP-ribose) polymerase 1 accelerates single-strand break repair in concert with poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Mol Cell Biol* 27:5597–5605.
- Forget AL, Kowalczykowski SC (2010) Single-molecule imaging brings Rad51 nucleoprotein filaments into focus. *Trends Cell Biol* 20:269–276.
- Förster T (1948) Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.* 437:55–75.
- Fortini P, Pascucci B, Parlanti E, Sobol RW, Wilson SH, Dogliotti E (1998) Different DNA polymerases are involved in the short- and long-patch base excision repair in mammalian cells. *Biochemistry* 37:3575–3580.
- Friedman HS, Dolan ME, Pegg AE, Marcelli S, Keir S, Catino JJ, Bigner DD, Schold SC (1995) Activity of temozolomide in the treatment of central nervous system tumor xenografts. *Cancer Res* 55:2853–2857.
- Friedman HS, Kerby T, Calvert H (2000) Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clin Cancer Res* 6:2585–2597.
- Frosina G, Cappelli E, Ropolo M, Fortini P, Pascucci B, Dogliotti E (2006) In vitro base excision repair assay using mammalian cell extracts. *Methods Mol Biol* 314:377–396.
- Gabius H-J, Kaltner H, Kopitz J, André S (2015) The glycobiology of the CD system: a dictionary for translating marker designations into glycan/lectin structure and function. *Trends Biochem Sci* 40:360–376.
- Gary R, Kim K, Cornelius HL, Park MS, Matsumoto Y (1999) Proliferating cell nuclear antigen facilitates excision in long-patch base excision repair. *J Biol Chem* 274:4354–4363.
- Gerson SL (2004) MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 4:296–307.
- Giagounidis A (2020) Myelodysplastische Syndrome. *Internist (Berl)* 61:175–184.
- Gilks CB, Bear SE, Grimes HL, Tschlis PN (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. *Mol Cell Biol* 13:1759–1768.
- Gojo I et al. (2017) A Phase 1 Study of the PARP Inhibitor Veliparib in Combination with Temozolomide in Acute Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res* 23:697–706.
- Goode DK et al. (2016) Dynamic Gene Regulatory Networks Drive Hematopoietic Specification and Differentiation. *Developmental cell* 36:572–587.
- Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D, Ohyashiki K, Toyama K, Aul C, Muftic G, Bennett J (1997) International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 89:2079–2088.
- Greenberg PL et al. (2011) Myelodysplastic Syndromes: Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 9:30–56.
- Grimes HL, Chan TO, Zweidler-Mckay PA, Tong B, Tschlis PN (1996) The Gfi-1 proto-oncoprotein contains a novel transcriptional repressor domain, SNAG, and inhibits G1 arrest induced by interleukin-2 withdrawal. *Mol Cell Biol* 16:6263–6272.

- Gunderson CC, Moore KN (2015) Olaparib: an oral PARP-1 and PARP-2 inhibitor with promising activity in ovarian cancer. *Future Oncol* 11:747–757.
- Guo XX, Wu HL, Shi HY, Su L, Zhang X (2018) The efficacy and safety of olaparib in the treatment of cancers: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Cancer Manag Res* 10:2553–2562.
- Gyori BM, Venkatachalam G, Thiagarajan PS, Hsu D, Clement M-V (2014) OpenComet: an automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biol* 2:457–465.
- Hallek M, Re D, Wolf J (2007) Grundlagen der Hämatopoese. In: *Medizinische Therapie 2007 | 2008* (Schölmerich J, ed), pp 304–307. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Hamblin T (1992) Clinical features of MDS. *Leuk Res* 16:89–93.
- Hamdy MS, El-Haddad AM, Bahaa El-Din NM, Makhlof MM, Abdel-Hamid SM (2011) RAD51 and XRCC3 gene polymorphisms and the risk of developing acute myeloid leukemia. *J Investig Med* 59:1124–1130.
- Harper JW, Elledge SJ (2007) The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* 28:739–745.
- Harvey JW (2012) Hematopoiesis. In: *Veterinary Hematology*, pp 33–48. Elsevier.
- Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, Tribolet N de, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JEC, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R (2005) MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352:997–1003.
- Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, Mehta MP, Gilbert MR (2008) Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol* 26:4189–4199.
- Hengstler JG, Tanner B, Möller L, Meinert R, Kaina B (1999) Activity of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase in relation to p53 status and therapeutic response in ovarian cancer. *Int J Cancer* 84:388–395.
- Hertzano R, Montcouquiol M, Rashi-Elkeles S, Elkon R, Yücel R, Frankel WN, Rechavi G, Möröy T, Friedman TB, Kelley MW, Avraham KB (2004) Transcription profiling of inner ears from Pou4f3(ddl/ddl) identifies Gfi1 as a target of the Pou4f3 deafness gene. *Hum Mol Genet* 13:2143–2153.
- Hickman MJ, Samson LD (2004) Apoptotic signaling in response to a single type of DNA lesion, O(6)-methylguanine. *Mol Cell* 14:105–116.
- Hochegger H, Dejsuphong D, Fukushima T, Morrison C, Sonoda E, Schreiber V, Zhao GY, Saberi A, Masutani M, Adachi N, Koyama H, Murcia G de, Takeda S (2006) Parp-1 protects homologous recombination from interference by Ku and Ligase IV in vertebrate cells. *EMBO J* 25:1305–1314.
- Hock H, Hamblen MJ, Rooke HM, Schindler JW, Saleque S, Fujiwara Y, Orkin SH (2004) Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells. *Nature* 431:1002–1007.
- Hock H, Hamblen MJ, Rooke HM, Traver D, Bronson RT, Cameron S, Orkin SH (2003) Intrinsic requirement for zinc finger transcription factor Gfi-1 in neutrophil differentiation. *Immunity* 18:109–120.
- Hock H, Orkin SH (2006) Zinc-finger transcription factor Gfi-1: versatile regulator of lymphocytes, neutrophils and hematopoietic stem cells. *Curr Opin Hematol* 13:1–6.
- Hönes JM et al. (2016) GFI1 as a novel prognostic and therapeutic factor for AML/MDS. *Leukemia* 30:1237–1245.
- Hönes JM, Thivakaran A, Botezatu L, Patnana P, Castro SVdC, Al-Matary YS, Schütte J, Fischer KBI, Vassen L, Görgens A, Dührsen U, Giebel B, Khandanpour C (2017) Enforced GFI1 expression impedes human and murine leukemic cell growth. *Sci Rep* 7:15720.

- Horman SR, Velu CS, Chaubey A, Bourdeau T, Zhu J, Paul WE, Gebelein B, Grimes HL (2009) Gfi1 integrates progenitor versus granulocytic transcriptional programming. *Blood* 113:5466–5475.
- Horton JK, Joyce-Gray DF, Pachkowski BF, Swenberg JA, Wilson SH (2003) Hypersensitivity of DNA polymerase beta null mouse fibroblasts reflects accumulation of cytotoxic repair intermediates from site-specific alkyl DNA lesions. *DNA Repair (Amst)* 2:27–48.
- Horton JK, Stefanick DF, Prasad R, Gassman NR, Kedar PS, Wilson SH (2014) Base excision repair defects invoke hypersensitivity to PARP inhibition. *Mol Cancer Res* 12:1128–1139.
- Hou W-H, Chen S-H, Yu X (2019) Poly-ADP ribosylation in DNA damage response and cancer therapy. *Mutat Res* 780:82–91.
- Howlander N., Noone AM., Krapcho M., Miller D., Brest A., Yu M., Ruhl J., Tatalovich Z., Mariotto A., Lewis DR., Chen HS., Feuer EJ., Cronin KA. (2019) SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016. based on November 2018 SEER data submission, posted to the SEER web site: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/. Bethesda, MD.
- Hsu S-H, Chen S-H, Kuo C-C, Chang J-Y (2018) Ubiquitin-conjugating enzyme E2 B regulates the ubiquitination of O6-methylguanine-DNA methyltransferase and BCNU sensitivity in human nasopharyngeal carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 158:327–338.
- Ibuki Y, Toyooka T (2015) Evaluation of chemical phototoxicity, focusing on phosphorylated histone H2AX. *J Radiat Res* 56:220–228.
- Jackson SE, Chester JD (2015) Personalised cancer medicine. *Int J Cancer* 137:262–266.
- Jackson SP, Bartek J (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461:1071–1078.
- Johnson PF, McKnight SL (1989) Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Annu Rev Biochem* 58:799–839.
- Johnson RD, Jasin M (2000) Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *EMBO J* 19:3398–3407.
- Jung J, Buisman S, Haan G de (2016) Hematopoiesis during development, aging, and disease. *Exp Hematol* 44:689–695.
- Kaina B, Christmann M, Naumann S, Roos WP (2007) MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst)* 6:1079–1099.
- Kaina B, Ziouta A, Ochs K, Coquerelle T (1997) Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by O6-methylguanine in Mex-, Mex+ and methylation-tolerant mismatch repair compromised cells: facts and models. *Mutat Res* 381:227–241.
- Karsunky H, Zeng H, Schmidt T, Zevnik B, Kluge R, Schmid KW, Dührsen U, Möröy T (2002) Inflammatory reactions and severe neutropenia in mice lacking the transcriptional repressor Gfi1. *Nat Genet* 30:295–300.
- Kasper DL, Fauci AS, Harrison TR (2016) *Harrisons Innere Medizin*. New York, NY, Berlin, Stuttgart: McGraw-Hill Education; ABW Wissenschaftsverlag; Thieme.
- Kastan MB, Bartek J (2004) Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432:316–323.
- Kastenhuber ER, Lowe SW (2017) Putting p53 in Context. *Cell* 170:1062–1078.
- Kazanjian A, Wallis D, Au N, Nigam R, Venken KJT, Cagle PT, Dickey BF, Bellen HJ, Gilks CB, Grimes HL (2004) Growth factor independence-1 is expressed in primary human neuroendocrine lung carcinomas and mediates the differentiation of murine pulmonary neuroendocrine cells. *Cancer Res* 64:6874–6882.
- Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D (2002) The human genome browser at UCSC. *Genome research* 12:996–1006.
- Khandanpour C et al. (2010) A variant allele of Growth Factor Independence 1 (GF11) is associated with acute myeloid leukemia. *Blood* 115:2462–2472.

- Khandanpour C, Kosan C, Gaudreau M-C, Dührsen U, Hébert J, Zeng H, Möröy T (2011) Growth factor independence 1 protects hematopoietic stem cells against apoptosis but also prevents the development of a myeloproliferative-like disease. *Stem Cells* 29:376–385.
- Khandanpour C, Krongold J, Schütte J, Bouwman F, Vassen L, Gaudreau M-C, Chen R, Calero-Nieto FJ, Diamanti E, Hannah R, Meyer SE, Grimes HL, van der Reijden BA, Jansen JH, Patel CV, Peeters JK, Löwenberg B, Dührsen U, Göttgens B, Möröy T (2012) The human GFI136N variant induces epigenetic changes at the *Hoxa9* locus and accelerates K-RAS driven myeloproliferative disorder in mice. *Blood* 120:4006–4017.
- Khandanpour C, Phelan JD, Vassen L, Schütte J, Chen R, Horman SR, Gaudreau M-C, Krongold J, Zhu J, Paul WE, Dührsen U, Göttgens B, Grimes HL, Möröy T (2013) Growth factor independence 1 antagonizes a p53-induced DNA damage response pathway in lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 23:200–214.
- Khanna KK, Jackson SP (2001) DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 27:247–254.
- Kiwerska K, Szyfter K (2019) DNA repair in cancer initiation, progression, and therapy—a double-edged sword. *J Appl Genet* 60:329–334.
- Knittel G et al. (2017) Two mouse models reveal an actionable PARP1 dependence in aggressive chronic lymphocytic leukemia. *Nat Commun* 8:153.
- Kobayashi J, Antoccia A, Tauchi H, Matsuura S, Komatsu K (2004) NBS1 and its functional role in the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)* 3:855–861.
- Kolas NK, Chapman JR, Nakada S, Ylanko J, Chahwan R, Sweeney FD, Panier S, Mendez M, Wildenhain J, Thomson TM, Pelletier L, Jackson SP, Durocher D (2007) Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science* 318:1637–1640.
- Kondo M, Weissman IL, Akashi K (1997) Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91:661–672.
- Krauter J, Wagner K, Schäfer I, Marschalek R, Meyer C, Heil G, Schaich M, Ehninger G, Niederwieser D, Krahl R, Büchner T, Sauerland C, Schlegelberger B, Döhner K, Döhner H, Schlenk RF, Ganser A (2009) Prognostic factors in adult patients up to 60 years old with acute myeloid leukemia and translocations of chromosome band 11q23: individual patient data-based meta-analysis of the German Acute Myeloid Leukemia Intergroup. *J Clin Oncol* 27:3000–3006.
- Kraywinkel K, Spix C (2017) Epidemiologie akuter Leukämien in Deutschland. *Onkologie* 23:499–503.
- Krivtsov AV, Figueroa ME, Sinha AU, Stubbs MC, Feng Z, Valk PJM, Delwel R, Döhner K, Bullinger L, Kung AL, Melnick AM, Armstrong SA (2013) Cell of origin determines clinically relevant subtypes of MLL-rearranged AML. *Leukemia* 27:852–860.
- Krokan HE, Bjørås M (2013) Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5:a012583.
- Kuo LJ, Yang L-X (2008) Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo* 22:305–309.
- Kurban M, Wajid M, Petukhova L, Shimomura Y, Christiano AM (2011) A nonsense mutation in the *HOXD13* gene underlies synpolydactyly with incomplete penetrance. *J Hum Genet* 56:701–706.
- Kurnit KC, Coleman RL, Westin SN (2018) Using PARP Inhibitors in the Treatment of Patients With Ovarian Cancer. *Curr Treat Options Oncol* 19:1.
- Lamarche BJ, Orazio NI, Weitzman MD (2010) The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance. *FEBS Lett* 584:3682–3695.
- Lavrik OI, Prasad R, Sobol RW, Horton JK, Ackerman EJ, Wilson SH (2001) Photoaffinity labeling of mouse fibroblast enzymes by a base excision repair intermediate. Evidence for the role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in DNA repair. *J Biol Chem* 276:25541–25548.

- Lee C-L, Lee C-H, Chuang C-K, Chiu H-C, Chen Y-J, Chou C-L, Wu P-S, Chen C-P, Lin H-Y, Lin S-P (2019) Array-CGH increased the diagnostic rate of developmental delay or intellectual disability in Taiwan. *Pediatr Neonatol* 60:453–460.
- Lelli KM, Slattery M, Mann RS (2012) Disentangling the many layers of eukaryotic transcriptional regulation. *Annu Rev Genet* 46:43–68.
- Lesueur P et al. (2019) Phase I/IIa study of concomitant radiotherapy with olaparib and temozolomide in unresectable or partially resectable glioblastoma: OLA-TMZ-RTE-01 trial protocol. *BMC Cancer* 19:198.
- Li S, Chen J, Yang Z, Lu G, Tang H, Hu H (2008) N-myc downstream-regulated gene 1 as a downregulated target gene of PTEN in the controlling of tumourigenesis in endometrioid carcinoma. *Indian J Med Res* 127:453–459.
- Liberzon A, Birger C, Thorvaldsdóttir H, Ghandi M, Mesirov JP, Tamayo P (2015) The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell systems* 1:417–425.
- Lin WJ, Gary JD, Yang MC, Clarke S, Herschman HR (1996) The mammalian immediate-early TIS21 protein and the leukemia-associated BTG1 protein interact with a protein-arginine N-methyltransferase. *J Biol Chem* 271:15034–15044.
- Lin Y-W, Slape C, Zhang Z, Aplan PD (2005) NUP98-HOXD13 transgenic mice develop a highly penetrant, severe myelodysplastic syndrome that progresses to acute leukemia. *Blood* 106:287–295.
- Lindahl T (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362:709–715.
- Lindahl T, Barnes DE (2000) Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 65:127–133.
- Liu L, Gerson SL (2006) Targeted modulation of MGMT: clinical implications. *Clin Cancer Res* 12:328–331.
- Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR methods and applications* 4:357–362.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods (San Diego, Calif.)* 25:402–408.
- Lorenzo SB de, Patel AG, Hurley RM, Kaufmann SH (2013) The Elephant and the Blind Men: Making Sense of PARP Inhibitors in Homologous Recombination Deficient Tumor Cells. *Front Oncol* 3:228.
- Lou Z, Minter-Dykhouse K, Franco S, Gostissa M, Rivera MA, Celeste A, Manis JP, van Deursen J, Nussenzweig A, Paull TT, Alt FW, Chen J (2006) MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol Cell* 21:187–200.
- Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15:550.
- Loveless A (1969) Possible relevance of O-6 alkylation of deoxyguanosine to the mutagenicity and carcinogenicity of nitrosamines and nitrosamides. *Nature* 223:206–207.
- Löwenberg B, Downing JR, Burnett A (1999) Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 341:1051–1062.
- Lu Y, Liu Y, Yang C (2017) Evaluating In Vitro DNA Damage Using Comet Assay. *J Vis Exp*. doi:10.3791/56450.
- Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR (2002) Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* 108:781–794.
- Mann M (2008) Can proteomics retire the western blot? *J Proteome Res* 7:3065.

- Mari P-O, Florea BI, Persengiev SP, Verkaik NS, Brüggerwirth HT, Modesti M, Giglia-Mari G, Bezstarosti K, Demmers JAA, Luider TM, Houtsmuller AB, van Gent DC (2006) Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:18597–18602.
- Matsuda Y, Aida J, Ishikawa N, Takubo K, Ishiwata T, Arai T (2017) Morphological Markers of Chromosomal Instability. In: *Chromosomal Abnormalities - A Hallmark Manifestation of Genomic Instability* (Larramendy ML, Soloneski S, eds). InTech.
- Matsumoto Y, Kim K (1995) Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair. *Science* 269:699–702.
- Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER, Hurov KE, Luo J, Bakalarski CE, Zhao Z, Solimini N, Lerenthal Y, Shiloh Y, Gygi SP, Elledge SJ (2007) ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 316:1160–1166.
- McCulloch SD, Kunkel TA (2008) The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases. *Cell Res* 18:148–161.
- McGhee L, Bryan J, Elliott L, Grimes HL, Kazanjian A, Davis JN, Meyers S (2003) Gfi-1 attaches to the nuclear matrix, associates with ETO (MTG8) and histone deacetylase proteins, and represses transcription using a TSA-sensitive mechanism. *J Cell Biochem* 89:1005–1018.
- McIlwraith MJ, McIlwraith MJ, Vaisman A, Liu Y, Fanning E, Woodgate R, West SC (2005) Human DNA polymerase eta promotes DNA synthesis from strand invasion intermediates of homologous recombination. *Mol Cell* 20:783–792.
- Meek K, van Dang, Lees-Miller SP (2008) DNA-PK: the means to justify the ends? *Adv Immunol* 99:33–58.
- Melnikova M, Thomale J (2018) Visualization and Quantitative Measurement of Drug-Induced Platinum Adducts in the Nuclear DNA of Individual Cells by an Immuno-Cytological Assay. *Methods Mol Biol* 1655:351–358.
- Middleton MR, Grob JJ, Aaronson N, Fierlbeck G, Tilgen W, Seiter S, Gore M, Aamdal S, Cebon J, Coates A, Dreno B, Henz M, Schadendorf D, Kapp A, Weiss J, Fraass U, Statkevich P, Muller M, Thatcher N (2000) Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol* 18:158–166.
- Minten EV, Yu DS (2019) DNA Repair: Translation to the Clinic. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 31:303–310.
- Minter-Dykhouse K, Ward I, Huen MSY, Chen J, Lou Z (2008) Distinct versus overlapping functions of MDC1 and 53BP1 in DNA damage response and tumorigenesis. *J Cell Biol* 181:727–735.
- Mitra S (2007) MGMT: a personal perspective. *DNA Repair (Amst)* 6:1064–1070.
- Miyazaki T, Bressan DA, Shinohara M, Haber JE, Shinohara A (2004) In vivo assembly and disassembly of Rad51 and Rad52 complexes during double-strand break repair. *EMBO J* 23:939–949.
- Mjelle R, Hegre SA, Aas PA, Slupphaug G, Drabløs F, Saetrom P, Krokan HE (2015) Cell cycle regulation of human DNA repair and chromatin remodeling genes. *DNA Repair (Amst)* 30:53–67.
- Moignard V, Macaulay IC, Swiers G, Buettner F, Schütte J, Calero-Nieto FJ, Kinston S, Joshi A, Hannah R, Theis FJ, Jacobsen SE, Bruijn MF de, Göttgens B (2013) Characterization of transcriptional networks in blood stem and progenitor cells using high-throughput single-cell gene expression analysis. *Nature cell biology* 15:363–372.
- Mol CD, Izumi T, Mitra S, Tainer JA (2000) DNA-bound structures and mutants reveal abasic DNA binding by APE1 and DNA repair coordination corrected. *Nature* 403:451–456.

- Montaldi AP, Godoy PRDV, Sakamoto-Hojo ET (2015) APE1/REF-1 down-regulation enhances the cytotoxic effects of temozolomide in a resistant glioblastoma cell line. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 793:19–29.
- Möröy T, Khandanpour C (2011) Growth factor independence 1 (Gfi1) as a regulator of lymphocyte development and activation. *Semin Immunol* 23:368–378.
- Möröy T, Khandanpour C (2019) Role of GFI1 in Epigenetic Regulation of MDS and AML Pathogenesis: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Front Oncol* 9:824.
- Möröy T, Vassen L, Wilkes B, Khandanpour C (2015) From cytopenia to leukemia: the role of Gfi1 and Gfi1b in blood formation. *Blood* 126:2561–2569.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65:55–63.
- Murai J, Huang S-yN, Das BB, Renaud A, Zhang Y, Doroshow JH, Ji J, Takeda S, Pommier Y (2012) Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Res* 72:5588–5599.
- Murai J, Zhang Y, Morris J, Ji J, Takeda S, Doroshow JH, Pommier Y (2014) Rationale for poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors in combination therapy with camptothecins or temozolomide based on PARP trapping versus catalytic inhibition. *J Pharmacol Exp Ther* 349:408–416.
- Murcia JM de, Niedergang C, Trucco C, Ricoul M, Dutrillaux B, Mark M, Oliver FJ, Masson M, Dierich A, LeMeur M, Walztinger C, Chambon P, Murcia G de (1997) Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:7303–7307.
- Nair N, Shoaib M, Sørensen CS (2017) Chromatin Dynamics in Genome Stability: Roles in Suppressing Endogenous DNA Damage and Facilitating DNA Repair. *Int J Mol Sci* 18.
- Nakamura T, Mori T, Tada S, Krajewski W, Rozovskaia T, Wassell R, Dubois G, Mazo A, Croce CM, Canaani E (2002) ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol Cell* 10:1119–1128.
- Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD (2010) Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nature reviews. Molecular cell biology* 11:220–228.
- Nick McElhinny SA, Snowden CM, McCarville J, Ramsden DA (2000) Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends. *Mol Cell Biol* 20:2996–3003.
- Odell ID, Barbour J-E, Murphy DL, Della-Maria JA, Sweasy JB, Tomkinson AE, Wallace SS, Pederson DS (2011) Nucleosome disruption by DNA ligase III-XRCC1 promotes efficient base excision repair. *Mol Cell Biol* 31:4623–4632.
- Odero MD, Zeleznik-Le NJ, Chinwalla V, Rowley JD (2000) Cytogenetic and molecular analysis of the acute monocytic leukemia cell line THP-1 with an MLL-AF9 translocation. *Genes Chromosomes Cancer* 29:333–338.
- Offer H, Zurer I, Banfalvi G, Reha'k M, Falcovitz A, Milyavsky M, Goldfinger N, Rotter V (2001) p53 modulates base excision repair activity in a cell cycle-specific manner after genotoxic stress. *Cancer Res* 61:88–96.
- Olive PL, Banáth JP (2006) The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc* 1:23–29.
- Orkin SH (1995) Transcription factors and hematopoietic development. *J Biol Chem* 270:4955–4958.
- Parsons JL, Dianova II, Allinson SL, Dianov GL (2005) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 protects excessive DNA strand breaks from deterioration during repair in human cell extracts. *FEBS J* 272:2012–2021.
- Patel AG, Flatten KS, Schneider PA, Dai NT, McDonald JS, Poirier GG, Kaufmann SH (2012) Enhanced killing of cancer cells by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors and

- topoisomerase I inhibitors reflects poisoning of both enzymes. *J Biol Chem* 287:4198–4210.
- Patro R, Duggal G, Love MI, Irizarry RA, Kingsford C (2017) Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature methods* 14:417–419.
- Pearsall EA, Lincz LF, Skelding KA (2018) The Role of DNA Repair Pathways in AML Chemosensitivity. *Curr Drug Targets* 19:1205–1219.
- Pegg AE, Dolan ME, Moschel RC (1995) Structure, function, and inhibition of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 51:167–223.
- Pegg AE, Wiest L, Foote RS, Mitra S, Perry W (1983) Purification and properties of O6-methylguanine-DNA transmethylase from rat liver. *J Biol Chem* 258:2327–2333.
- Pei D-S, Jia P-P, Luo J-J, Liu W, Strauss PR (2019) AP endonuclease 1 (Apex1) influences brain development linking oxidative stress and DNA repair. *Cell Death Dis* 10:348.
- Peponi R, Marra G, Fuggetta MP, Falcinelli S, Pagani E, Bonmassar E, Jiricny J, D'Atri S (2003) The effect of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and mismatch repair activities on the sensitivity of human melanoma cells to temozolomide, 1,3-bis(2-chloroethyl)1-nitrosourea, and cisplatin. *J Pharmacol Exp Ther* 304:661–668.
- Peranzoni E, Zilio S, Marigo I, Dolcetti L, Zanovello P, Mandruzzato S, Bronte V (2010) Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. *Current opinion in immunology* 22:238–244.
- Person RE, Li F-Q, Duan Z, Benson KF, Wechsler J, Papadaki HA, Eliopoulos G, Kaufman C, Bertolone SJ, Nakamoto B, Papayannopoulou T, Grimes HL, Horwitz M (2003) Mutations in proto-oncogene GFI1 cause human neutropenia and target ELA2. *Nat Genet* 34:308–312.
- Phelan JD, Shroyer NF, Cook T, Gebelein B, Grimes HL (2010) Gfi1-cells and circuits: unraveling transcriptional networks of development and disease. *Curr Opin Hematol* 17:300–307.
- Pineault N, Buske C, Feuring-Buske M, Abramovich C, Rosten P, Hogge DE, Aplan PD, Humphries RK (2003) Induction of acute myeloid leukemia in mice by the human leukemia-specific fusion gene NUP98-HOXD13 in concert with Meis1. *Blood* 101:4529–4538.
- Pitroda SP, Pashtan IM, Logan HL, Budke B, Darga TE, Weichselbaum RR, Connell PP (2014) DNA repair pathway gene expression score correlates with repair proficiency and tumor sensitivity to chemotherapy. *Sci Transl Med* 6:229ra42.
- Plettenberg A, Meigel WN, Moll I (2000) *Dermatologie an der Schwelle zum neuen Jahrtausend. Aktueller Stand von Klinik und Forschung*. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg.
- Plummer R, Jones C, Middleton M, Wilson R, Evans J, Olsen A, Curtin N, Boddy A, McHugh P, Newell D, Harris A, Johnson P, Steinfeldt H, Dewji R, Wang D, Robson L, Calvert H (2008) Phase I study of the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, AG014699, in combination with temozolomide in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 14:7917–7923.
- Pommier Y, O'Connor MJ, Bono J de (2016) Laying a trap to kill cancer cells: PARP inhibitors and their mechanisms of action. *Sci Transl Med* 8:362ps17.
- Prasad R, Shock DD, Beard WA, Wilson SH (2010) Substrate channeling in mammalian base excision repair pathways: passing the baton. *J Biol Chem* 285:40479–40488.
- Prasad R, Singhal RK, Srivastava DK, Molina JT, Tomkinson AE, Wilson SH (1996) Specific interaction of DNA polymerase beta and DNA ligase I in a multiprotein base excision repair complex from bovine testis. *J Biol Chem* 271:16000–16007.
- Prokocimer M, Molchadsky A, Rotter V (2017) Dysfunctional diversity of p53 proteins in adult acute myeloid leukemia: projections on diagnostic workup and therapy. *Blood* 130:699–712.

- Pu X, Wang Z, Klaunig JE (2015) Alkaline Comet Assay for Assessing DNA Damage in Individual Cells. *Curr Protoc Toxicol* 65:3.12.1-3.12.11.
- Pujade-Lauraine E, Ledermann JA, Selle F, GebSKI V, Penson RT, Oza AM, Korach J, Huzarski T, Poveda A, Pignata S, Friedlander M, Colombo N, Harter P, Fujiwara K, Ray-Coquard I, Banerjee S, Liu J, Lowe ES, Bloomfield R, Pautier P (2017) Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive, relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 18:1274–1284.
- Quinn JA, Jiang SX, Reardon DA, Desjardins A, Vredenburgh JJ, Rich JN, Gururangan S, Friedman AH, Bigner DD, Sampson JH, McLendon RE, Herndon JE, Walker A, Friedman HS (2009) Phase II trial of temozolomide plus o6-benzylguanine in adults with recurrent, temozolomide-resistant malignant glioma. *J Clin Oncol* 27:1262–1267.
- Radom CT, Banerjee A, Verdine GL (2007) Structural characterization of human 8-oxoguanine DNA glycosylase variants bearing active site mutations. *J Biol Chem* 282:9182–9194.
- Ranalli TA, Tom S, Bambara RA (2002) AP endonuclease 1 coordinates flap endonuclease 1 and DNA ligase I activity in long patch base excision repair. *J Biol Chem* 277:41715–41724.
- Ranson M, Middleton MR, Bridgewater J, Lee SM, Dawson M, Jowle D, Halbert G, Waller S, McGrath H, Gumbrell L, McElhinney RS, Donnelly D, McMurry TBH, Margison GP (2006) Lomeguatrib, a potent inhibitor of O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase: phase I safety, pharmacodynamic, and pharmacokinetic trial and evaluation in combination with temozolomide in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 12:1577–1584.
- Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X (2013) An improvement of the 2⁻(-delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, bioinformatics and biomathematics* 3:71–85.
- Rass E, Grabarz A, Plo I, Gautier J, Bertrand P, Lopez BS (2009) Role of Mre11 in chromosomal nonhomologous end joining in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* 16:819–824.
- Richardson C, Stark JM, Ommundsen M, Jasin M (2004) Rad51 overexpression promotes alternative double-strand break repair pathways and genome instability. *Oncogene* 23:546–553.
- Richter G (2003) *Praktische Biochemie. Grundlagen und Techniken ; 193 Abbildungen, 19 Tabellen.* Stuttgart, New York: Georg Thieme verlag.
- Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L (2004) *Assay Guidance Manual. Cell Viability Assays.* Bethesda (MD).
- Robson M, Im S-A, Senkus E, Xu B, Domchek SM, Masuda N, Delaloge S, Li W, Tung N, Armstrong A, Wu W, Goessl C, Runswick S, Conte P (2017) Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *N Engl J Med* 377:523–533.
- Rödel B, Tavassoli K, Karsunky H, Schmidt T, Bachmann M, Schaper F, Heinrich P, Shuai K, Elsässer HP, Möröy T (2000) The zinc finger protein Gfi-1 can enhance STAT3 signaling by interacting with the STAT3 inhibitor PIAS3. *EMBO J* 19:5845–5855.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273:5858–5868.
- Ronson GE, Piberger AL, Higgs MR, Olsen AL, Stewart GS, McHugh PJ, Petermann E, Lakin ND (2018) PARP1 and PARP2 stabilise replication forks at base excision repair intermediates through Fbh1-dependent Rad51 regulation. *Nat Commun* 9:746.
- Rosenbauer F, Wagner K, Kutok JL, Iwasaki H, Le Beau MM, Okuno Y, Akashi K, Fiering S, Tenen DG (2004) Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1. *Nat Genet* 36:624–630.

- Rossi DJ, Seita J, Czechowicz A, Bhattacharya D, Bryder D, Weissman IL (2007) Hematopoietic stem cell quiescence attenuates DNA damage response and permits DNA damage accumulation during aging. *Cell Cycle* 6:2371–2376.
- Rothkamm K, Krüger I, Thompson LH, Löbrich M (2003) Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* 23:5706–5715.
- Saleque S, Kim J, Rooke HM, Orkin SH (2007) Epigenetic regulation of hematopoietic differentiation by Gfi-1 and Gfi-1b is mediated by the cofactors CoREST and LSD1. *Mol Cell* 27:562–572.
- Samson L, Cairns J (1977) A new pathway for DNA repair in *Escherichia coli*. *Nature* 267:281–283.
- Sánchez-Castillo M, Ruau D, Wilkinson AC, Ng FSL, Hannah R, Diamanti E, Lombard P, Wilson NK, Gottgens B (2015) CODEX: a next-generation sequencing experiment database for the haematopoietic and embryonic stem cell communities. *Nucleic Acids Res* 43:D1117-23.
- Sartori AA, Lukas C, Coates J, Mistrik M, Fu S, Bartek J, Baer R, Lukas J, Jackson SP (2007) Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* 450:509–514.
- Sawyers CL, Denny CT, Witte ON (1991) Leukemia and the disruption of normal hematopoiesis. *Cell* 64:337–350.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-Y, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods* 9:676–682.
- Schmitt A, Knittel G, Welcker D, Yang T-P, George J, Nowak M, Leeser U, Büttner R, Perner S, Peifer M, Reinhardt HC (2017) ATM Deficiency Is Associated with Sensitivity to PARP1- and ATR Inhibitors in Lung Adenocarcinoma. *Cancer Res* 77:3040–3056.
- Schmitt S, Engel A (2020) Analyse von hämatopoietischen Stammzellen. *Biospektrum* 26:655–657.
- Schmitz S (2011) *Der Experimentator: Zellkultur*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Schreiber V, Amé J-C, Dollé P, Schultz I, Rinaldi B, Fraulob V, Ménissier-de Murcia J, Murcia G de (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *J Biol Chem* 277:23028–23036.
- Schwarzmeier JD (1996) The role of cytokines in haematopoiesis. *Eur J Haematol Suppl* 60:69–74.
- Sebesta M, Burkovics P, Juhasz S, Zhang S, Szabo JE, Lee MYWT, Haracska L, Krejci L (2013) Role of PCNA and TLS polymerases in D-loop extension during homologous recombination in humans. *DNA Repair (Amst)* 12:691–698.
- Seedhouse C, Faulkner R, Ashraf N, Das-Gupta E, Russell N (2004) Polymorphisms in genes involved in homologous recombination repair interact to increase the risk of developing acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 10:2675–2680.
- Seita J, Weissman IL (2010) Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2:640–653.
- Seiter K, Liu D, Loughran T, Siddiqui A, Baskind P, Ahmed T (2002) Phase I study of temozolomide in relapsed/refractory acute leukemia. *J Clin Oncol* 20:3249–3253.
- Shadduck RK, Nunna NG, Krebs J (1971) Granulocyte colony-stimulating factor. II. Relationship to in vivo granulopoiesis. *J Lab Clin Med* 78:53–60.
- Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T (2003) Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research* 13:2498–2504.

- Shen J, Gilmore EC, Marshall CA, Haddadin M, Reynolds JJ, Eyaid W, Bodell A, Barry B, Gleason D, Allen K, Ganesh VS, Chang BS, Grix A, Hill RS, Topcu M, Caldecott KW, Barkovich AJ, Walsh CA (2010) Mutations in PNKP cause microcephaly, seizures and defects in DNA repair. *Nat Genet* 42:245–249.
- Shimada M, Dumitrache LC, Russell HR, McKinnon PJ (2015) Polynucleotide kinase-phosphatase enables neurogenesis via multiple DNA repair pathways to maintain genome stability. *EMBO J* 34:2465–2480.
- Short NJ, Rytting ME, Cortes JE (2018) Acute myeloid leukaemia. *Lancet* 392:593–606.
- Shroyer NF, Wallis D, Venken KJT, Bellen HJ, Zoghbi HY (2005) Gfi1 functions downstream of Math1 to control intestinal secretory cell subtype allocation and differentiation. *Genes Dev* 19:2412–2417.
- Silber JR, Bobola MS, Blank A, Chamberlain MC (2012) O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase in glioma therapy: promise and problems. *Biochim Biophys Acta* 1826:71–82.
- Singer B, Kuśmierk JT (1982) Chemical mutagenesis. *Annu Rev Biochem* 51:655–693.
- Singh R, Mehrotra S, Gopalakrishnan M, Gojo I, Karp JE, Greer JM, Chen A, Piekarczyk R, Kiesel BF, Gobburu J, Rudek MA, Beumer JH (2019) Population pharmacokinetics and exposure-response assessment of veliparib co-administered with temozolomide in patients with myeloid leukemias. *Cancer Chemother Pharmacol* 83:319–328.
- Slape C, Aplan PD (2004) The role of NUP98 gene fusions in hematologic malignancy. *Leuk Lymphoma* 45:1341–1350.
- Smith J, Tho LM, Xu N, Gillespie DA (2010) The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv Cancer Res* 108:73–112.
- Smith M, Barnett M, Bassan R, Gatta G, Tondini C, Kern W (2004) Adult acute myeloid leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 50:197–222.
- Spooner CJ, Lesch J, Yan D, Khan AA, Abbas A, Ramirez-Carrozzi V, Zhou M, Soriano R, Eastham-Anderson J, Diehl L, Lee WP, Modrusan Z, Pappu R, Xu M, DeVoss J, Singh H (2013) Specification of type 2 innate lymphocytes by the transcriptional determinant Gfi1. *Nature immunology* 14:1229–1236.
- Srivenugopal KS, Yuan XH, Friedman HS, Ali-Osman F (1996) Ubiquitination-dependent proteolysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human and murine tumor cells following inactivation with O6-benzylguanine or 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Biochemistry* 35:1328–1334.
- Stavropoulou V, Kaspar S, Brault L, Sanders MA, Juge S, Morettini S, Tzankov A, Iacovino M, Lau I-J, Milne TA, Royo H, Kyba M, Valk PJM, Peters AHFM, Schwaller J (2016) MLL-AF9 Expression in Hematopoietic Stem Cells Drives a Highly Invasive AML Expressing EMT-Related Genes Linked to Poor Outcome. *Cancer Cell* 30:43–58.
- Stevens MF, Hickman JA, Langdon SP, Chubb D, Vickers L, Stone R, Baig G, Goddard C, Gibson NW, Slack JA (1987) Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of 8-carbamoyl-3-methylimidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one (CCRG 81045; M & B 39831), a novel drug with potential as an alternative to dacarbazine. *Cancer Res* 47:5846–5852.
- Stritzelberger J, Distel L, Buslei R, Fietkau R, Putz F (2018) Acquired temozolomide resistance in human glioblastoma cell line U251 is caused by mismatch repair deficiency and can be overcome by lomustine. *Clin Transl Oncol* 20:508–516.
- Stucki M, Clapperton JA, Mohammad D, Yaffe MB, Smerdon SJ, Jackson SP (2005) MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* 123:1213–1226.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T,

- Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352:987–996.
- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15545–15550.
- Sulkowski PL, Oeck S, Dow J, Economos NG, Mirfakhraie L, Liu Y, Noronha K, Bao X, Li J, Shuch BM, King MC, Bindra RS, Glazer PM (2020) Oncometabolites suppress DNA repair by disrupting local chromatin signalling. *Nature* 582:586–591.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J (2017) WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- Takata H, Hanafusa T, Mori T, Shimura M, Iida Y, Ishikawa K, Yoshikawa K, Yoshikawa Y, Maeshima K (2013) Chromatin compaction protects genomic DNA from radiation damage. *PLoS One* 8:e75622.
- Takeda DY, Dutta A (2005) DNA replication and progression through S phase. *Oncogene* 24:2827–2843.
- Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S (1997) Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3801–3804.
- Tano K, Shiota S, Collier J, Foote RS, Mitra S (1990) Isolation and structural characterization of a cDNA clone encoding the human DNA repair protein for O6-alkylguanine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:686–690.
- Tarsounas M, Davies AA, West SC (2004) RAD51 localization and activation following DNA damage. *Philos Trans R Soc Lond , B, Biol Sci* 359:87–93.
- Tentori L, Graziani G (2002) Pharmacological strategies to increase the antitumor activity of methylating agents. *Curr Med Chem* 9:1285–1301.
- Tentori L, Graziani G (2009) Recent approaches to improve the antitumor efficacy of temozolomide. *Curr Med Chem* 16:245–257.
- Tisdale MJ (1987) Antitumor imidazotetrazines--XV. Role of guanine O6 alkylation in the mechanism of cytotoxicity of imidazotetrazinones. *Biochem Pharmacol* 36:457–462.
- Trivedi RN, Almeida KH, Fornisaglio JL, Schamus S, Sobol RW (2005) The role of base excision repair in the sensitivity and resistance to temozolomide-mediated cell death. *Cancer Res* 65:6394–6400.
- Tschan MP, Shan D, Laedrach J, Eyholzer M, Leibundgut EO, Baerlocher GM, Tobler A, Stroka D, Fey MF (2010) NDRG1/2 expression is inhibited in primary acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 34:393–398.
- Tubbs A, Nussenzweig A (2017) Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer. *Cell* 168:644–656.
- Turgeon M-O, Perry NJS, Poulogiannis G (2018) DNA Damage, Repair, and Cancer Metabolism. *Front Oncol* 8:15.
- Tutt A, Robson M, Garber JE, Domchek SM, Audeh MW, Weitzel JN, Friedlander M, Arun B, Loman N, Schmutzler RK, Wardley A, Mitchell G, Earl H, Wickens M, Carmichael J (2010) Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet* 376:235–244.
- Vadnais C, Chen R, Fraszczak J, Hamard P-J, Manfredi JJ, Möröy T (2019) A novel regulatory circuit between p53 and GFI1 controls induction of apoptosis in T cells. *Sci Rep* 9:6304.
- Vadnais C, Chen R, Fraszczak J, Yu Z, Boulais J, Pinder J, Frank D, Khandanpour C, Hébert J, Delleire G, Côté J-F, Richard S, Orthwein A, Drobetsky E, Möröy T (2018) GFI1 facilitates

- efficient DNA repair by regulating PRMT1 dependent methylation of MRE11 and 53BP1. *Nat Commun* 9:1418.
- van der Meer LT, Jansen JH, van der Reijden BA (2010) Gfi1 and Gfi1b: key regulators of hematopoiesis. *Leukemia* 24:1834–1843.
- van der Veken LT, Buijs A (2011) Array CGH in human leukemia: from somatics to genetics. *Cytogenet Genome Res* 135:260–270.
- van Erp AEM, van Houdt L, Hillebrandt-Roeffen MHS, van Bree NFHN, Flucke UE, Mentzel T, Shipley J, Desar IME, Fleuren EDG, Versleijen-Jonkers YMH, van der Graaf WTA (2020) Olaparib and temozolomide in desmoplastic small round cell tumors: a promising combination in vitro and in vivo. *J Cancer Res Clin Oncol* 146:1659–1670.
- Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD (2002) The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 100:2292–2302.
- Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD (2009) The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114:937–951.
- Vassen L, Beauchemin H, Lemsaddek W, Krongold J, Trudel M, Möry T (2014) Growth factor independence 1b (gfi1b) is important for the maturation of erythroid cells and the regulation of embryonic globin expression. *PLoS One* 9:e96636.
- Verbeek B, Southgate TD, Gilham DE, Margison GP (2008) O6-Methylguanine-DNA methyltransferase inactivation and chemotherapy. *Br Med Bull* 85:17–33.
- Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C (2000) Flow cytometry of apoptotic cell death. *Journal of Immunological Methods* 243:167–190.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C (1995) A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods* 184:39–51.
- Wallace SS, Murphy DL, Sweasy JB (2012) Base excision repair and cancer. *Cancer Lett* 327:73–89.
- Wallis D, Hamblen M, Zhou Y, Venken KJT, Schumacher A, Grimes HL, Zoghbi HY, Orkin SH, Bellen HJ (2003) The zinc finger transcription factor Gfi1, implicated in lymphomagenesis, is required for inner ear hair cell differentiation and survival. *Development* 130:221–232.
- Wang M, Wu W, Wu W, Rosidi B, Zhang L, Wang H, Iliakis G (2006) PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res* 34:6170–6182.
- Ward IM, Minn K, van Deursen J, Chen J (2003) p53 Binding protein 53BP1 is required for DNA damage responses and tumor suppression in mice. *Mol Cell Biol* 23:2556–2563.
- Ward JF (1988) DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 35:95–125.
- Watts GS, Pieper RO, Costello JF, Peng YM, Dalton WS, Futscher BW (1997) Methylation of discrete regions of the O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) CpG island is associated with heterochromatinization of the MGMT transcription start site and silencing of the gene. *Mol Cell Biol* 17:5612–5619.
- Wedge SR, Porteus JK, May BL, Newlands ES (1996) Potentiation of temozolomide and BCNU cytotoxicity by O(6)-benzylguanine: a comparative study in vitro. *Br J Cancer* 73:482–490.
- Weiler M et al. (2014) mTOR target NDRG1 confers MGMT-dependent resistance to alkylating chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:409–414.
- Welinder E, Murre C (2011) Ldb1, a new guardian of hematopoietic stem cell maintenance. *Nature immunology* 12:113–114.

- Wenzel ES, Singh ATK (2018) Cell-cycle Checkpoints and Aneuploidy on the Path to Cancer. *In Vivo* 32:1–5.
- Williams AB, Schumacher B (2016) p53 in the DNA-Damage-Repair Process. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6.
- Willis N, Rhind N (2009) Regulation of DNA replication by the S-phase DNA damage checkpoint. *Cell Div* 4:13.
- Woodhouse BC, Dianova II, Parsons JL, Dianov GL (2008) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 modulates DNA repair capacity and prevents formation of DNA double strand breaks. *DNA Repair (Amst)* 7:932–940.
- Wouters BJ, Delwel R (2016) Epigenetics and approaches to targeted epigenetic therapy in acute myeloid leukemia. *Blood* 127:42–52.
- Xu-Welliver M, Pegg AE (2002) Degradation of the alkylated form of the DNA repair protein, O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis* 23:823–830.
- Yamada H, Vijayachandra K, Penner C, Glick A (2001) Increased sensitivity of transforming growth factor (TGF) beta 1 null cells to alkylating agents reveals a novel link between TGFbeta signaling and O(6)-methylguanine methyltransferase promoter hypermethylation. *J Biol Chem* 276:19052–19058.
- Yonekura S-I, Nakamura N, Yonei S, Zhang-Akiyama Q-M (2009) Generation, biological consequences and repair mechanisms of cytosine deamination in DNA. *J Radiat Res* 50:19–26.
- Yoo S, Dynan WS (1999) Geometry of a complex formed by double strand break repair proteins at a single DNA end: recruitment of DNA-PKcs induces inward translocation of Ku protein. *Nucleic Acids Res* 27:4679–4686.
- You Z, Chahwan C, Bailis J, Hunter T, Russell P (2005) ATM activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C terminus of Nbs1. *Mol Cell Biol* 25:5363–5379.
- Yu X, Fu S, Lai M, Baer R, Chen J (2006) BRCA1 ubiquitinates its phosphorylation-dependent binding partner CtIP. *Genes Dev* 20:1721–1726.
- Yücel R, Kosan C, Heyd F, Möröy T (2004) Gfi1:green fluorescent protein knock-in mutant reveals differential expression and autoregulation of the growth factor independence 1 (Gfi1) gene during lymphocyte development. *J Biol Chem* 279:40906–40917.
- Yusuf D et al. (2012) The transcription factor encyclopedia. *Genome Biol* 13:R24.
- Zeng H, Yücel R, Kosan C, Klein-Hitpass L, Möröy T (2004) Transcription factor Gfi1 regulates self-renewal and engraftment of hematopoietic stem cells. *EMBO J* 23:4116–4125.
- Zhang J, Chen S, Zhang W, Zhang J, Liu X, Shi H, Che H, Wang W, Li F, Yao L (2008) Human differentiation-related gene NDRG1 is a Myc downstream-regulated gene that is repressed by Myc on the core promoter region. *Gene* 417:5–12.
- Zhang J, Stevens MFG, Bradshaw TD (2012) Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Curr Mol Pharmacol* 5:102–114.
- Zhang J, Stevens MFG, Loughton CA, Madhusudan S, Bradshaw TD (2010) Acquired resistance to temozolomide in glioma cell lines: molecular mechanisms and potential translational applications. *Oncology* 78:103–114.
- Zhou JX, Feng LJ, Zhang X (2017) Risk of severe hematologic toxicities in cancer patients treated with PARP inhibitors: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Drug Des Devel Ther* 11:3009–3017.
- Zweidler-Mckay PA, Grimes HL, Flubacher MM, Tschlis PN (1996) Gfi-1 encodes a nuclear zinc finger protein that binds DNA and functions as a transcriptional repressor. *Mol Cell Biol* 16:4024–4034.

9 Danksagung

Allen voran möchte ich meinem **Betreuer** PD Dr. Cyrus Khandanpour danken. Ich danke ihm für die Möglichkeit, dieses spannende Projekt durchführen zu können und dass ich Teil eines wirklich großartigen Teams sein durfte. Außerdem möchte ich mich für die vielen Ratschläge, die aufgebrauchte Zeit und die etlichen fachlichen Diskussionen bedanken. Ich habe in den Jahren viel von Cyrus Khandanpour gelernt. Er hat mich immer unterstützt und mich durch neue Herausforderungen und Aufgaben gefördert. Dadurch konnte ich mich weiterentwickeln. Danke hierfür!

Außerdem möchte ich allen **Arbeitskollegen** für die tolle Arbeitsatmosphäre danken. Selbst in schwierigen Zeiten haben wir uns gegenseitig aufgemuntert. Allen voran möchte ich meinem Kollegen und Freund Pradeep Kumar Patnana für die großartige gemeinsame Zeit, die Unterstützung und die Hilfsbereitschaft danken. Ein weiteres besonderes Dankeschön gilt Dr. Yahya Al-Matary für seinen Optimismus und entgegengebrachte Hilfsbereitschaft. Großer Dank gilt auch Lanying Wei für die Hilfe bei den bioinformatischen Analysen und die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen. Außerdem möchte ich mich auch bei allen weiteren Kolleginnen und Kollegen, darunter Dr. Subbaiah Chary Nimmagadda und Dr. Judith Schütte, für die fachlichen Diskussionen bedanken. Des Weiteren danke ich Dr. Aniththa Thivakaran für die Unterstützung bei experimentellen Arbeiten, sowie Hannelore Leuschke, Dagmar Clemens, Renata Köster sowie Marina Suslo für die Unterstützung. Danke auch an Helal Noman, Longlong Liu sowie Xiaoqing Xie und allen anderen Labormitarbeitern und medizinischen Doktoranden/Studenten in der Klinik für Hämatologie in Essen und der Med. Klinik A in Münster. Ich habe während meiner Arbeit viele großartige Menschen kennengelernt, von denen ich viel lernen durfte, sowohl für die Arbeit als auch im privaten Bereich. Danke!

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Bertram Opalka für die Ratschläge bei der Anfertigung der Arbeit und Herrn Prof. Dr. Ulrich Dührsen, sowie Herrn Prof. Dr. Georg Lenz für die Bereitstellung der Laborräume und die Möglichkeit, die Arbeit am jeweiligen Institut durchzuführen.

Ich möchte mich auch herzlich bei allen **Kooperationspartnern** für die Hilfe bei diesem Projekt bedanken: Dr. Ashok Kumar Jayavelu, Prof. Dr. Michael Heuser und Team, Prof. Dr. Gudrun Göhring und Team, Prof. Dr. Doris Steinemann und Team, PD Dr. Jürgen Thomale und Team, PD Dr. Friedrich Stölzel und Team, Prof. Dr. Irmela Jeremias und Team, PD Dr. Thomas Liehr und Team sowie dem Team der Core Facility Genomik Münster und des IMCES in Essen. Außerdem möchte ich den Mitarbeitern der ZTE Münster und des ZTL Essen danken und allen anderen Personen, die mich bei der Arbeit in irgendeiner Weise unterstützt haben.

Ein großes Dankeschön für die viele Unterstützung und Geduld geht an meine **Familie**. Meine Mama, meinen Papa und meinen Ehemann Misno standen immer hinter mir und haben mir den Rücken gestärkt. Meine Eltern haben mich bei allen Schritten, egal wie schwer diese waren, immer unterstützt und dafür bin ich sehr dankbar.

Zu guter Letzt möchte ich mich auch von ganzem Herzen bei all meinen **Freunden** aus der Heimat, aus der Schulzeit und aus Studienzeiten bedanken. Ihr seid mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Hierbei gilt mein besonderer Dank Marius, Philipp und Michael. Sie haben mich sowohl während der Schulzeit, des Studiums als auch bei der Doktorarbeit begleitet und waren immer für mich da. Besonders dankbar bin ich ihnen für die Ablenkung von jeglichem Stress. Außerdem möchte ich mich bei Isabelle für die Unterstützung und aufgebrauchte Zeit bedanken.

10 Veröffentlichungen

Vadnais C, Chen R, Fraszczak J, Yu Z, Boulais J, Pinder J, **Frank D**, Khandanpour C, Hébert J, Dellaire G, Côté J-F, Richard S, Orthwein A, Drobetsky E and Möröy T **(2018)** GFI1 facilitates efficient DNA repair by regulating PRMT1 dependent methylation of MRE11 and 53BP1. Nature communications: PMID: 29651020

Thivakaran A, Botezatu L, Hönes J, Schütte J, Vassen L, Al-Matary Yahya, Patnana P K, Zeller A, Heuser M, Thol F, Gabdoulline R, Olberding N, **Frank D**, Suslo M, Köster R, Lennartz K, Görgens A, Giebel B, Opalka B, Dührsen U and Khandanpour C **(2018)** Gfi1b: a key player in the genesis and maintenance of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. Haematologica: PMID: 29326122

11 Lebenslauf

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

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

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

12 Eidesstattliche Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Die Rolle von GFI1 in der Genomstabilität“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von *Daria Frank* befürworte.

Essen, den _____
PD Dr. Cyrus Khandanpour

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient, bei der Abfassung der Dissertation nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____
Daria Frank

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) e) + g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____
Daria Frank